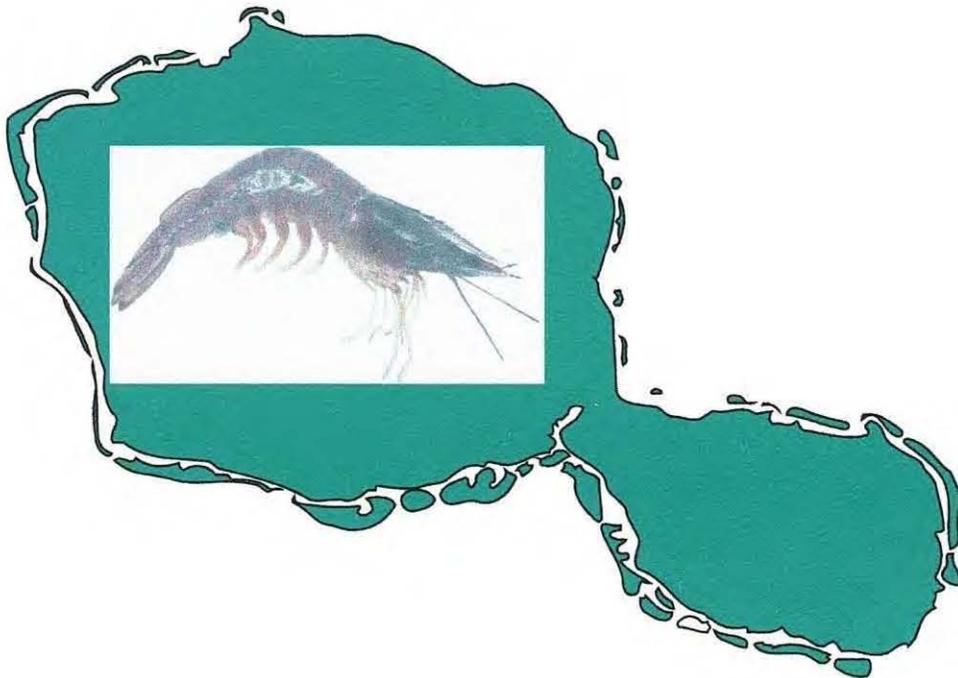


CHARLIER James
17 septembre 2002

Dirigé par SAULNIER Denis

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PATHOGENIE
INDUITE PAR UNE VIBRIOSE DE CREVETTE**



REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, je tiens à remercier chaleureusement Messieurs Jacques CALVAS, Directeur du C.O.P IFREMER, et Emmanuel Thouard, Chef du Laboratoire d'Aquaculture Tropicale, pour avoir bien voulu m'accueillir au sein du Centre Océanologique du Pacifique.

J'adresse tout particulièrement ma très grande gratitude à Denis SAULNIER, Responsable de l'unité Pathologie au C.O.P et maître de stage. A l'origine de ce travail, il a su me guider, avec sympathie et enthousiasme, tout au long de ces 3 mois. Ses conseils avisés m'auront été d'un grand secours, que ce soit pour la conception et la réalisation des différentes expérimentations ou au moment de la rédaction de ce rapport.

Et puis parce que ce travail n'aurait jamais vu le jour sans l'aide de toute l'équipe Pathologie, j'adresse un grand Maururu au duo " de choc ", à savoir : Murielle DUMAIS et Péva LEVY, ainsi qu'à Nathalie COCHENNEC future responsable de l'unité pathologie, pour leurs conseils judicieux et leur soutien appréciable, et tout cela, toujours dans la bonne humeur !

Enfin, je remercie les stagiaires, thésards et VAT, compagnons "d'infortune" au sein du C.O.P : Caroline, Nathalie, Julien, Audrey, Fréd.

Cette expérience aura été extrêmement enrichissante, tant sur le plan professionnel qu'humain...

RESUME

Depuis 1993, les fermes pénéicoles de Nouvelles Calédonie doivent faire face au Syndrome 93, qui provoque d'importantes flambées épizootiques parmi les crevettes *Litopenaeus stylirostris*. Le rôle d'une bactérie marine, *Vibrio penaeicida*, a pu être mis en évidence. En réponse à ce pathogène, des méthodes de diagnostic et l'étude de la pathogénie ont donc été recherchées.

L'infection expérimentale des animaux s'est faite par une méthode standardisée de baignade à la DL50. Le suivi de mortalité des animaux a permis de confirmer la virulence de la souche bactérienne. Aucun signes pathognomoniques d'infection à *V. penaeicida* AM101 n'a pu être caractérisé sauf la chute du nombre d'hémocytes circulants.

Nous utilisons une sonde froide ADN spécifique de l'ARN 16S de *V. penaeicida* pour détecter le pathogène. Des essais confirment la spécificité de cette sonde. Des tests d'hybridation *in situ* sur des échantillons bactériens purs et des tissus infectés expérimentalement par intramusculaire ont révélé la capacité des sondes à détecter le pathogène sur des tissus sans générer de bruits de fond.

La cinétique d'infection a pu être décrite. La bactérie entre par les branchies et la voie digestive pour se multiplier à 12h dans l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde et induire une septicémie à 24h post-infection.

ABSTRACT

Since 1993, significant mortality outbreaks of Shrimps *Litopenaeus stylirostris* have been reported from grown out pounds in New Caledonia. This pathology, known as Syndrome 93, is responsible for acute epizootic. A sea bacterium, *Vibrio. penaeicida*, has been soon related to the infection. To prevent this shrimp disease, diagnostic methods and dynamic studies of this *Vibrio* have been planned.

The experimental infection model by immersion has been used. The bacterial virulence has been proved by dynamic of mortality. Just the fall of number of haemocytes in circulation has been identified as a sign of pathology.

The probe DNA corresponding to the specific 16S RNA has been used to detect purified DNA of *V. penaeicida*. The capacity of the probe to identify the pathogen has been proved by Dot Blot immunoassay method and *in situ* hybridization tests on bacterial suspension and abdominal muscles certainly infected.

Tissue location of *Vibrio* has been described. The bacteriums are absorbed via the gills and the digestive system. They multiply in the hepatopancreas and the lymphoid organ from 12h to day one. Finally, bacterial septicemia appeared by day one.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	5
1/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	6
1.1/ LA PÉNÉICULTURE AUJOURD'HUI	6
1.1.1/ <i>La pénéculture dans le monde</i>	6
1.1.1.1) Historique	6
1.1.1.2) Production mondiale et répartition	6
1.1.1.3) Le marché de la crevette	7
1.1.1.4) Principales espèces exploitées	7
1.1.2/ <i>La production pénécicole dans deux Territoires d'Outre-Mer</i>	7
1.1.2.1) La Polynésie Française	7
1.1.2.2) La Nouvelle-Calédonie	8
1.2/ LES MALADIES DE CREVETTES	9
1.2.1/ <i>Rappel des pathologies majeures</i>	9
1.2.2/ <i>Le syndrome 93</i>	10
1.3/ LA PATHOGÉNIE DES VIBRIO DE CREVETTES	13
2- ETUDE EXPÉRIMENTALE	16
2-1 MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
2-1-1 <i>L' Infection expérimentale</i>	16
2-1-1-1 Les animaux	16
2-1-1-2 Les conditions de réalisation de l'infection :	17
2-1-2 <i>Les prélèvements et traitements de tissus</i>	18
2-1-2-1 Fréquence des prélèvements	18
2-1-2-2 Traitements des tissus pour l'observation des signes cliniques	19
2-1-2-3 Traitements des tissus pour l'histologie	20
2-1-3 <i>La préparation d'une sonde ADN de V. penaeicida</i>	20
2-1-4 <i>L'hybridation sur membrane</i>	21
2-1-5 <i>L'hybridation in situ</i>	22
2-1-5-1 Traitements des tissus et hybridation	22
2-1-5-2 Immuno-révélation des hybrides	23
2-1-6 <i>Recherche par PCR de colonies bactériennes appartenant à l'espèce V. penaeicida</i>	24
2.2 METHODOLOGIE	25
3/ RESULTATS	26
3.1 L'INFECTION EXPÉRIMENTALE	26
3.1.1 <i>Confirmation du pouvoir pathogène de la souche bactérienne</i>	26
3.2 RECHERCHE DES SIGNES CLINIQUES D'INFECTION	27
3.2.1 <i>Les symptômes de la maladie</i>	27
3.2.2 <i>Le portage bactérien dans l'hémolymphe</i>	27
3.2.3 <i>Présence de la souche AM101 dans l'hémolymphe</i>	28
3.2.4 <i>Les comptages hémoctaires</i>	28
3.2.5 <i>Le temps de coagulation</i>	29
3.3 OBTENTION DES SONDAS ET TESTS DE SENSIBILITÉ	29
3.3.1 <i>Visualisation des sondes</i>	29
3.3.2 <i>Sensibilité de la sonde ADN-DIG</i>	30
3.3.3 <i>Confirmation de la réactivité des sondes en hybridation in situ et améliorations du protocole d'hybridation</i>	30
3.3.3.1 <i>Sur culot bactérien</i>	30
3.2.4.2 <i>Hybridation in situ sur tissus de crevettes infectées par injection intramusculaire de V. penaeicida</i>	31
3.4 ESSAIS DE LOCALISATION TISSULAIRE DE <i>V. PENAEICIDA</i> CHEZ DES CREVETTES INFECTÉES PAR BALNÉATION	32
4/ DISCUSSION	33
4.1 DISCUSSION DES RÉSULTATS	33
4.1.1 <i>Confirmation du pouvoir pathogène et premiers signes cliniques</i>	33

4.1.2 De l'obtention des sondes aux tests de réactivité.....	34
4.1.3 Localisation du pathogène après infection par balnéation.....	34
4.2 DISCUSSION MÉTHODOLOGIQUE	36
4.2.1 Confirmation du pouvoir pathogène et premiers signes cliniques.....	36
4.2.2 De l'obtention des sondes au test de réactivité.....	37
4.2.3 La technique d'hybridation in situ.....	37
<u>CONCLUSION</u>	38
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	39
<u>LEXIQUE DES ABREVIATIONS</u>	41
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	42
<u>TABLE DES ANNEXES</u>	42

INTRODUCTION

La pathogénie des vibrioses de crevettes est encore mal élucidée. Pourtant certains *Vibrio* révèlent un fort pouvoir pathogène du moins en condition expérimentale et ils sont souvent retrouvés associés à des épisodes de mortalité comme se fut le cas durant le Syndrome 93 en Nouvelle-Calédonie.

Une meilleure compréhension des mécanismes de virulence permettrait pourtant à l'avenir d'envisager l'utilisation de substances à des fins thérapeutiques. Il serait ainsi possible d'améliorer notre compréhension des mécanismes de défense des crevettes pénécides ainsi que d'étudier la sensibilité de quelques effecteurs immunitaires aux facteurs environnementaux et à l'agent pathogène. L'objectif est de définir des critères de sélection génétique, des moyens de lutte et des outils de détection rapides et fiables devant faciliter la réalisation d'enquêtes épidémiologiques.

Concernant *V. penaeicida* quelques travaux ont déjà été effectués dans le cadre d'une collaboration DRIM-COP afin d'étudier les voies d'entrée et d'élimination du pathogène et de pouvoir caractériser certaines réactions immunitaires de l'animal.

En ce qui concerne la dynamique d'infection chez la crevette, les résultats sont encore parcellaires et il convient de pouvoir les préciser à l'avenir en développant des outils adaptés.

Deux objectifs ont été poursuivis :

- Le développement et évaluation de sondes bio moléculaires de diagnostic
- L'utilisation de ces sondes afin de localiser le pathogène dans les tissus de crevettes infectées expérimentalement

Nous commencerons par une introduction bibliographique sur le thème de la pénéculture mondiale aujourd'hui avant d'aborder la question des vibrioses.

Nous poursuivrons par une description détaillée des protocoles d'expérimentations

Les résultats ainsi obtenus seront analysés en fonction des données bibliographiques existantes.

Finalement une discussion méthodologique sera lancée afin de juger de la pertinence des résultats avancés durant cette étude.

Figure 1 : Production mondiale de crevettes

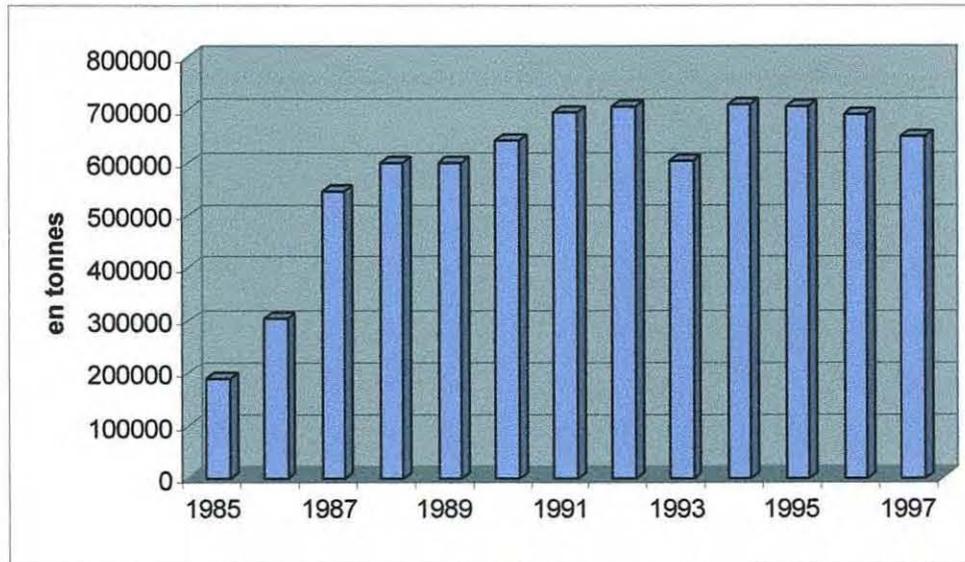


Figure 2 : Production de crevettes dans les principaux pays producteurs en 1997

	Equateur	Thaïlande	Indonésie	Vietnam
Production (milliers de tonnes)	128.2	151.2	81	29.4
% de production par l'aquaculture	95	54	30	30

Source : F.A.O and S.N.I 1997

1/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1/ La pénéculture aujourd'hui

1.1.1/ La pénéculture dans le monde

1.1.1.1) Historique

Dans les années 1930, Fujinaga parvient à maîtriser le cycle biologique complet de crevettes *Marsupenaeus japonicus* en milieu artificiel. Cette découverte a permis la conception au Japon des premiers bassins, laissant ainsi entrevoir une « production industrielle » des crevettes. Depuis, la pénéculture a connu un essor rapide, se développant dans les pays asiatiques (Japon, Chine et Taiwan notamment) puis dans le reste du monde, en particulier en Amérique Latine. Son principal intérêt est de s'affranchir des aléas de la pêche et de l'appauvrissement progressif des ressources naturelles.

1.1.1.2) Production mondiale et répartition

Figure 1 : Production mondiale totale de crevettes

La production mondiale totale (pêche côtière et aquaculture) est passée de 12 000 tonnes en 1975 à 174 000 tonnes en 1985 puis à 660 000 tonnes en 1997 (FAO et SNI 1997) et concerne aujourd'hui plus de cinquante pays.

Figure 2 : Production de crevettes dans les principaux pays producteurs

L'Asie assure 70% de cette production totale avec 462 000 t/an sur 1 068 780 ha. Cela représente un rendement de 0.432 t/ha sur 241 270 fermes et 4 577 écloséries.

La production sur le continent américain est de 198 000 tonnes, soit 30% de la production mondiale, sur 238 600 ha, soit un rendement de 0.831 t/ha. Cela concerne 2 390 fermes et 455 écloséries. Le principal pays producteur est l'Equateur, avec une production de 128 000 tonnes dont 95% est produite par l'aquaculture.

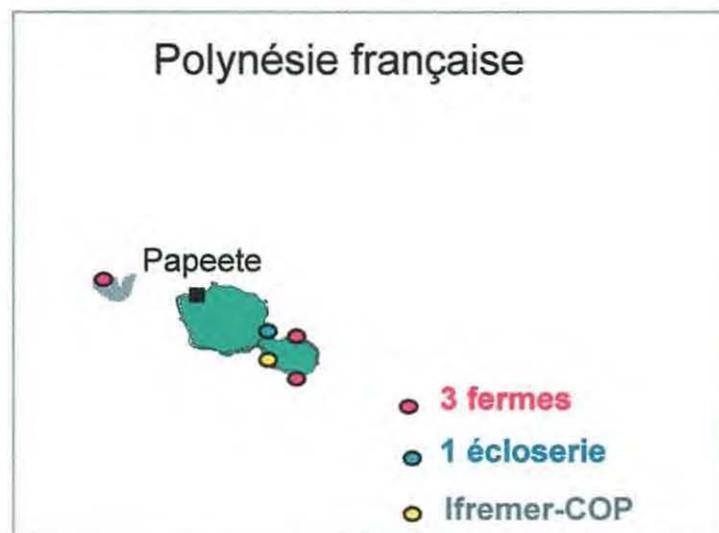
La grande différence entre les principales régions productrices réside dans le nombre de fermes d'élevage et des écloséries, ce qui montre le poids social de cette activité économique en Asie.

Figure 3 : Les principales espèces élevées et leurs aires de répartition

Nom scientifique	Nom commun	Zones productrices
<i>Penaeus monodon</i>	Black Tiger Shrimp	Asie
<i>Litopenaeus.vannamei</i>	Western White Shrimp	Amérique du Sud et Centrale
<i>P.chinensis</i>	Chinese White Shrimp	Asie
<i>L.stylirostris</i>	Western Blue Shrimp	Amérique du Sud et Centrale, Tahiti, Nouvelle-Calédonie
<i>P.indicus</i>	India White Shrimp	Inde, Indonésie, Vietnam
<i>P.merguensis</i>	Banana Prawn	Asie
<i>P.japonicus</i>	Japanese kuruma Shrimp	Japon, Chine et Australie

Source: S.N.I, 1997

Figure 4 : La crevetticulture en Polynésie française



Même si la pénéculture a connu un essor ces deux dernières décennies, 78% de la production totale de crevettes provient des pêches pratiquées sur les marges continentales, essentiellement dans le golfe du Mexique, de la Mer de Chine, dans l'Océan indien et également sur les côtes australiennes (SNI 1997). Cela représente 2.3 millions de tonnes commercialisées en 1998.

1.1.1.3) Le marché de la crevette

Les crevettes sont commercialisées principalement aux Etats-Unis (65% de la production mondiale).

En revanche, l'Europe occidentale (France, Italie, Espagne), est devenue un marché captif, avec 30% de la commercialisation (SNI 1997).

1.1.1.4) Principales espèces exploitées

La production de crevettes en zone tropicale concerne essentiellement les genres *Penaeus* ou *Litopenaeus*. Actuellement 80 espèces sélectionnées sont exploitées parmi 318 répertoriées. Deux espèces, *Litopenaeus vannamei* et *Penaeus monodon* assurent plus de la moitié de la production aquacole mondiale.

Figure 3 : Les principales espèces élevées et leurs aires de répartition

1.1.2/ La production pénécicole dans deux Territoires d'Outre-Mer

1.1.2.1) La Polynésie Française

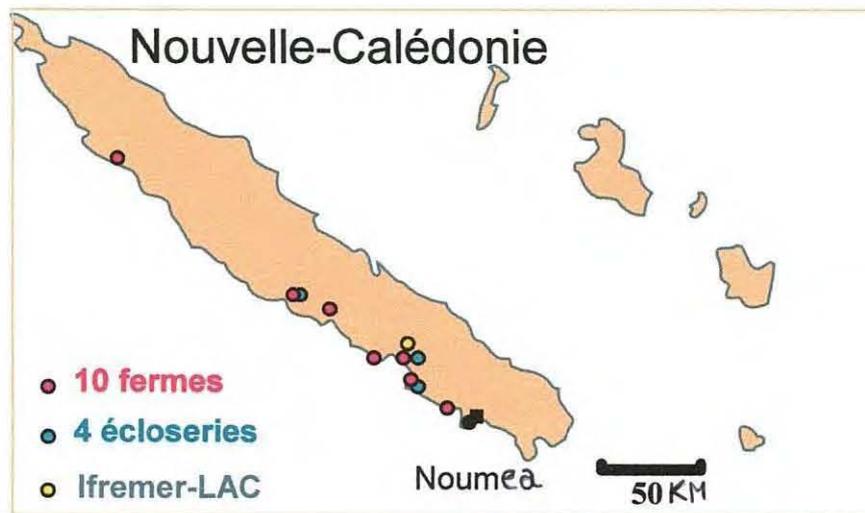
Chevrettes (crevettes d'eau douce) et crevettes sont élevées sur les îles de Tahiti et de Moorea depuis 1980 et 1985 respectivement.

Figure 4 : La crevetticulture en Polynésie Française

Sur ces deux îles, seules trois fermes pratiquent la pénéculture : Sopomer, Queinnec et Aquapac. En Polynésie, le peu d'espace disponible sur le bord de mer, ainsi que le prix élevé des terrains a conduit les aquaculteurs à développer des techniques d'élevage semi-intensives avec un rendement moyen d'environ 5 t/ha. La production annuelle globale oscille ainsi entre 50 et 60 tonnes.

L'Ecloserie Territoriale de Taravao produit les post-larves d'espèces *L. vannamei* et majoritairement *L. stylirostris*, nécessaires aux élevages.

Figure 5 : La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie



Confrontée à un coût de production élevée, la crevetticulture connaît des difficultés à se développer en Polynésie, malgré une forte demande. Ainsi la consommation est estimée à 250 tonnes (IFREMER, 1997) alors que la production de ce T.O.M ne couvre qu'un quart des besoins.

1.1.2.2) La Nouvelle-Calédonie

Parmi l'ensemble des T.O.M, la Nouvelle-Calédonie présente de nombreux atouts favorables au développement d'une aquaculture de crevettes :

- Une température de l'eau de mer élevée pour permettre une croissance rapide et continue,
- Une eau de bonne qualité et assez riche,
- Un fort potentiel de commercialisation sur les marchés déjà existants (France, Japon, Australie, Tahiti et marché local néo-calédonien),
- De nombreux sites exploitables,
- Un statut zoo-sanitaire enviable de part l'absence de virus majeurs sévissant en pénéculture responsables de la maladie des points blancs (WSSV), de la maladie de la tête jaune (YHV) et du syndrome de Taura (TSV) notamment.

Avec plus de 1 800 tonnes de productions annuelles de crevettes, ce territoire parvient à atteindre un niveau de production supérieur à celui des Etats-Unis (1 200 t/an) et permet ainsi à la France d'être le premier producteur européen. Cela s'explique par le développement, depuis les années 80, d'une crevetticulture à échelle industrielle basée sur le contrôle de la reproduction en captivité (plus de 30 générations aujourd'hui) d'une espèce, *L. stylirostris*, dont une souche est aujourd'hui résistante au virus responsable de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (IHHNV). La crevetticulture représente la seconde activité économique de Nouvelle-Calédonie après l'exploitation du nickel.

Figure 5 : La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

Le nombre de fermes de grossissement est de 11 et elles sont toutes implantées sur la côte ouest de l'île où existent de vastes zones planes et aménageables. L'objectif de production visé pour 2020 est de 5000 t/an.

Cette filière crevette peut se résumer : un chiffre d'affaires supérieur à 70 millions de francs français (en 1998), 70% des ventes à l'exportation et environ 500 emplois directs ou induits.

1.2/ Les maladies de crevettes

1.2.1/ Rappel des pathologies majeures

L'intensification des pratiques d'élevage, qui se traduit notamment par l'utilisation de fortes densités en animaux et une fragilisation de l'équilibre existant naturellement entre l'espèce de crevette élevée et les agents pathogènes en présence, exacerbe le développement et la transmission de nombreuses pathologies de nature infectieuse, qu'elles soient virales ou bactériennes (Lightner, 1983). Dans un grand nombre de cas, c'est l'intensification des pratiques d'élevage qui a permis de révéler l'existence de pathogènes jusqu'alors inconnus.

D'autre part, l'augmentation des transferts de crevettes vivantes ou mortes (congelées), avec par exemple le commerce de larves pêchées dans les estuaires ou provenant d'écloseries, a contribué à l'introduction de pathogènes dans des zones initialement indemnes et à leur dissémination. En effet bon nombre de pathogènes (virus, bactéries) conservent leur pouvoir infectieux même après congélation.

De nombreux pathogènes associés à des épisodes de mortalité sont actuellement décrits dans la littérature. Il s'agit de virus, de bactéries ou de parasites, protozoaires ou champignons. Cependant par l'ampleur des épidémies rencontrées, le nombre important d'espèces de crevettes sensibles, leur vaste aire de distribution et l'impact économique des pertes engendrées, les pathologies les plus préoccupantes aujourd'hui en crevetticulture concernent essentiellement les infections dues à des virus. A titre indicatif, on citera le virus responsable du syndrome de Taura (TSV) qui est présent dans un grand nombre de pays du continent américain ainsi qu'à Taiwan et est préjudiciable à la santé des élevages de *L. vannamei* principalement; celui responsable de la maladie de la tête jaune (YHD) chez l'espèce *P monodon* notamment et sévissant en Asie du Sud-Est, enfin le virus responsable de la maladie des points blancs (WSSV) répandu dans toute l'Asie mais également dans de nombreux pays du continent américain et pour lequel de nombreuses espèces de crevettes se révèlent particulièrement sensibles à l'infection (Lightner, 1996)

Les bactéries appartenant à la famille des vibrionacées constituent de loin le groupe bactérien le plus préjudiciable à la santé des élevages de crevettes. Un nombre important d'espèces de vibrions au pouvoir pathogène révélé est aujourd'hui connu tels : *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida*... Ces espèces sont trouvées

étroitement associées à des épisodes de mortalité rencontrés en élevage larvaire ou plus rarement en phase de grossissement des crevettes (stades juvéniles à adultes). Selon les espèces et souches considérées, les *Vibrio* sont décrits soit comme des pathogènes opportunistes n'exprimant leur pouvoir pathogène que secondairement à la faveur de la dégradation de la qualité du milieu et/ou d'un affaiblissement immunitaire de l'animal, soit comme des pathogènes vrais, véritables agents causant la maladie.

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques, océaniques ou non. Le genre *Vibrio* appartient à la famille des Vibrionacées, un des plus importants groupes bactériens rencontré dans l'environnement marin. Bâtonnets droits ou incurvés, ils ont une taille comprise entre 0.5 et 0.8 μm de largeur et 1.4 à 2.6 μm de longueur. Les *Vibrio* sont Gram -, le plus fréquemment mobiles et oxydase +, aérobies anaérobies facultatifs et chimioorganotrophes. Plusieurs espèces sont pathogènes pour les vertébrés et invertébrés marins mais également pour l'homme, la plus connue étant *V. cholerae*, l'agent du choléra.

Le nombre d'espèces décrites, appartenant aux Vibrionacées et plus particulièrement au genre *Vibrio*, a augmenté rapidement. Il est ainsi passé de 5 en 1974 à 20 en 1984 et se chiffrait en 1993 à plus de 34 espèces (Kita-Tsukamoto, 1993).

En pénéculture, les premières descriptions d'infections dues à des *Vibrio* remontent à 1971. Sinderman a démontré que les *Vibrio* représentent la principale cause de mortalité dans les élevages de larves de crevettes pénéides. La pathogénicité d'un grand nombre de représentants du genre a été étudié par infection expérimentale (Lightner et Lewis, 1975), et cela parallèlement au démarrage de l'« industrialisation » de la pénéculture.

Le problème d'identification de l'infection à *Vibrio* réside dans l'absence de signes cliniques spécifiques (pathognomoniques), à de rares exceptions près. En effet dans le cas de l'infection des crevettes par *V.harveyi* les épisodes de mortalité coïncident fréquemment avec l'apparition d'animaux bio luminescents. Cette bioluminescence est conférée à l'hôte par le pathogène lui-même.

1.2.2/ Le syndrome 93

➤ L'état des lieux :

La Nouvelle-Calédonie présente un climat tropical océanique, avec une saison chaude s'étalant de novembre à avril. A partir de 1993, des épisodes de mortalité anormale sont observés durant la saison froide dans les bassins de grossissement des crevettes. L'étiologie de la maladie n'étant pas identifiée à cette époque, ils sont désignés sous le

vocabulaire de syndrome 93. Ces épisodes de mortalité s'expriment sous la forme de brèves flambées épizootiques survenant principalement lors de variations brutales de la température de l'eau des bassins d'élevage rencontrées aux intersaisons (de mai à juin et d'octobre à novembre). Il apparaît par la suite que le syndrome 93 revêt un caractère saisonnier. Les divers travaux de recherche entrepris depuis sur l'étiologie de la maladie ont permis l'isolement et l'identification de bactéries du genre *Vibrio* (Costa *et al.*, 1998) ainsi que la mise en évidence du rôle majeur de *Vibrio penaeicida* dans la pathogénie du syndrome 93 (Le Groumellec *et al.*, 1996 ; Goarant *et al.*, 1999 ; Saulnier *et al.*, 2000). Ainsi le syndrome 93 est aujourd'hui considéré comme une vibriose causée par *V. penaeicida* dont la survenue et l'incidence dépendent grandement des facteurs environnementaux et des pratiques zootechniques.

Les bassins affectés montrent des taux de survie et de production très bas (Costa, 1998 a), ainsi que des indices de conversion alimentaire élevés. Les signes cliniques chez les animaux malades sont :

- Une sensibilité accrue des crevettes à divers stress,
- Une nage désorganisée à la surface ou sur les bords de bassin,
- Des pattes qui prennent une couleur rouge,
- Une opacification des muscles abdominaux prenant une apparence blanchâtre et parfois des lésions mélanisées sur la cuticule, en particulier au niveau des branchies,
- Une vitesse de coagulation de l'hémolymphe ralentie par comparaison à celle obtenue chez des animaux non malades (Mermoud *et al.*, 2000),
- Des lésions des organes lymphoïdes et hématopoïétiques caractérisées par la présence de corpuscules basophiles intracellulaires de taille variable, révélées en histologie après coloration à l'éosine hématoxyline. Ces lésions sont dans quelques cas seulement associées à la présence de nodules hémocytaires,
- Une septicémie.

Ces quelques symptômes sont des indicateurs de la survenue d'une pathologie mais ne signent aucunement de manière spécifique une pathogénie due au syndrome 93.

➤ Les pistes envisagées et l'identification du pathogène présumé

Les corps basophiles intracellulaires retrouvés dans les organes lymphoïdes et hématopoïétiques furent premièrement évocateurs de phénomènes toxiques ou d'une pathologie virale. Cette hypothèse virale fut envisagée par Costa, (1998 b), mais demeure

aujourd'hui non-vérifiée en dépit de tentatives de purification de particules virales. Costa *et al.*, (1998 a) ont toutefois mis en évidence chez des crevettes moribondes prélevées dans un contexte pathologique de syndrome 93 et présentant pour la plupart une septicémie, la présence quasi constante d'un type bactérien dominant appartenant au genre *Vibrio* à partir d'analyses bactériologiques réalisées sur des prélèvements d'hémolymphe.

Des études de typages biochimique et moléculaire (ribotypage et réalisation d'hybridation ADN-ADN) réalisées sur ces souches ont permis d'établir avec certitude leur appartenance à l'espèce *V. penaeicida* (Costa *et al.*, 1998 a).

➤ Evaluation du pouvoir pathogène de *V. penaeicida*

Le pouvoir pathogène de quelques-unes des souches *V. penaeicida* isolées en Nouvelle-Calédonie, dont l'« AM101 » utilisée lors de ce stage, a été apprécié au C.O.P en infectant expérimentalement des crevettes *L. stylirostris* juvéniles selon différents modes d'infection: per os, par balnéation des crevettes dans une suspension bactérienne ou par injection intramusculaire d'une suspension bactérienne. Quel que soit le mode d'infection utilisé, les souches *V. penaeicida* d'origine néo-calédonienne sont douées d'un fort pouvoir pathogène puisque les doses infectantes utilisées sont parmi les plus basses connues à ce jour chez des *Vibrio* pathogènes de crevettes (Saulnier *et al.*, 2000 b). Les mortalités obtenues chez des animaux infectés selon un mode d'infection non invasif, par balnéation des crevettes pendant deux heures dans une suspension bactérienne de concentration connue, sont fortement doses dépendantes. Concernant la souche AM101, une dose létale (DL) 50% de $1.3 \cdot 10^4$ CFU/ml a pu être établie à 5 jours post-infection au laboratoire du C.O.P. Classiquement le pic de mortalité se situe au 2^{ème} jour post-infection et les mortalités cumulées atteignent un plateau dès le 4^{ème} jour post-infection. Les mortalités enregistrées sur des crevettes infectées par intramusculaire sont beaucoup plus rapides car elles court-circuitent probablement les premières lignes de défense des crevettes. Elles s'expriment en moins de 48 heures et la DL50 estimée est beaucoup plus faible (<10 CFU/crevette de 10-15g) que celle observée en utilisant le mode d'infection par balnéation. Le pic de mortalité est d'autant plus précoce que la dose infectante est élevée. A des doses supérieures à 500 CFU, les mortalités sont totales et sont observées dans les 24 premières heures post-infection (Saulnier *et al.*, 2000 a).

Annexe 1 : Cycle de croissance des crevettes pénéides

Les crevettes, du stade juvénile à celui d'adulte, appartenant aux espèces *L. stylirostris*, *L. vannamei* et *P. indicus* élevées au C.O.P (rapport d'activité 2000 du Laboratoire), apparaissent extrêmement sensibles à ce pathogène en condition d'infection expérimentale.

A l'opposé Goarant et *al.*, (1998) ont pu montrer que des post-larves de crevettes *L. stylirostris* étaient résistantes à l'infection expérimentale par ce pathogène. Plus récemment il a pu être montré au C.O.P que les larves Zoé 2 à Zoé 3 étaient sensibles à ce pathogène en utilisant un mode d'infection par balnéation. Le fait que l'on ne déplore en Nouvelle-Calédonie aucun épisode de mortalité attribuable à une infection par *V. penaeicida* en condition d'écloserie peut s'expliquer par l'usage systématique à titre préventif d'un antibiotique, l'érythromycine. En effet, la croissance de la souche AM101 notamment se révèle être totalement inhibée, *in vitro*, par cet antibiotique.

Parmi les facteurs de virulence actuellement recherchés, il faut noter la mise en évidence par Goarant et *al.*,(2000), d'une activité exotoxinique dans les surnageants de culture de la souche AM101 qui semble être régulée par la température. En effet, cette activité s'exprime à une température d'incubation des bactéries de 20°C et non à 30°C. Cette ou ces exotoxines sont thermolabiles et de nature protéique (Saulnier et *al.*, en préparation), leur purification en vue d'une caractérisation moléculaire est en cours dans le cadre d'une collaboration.

De ces différentes expérimentations, il ressort donc que la sensibilité des crevettes aux souches *V. penaeicida* de Nouvelle-Calédonie dépend fortement du mode d'infection, de la dose infectieuse utilisée, du stade de développement des crevettes mais non de l'espèce de crevette considérée (absence apparente de spécificité d'hôte). Parmi les facteurs de virulence suspectés autres que la dose infectante figurent l'existence de toxines sécrétées *in vitro* par cette espèce de *Vibrio*.

1.3/ La pathogénie des *Vibrio* de crevettes

La pathogénie des *Vibrio* demeure mal connue aujourd'hui car celle ci a été peu étudiée chez les crevettes pénéides. La principale raison semble être que le dogme actuel est de les considérer plus comme des pathogènes opportunistes que comme des pathogènes vrais. Deux arguments sont fréquemment avancés : Présence d'une flore bactérienne d'apparence normale chez des crevettes en pleine santé, notamment dans leur hémolymphe, alors même que certaines espèces bactériennes réputées pathogènes peuvent y être rencontrées, difficulté à extrapoler les résultats de pathogénicité des souches obtenues en condition d'infection expérimentale au contexte pathologique prévalant en condition d'élevage.

La capacité des microorganismes à développer une maladie est déterminée par un certain nombre de facteurs de virulence tels que les adhésines et les toxines. Chez les vibrions de crevettes, des enzymes ou des toxines ont pu être identifiées et quelquefois caractérisées (Lee et *al.*, 1997 ; Liu et Lee 1999 ; Goarant et *al.*, 2000, Sudheesh et Xu,

2001) qui contribuent probablement à l'envahissement de certains tissus de l'hôte et permettent secondairement au pathogène de s'y multiplier et d'envahir les autres tissus de l'hôte. La cinétique d'infection d'un vibron, *Vibrio penaeicida*, génotypiquement différent de celui rencontré en Nouvelle-Calédonie et considéré au Japon comme le principal agent responsable de mortalité en crevetticulture, a été étudiée par De la Peña et al., (1995) chez des crevettes *P. japonicus* infectées par voie orale. Des techniques immuno-histologiques et de dénombrement bactérien dans les principaux organes ont permis de localiser le pathogène aux différents temps post-infection. L'étude de la cinétique d'infection révèle cinq stades successifs : une phase d'installation du pathogène dans l'estomac où le pathogène se multiplie probablement et dans l'hémolymph observée durant les trois premières heures post-infection, une phase de colonisation du pathogène détecté dans plusieurs organes (l'hépatopancréas, l'organe lymphoïde, le muscle et l'intestin) dans les 3 à 8 heures post-infection, une phase de régression du pathogène dans tous les organes précédemment mentionnés entre la 8^{ème} et 12^{ème} heure post-infection, une phase de re-colonisation et de multiplication secondaire du pathogène dans tous ces organes exceptés l'estomac entre la 12^{ème} et 24^{ème} heure post-infection, enfin à partir de 36 heures post-infection la mise en évidence d'une infection systémique avec l'apparition notamment du pathogène dans les filaments secondaires des branchies et l'apparition de lésions de nécrose des tubules de l'hépatopancréas. Plus récemment, un travail similaire a été effectué à partir du modèle d'infection par balnéation développé au laboratoire en utilisant le couple *V. penaeicida*, souche AM101 originaire de Nouvelle-Calédonie, et des crevettes juvéniles *L. stylirostris*. Une sonde ARN spécifique de l'ARNr 16S de cette bactérie a permis de rechercher les tissus cibles du pathogène par des techniques d'hybridation *in situ* sur coupes histologiques de crevettes infectées (Fisch, 2001 ; Munoz et al., en prep). Deux temps post-infections ont été considérés, l'un correspondant au pic de mortalité (22 heures post-infection), l'autre à la fin des mortalités observées au cours cette expérimentation (48 heures post-infection). Quel que soit le temps post-infection considéré le pathogène est détecté quasi exclusivement dans les branchies et une réaction immunitaire de formation de nodules hémocytaires est observée à 48 heures post-infection. Ces résultats suggèrent que les branchies constituent la voie d'entrée préférentielle du pathogène en même temps que l'organe principal permettant son élimination via la formation de nodules hémocytaires (Muñoz et al., en prep.).

La pathogénèse étant la résultante d'interactions entre le système immunitaire de l'hôte et les facteurs de virulence exprimés par le pathogène, une meilleure connaissance des mécanismes de défense des crevettes pénaïdes devrait permettre de mieux comprendre la pathogénèse de certaines vibrioses. L'étude des réactions de défense développées par les crustacés en réponse à une bio agression révèle l'absence d'un système de mémoire

immunitaire et le rôle central qu'occupe les hémocytes de la circulation sanguine dans les réactions de défenses innées. Chez les crevettes en particulier, les hémocytes interviennent dans la phagocytose, la coagulation ; la formation de mélanine, molécule résultant de l'activation du système prophénoloxydase et exerçant un rôle de séquestration des microorganismes ; la formation de nodules ou de figures d'encapsulation « piégeant » les microorganismes et formés d'amas hémocytaires ; la libération de peptides antimicrobiens tels les *pénaeidines* (Destoumieux et *al.*, 1997) ainsi que celle de molécules cytotoxiques (lysozyme,...) et d'agglutinines.

Une diminution de la concentration en hémocytes circulants présents dans l'hémolymphe a été observée à plusieurs reprises au laboratoire dans le modèle d'infection par balnéation de juvéniles *L. stylirostris* avec des bactéries *V. penaeicida* aussi bien tuées que vivantes. Cette chute du nombre d'hémocytes circulants, intervenant généralement dans les 24 premières heures post-challenge a également été observée chez d'autres crustacés en réponse à une infection bactérienne (Smith et Ratcliffe, 1980 ; Martin et *al.*, 1993). Celle ci correspond à une migration des hémocytes aux sites d'infection (Muñoz et *al.*, 2002) permettant ainsi à ces cellules d'exercer localement leurs fonctions antimicrobiennes. Le retour à des concentrations hémocytaires normales, voire plus élevées que la normale (48 à 72 heures post-challenge), semble être lié à l'existence d'un phénomène de prolifération hémocytaire intervenant au niveau des organes hématopoïétiques de la crevette suivi d'une libération des hémocytes néoformés dans la circulation sanguine et d'une migration secondaire de ces hémocytes dans tous les tissus (Muñoz et *al.*, 2002). Un tel phénomène a également été décrit chez des crevettes *L. stylirostris* infectées expérimentalement, par balnéation, avec *V. penaeicida* (Muñoz et *al.*, en prép.). L'examen par l'histologie de la réponse hémocytaire développée par des crevettes ayant survécu à une DL 60-65% révèle un retour à la normale du nombre et de la distribution tissulaire des hémocytes exprimant les *pénaeidines* (à un niveau transcriptionnel ou traductionnel) ainsi que l'existence de réactions hémocytaires (formation de nodules) dans les branchies qui constitueraient l'organe d'élimination privilégié de ce *Vibrio*. Ainsi les mêmes auteurs émettent l'hypothèse que la capacité des crevettes à maîtriser cette infection bactérienne est étroitement liée à l'intensité et/ou à la rapidité de déclenchement de l'hématopoïèse. D'autres travaux ont déjà permis de mettre en évidence le rôle des hémocytes dans l'évolution de la pathogenèse des vibrioses de crustacés. La capacité de résistance de l'écrevisse *Pacifastacus leniusculus* à l'infection fongique par *Aphanomyces astaci* ou celle de la crevettes *L. stylirostris* à l'infection par *V. penaeicida* est influencée par le nombre d'hémocytes circulants (Persson et *al.*, 1987 et Le Moullac et *al.*, 1997, respectivement).

2- ETUDE EXPERIMENTALE

Introduction

Afin d'étudier la pathogénie induite par *Vibrio penaeicida*, nous avons dû dans une première étape développer des outils de détection du pathogène. Une sonde nucléique à ADN marquée a été produite puis évaluée en réalisant différents tests. Nous avons voulu dans un deuxième temps chercher à localiser le pathogène dans les différents tissus de crevettes *L. stylirostris* infectées expérimentalement. Des coupes histologiques des principaux organes de crevette prélevés à différents temps post-infection ont été réalisées afin de permettre la réalisation de tests d'hybridation *in situ* à l'aide des sondes produites. Nous nous sommes également intéressés à suivre au cours de cette infection expérimentale l'apparition et l'évolution de certains signes cliniques de la maladie afin de les comparer à ceux classiquement décrits dans un contexte de survenue de Syndrome 93 en Nouvelle-Calédonie.

2-1 Matériel et méthodes

2-1-1 L' infection expérimentale

2-1-1-1 Les animaux

Des crevettes d'un poids moyen de 10g appartenant à l'espèce *Litopenaeus stylirostris* ont été pêchées à l'épervier dans les bassins d'élevage du C.O.P. Après quelques jours d'acclimatation dans des bacs à fond dépourvu de substrat, les crevettes sont triées selon leur stade de mue par observation des uropodes sous une loupe binoculaire. Les crevettes sont ensuite transférées immédiatement dans la salle d'infection afin d'être accueillies dans des bacs cylindro-coniques pourvus d'un fond plat amovible percé en de multiples points afin de laisser passer les fèces. Ces bacs ont été bien sur remplis au préalable avec une eau mer qui est filtrée à 3µm et est aérée au moyen de bulleur. Le lendemain de leur transfert les animaux subissent une infection expérimentale. Pendant toute la durée du suivi des animaux (5 jours) les crevettes sont nourries *ad-libitum* avec de l'aliment extrudé pour crevettes, en disposant une petite mangeoire au fond des bacs et en contrôlant la consommation de l'aliment par les crevettes.

2-1-1-2 Les conditions de réalisation de l'infection :

2-1-1-2-1 Culture du pathogène

La souche bactérienne utilisée au cours de ce stage est la souche AM101 appartenant à *Vibrio penaeicida*. Celle-ci est conservée à -80°C dans un milieu nutritif 2216E supplémenté avec du glycérol (15% final). Deux à trois jours avant l'infection, la souche est étalée à l'aide d'une anse stérile à usage unique sur une boîte de Petri contenant du Marine agar 2216 E (Difco) qui est ensuite incubée à 27°C pendant 24h. Après vérification macroscopique de la pureté de la souche, 3 colonies servent à ensemercer un tube stérile contenant un milieu nutritif de Zobell (de formule équivalente à celle du Marine agar 2216 E, disponible commercialement, mais ne contenant pas d'agar). Les bactéries sont ensuite incubées 16 heures environ à $27-30^{\circ}\text{C}$. Le tube est incliné à 45° dans l'étuve et est fortement agité durant toute la durée de l'incubation (Saulnier *et al.*, 2000 a).

Des études précédentes ont montré que la suspension bactérienne ainsi obtenue atteignait une concentration de l'ordre de 2.10^9 mL^{-1} . Cette valeur théorique sert de référence pour le calcul de la concentration bactérienne souhaitée dans l'inoculum utilisé lors de l'infection expérimentale des crevettes. Cependant une vérification a posteriori de la concentration bactérienne réelle présente dans l'inoculum est réalisée par étalement successif de dilutions au dixième de l'inoculum sur boîtes de Petri remplies de Marine agar 2216 E.

2-1-1-2-2 Infection des animaux

L'infection expérimentale est réalisée en zone contrôlée avec traitement des effluents de sortie au chlore car *V. penaeicida* n'a jamais été détecté à Tahiti.

La méthode d'infection retenue pour le suivi des mortalités et la réalisation de la majeure partie des prélèvements destinés à l'histologie consiste en une baignade des crevettes, durant un laps de temps donné, dans de l'eau de mer filtrée contenant la bactérie que nous avons au préalable ajoutée. En effet ce mode d'infection semble le plus proche des conditions d'infection naturelle rencontrées dans les fermes de Nouvelle-Calédonie. 15 à 25 crevettes sont disposées dans des baignoires d'eau de mer remplies avec 10L d'eau de mer filtrée et munies de bulleur. Chacune des baignoires reçoit alors 10 mL d'une dilution au $1/500^{\text{ème}}$ du bouillon bactérien ce qui permet d'atteindre une concentration bactérienne de 4×10^4 CFU/ml théoriques, légèrement supérieure à la DL50 estimée (Saulnier *et al.*, 2000). Le

contact crevette-pathogène est maintenu pendant 2 heures puis les animaux sont rincés abondamment avec de l'eau de mer filtrée afin de ne pas contaminer les bacs d'élevage où ils sont ensuite transférés. Deux lots de crevettes sont constitués :

Le premier lot est destiné au suivi régulier des mortalités afin de vérifier la virulence du pathogène et permettre une étude comparée de la sensibilité des crevettes au pathogène selon leur stade de mue initial. Les crevettes sont placées dans trois bacs cylindro-coniques remplis avec 100 d'eau de mer filtrée à raison de 20 à 25 crevettes par bac : Un bac d'animaux sélectionnés en stade de pré-mue et infectés (n=25), un bac d'animaux sélectionnés en stade d'inter-mue et infectés (n=25), un bac d'animaux témoins non sélectionnés selon leur stade de mue, manipulés de manière équivalente à ceux des lots infectés, mais n'ayant pas été mis en contact avec le pathogène durant la balnéation (n=20). Les animaux morts observés au cours du suivi sont enlevés le plus rapidement possible du bac afin de pas polluer l'eau des bacs.

Le deuxième lot de crevettes est destiné aux prélèvements de tissus. A l'issue de la période de balnéation, les crevettes sont placées dans deux bacs de volume beaucoup plus important que les précédents, l'un contient des crevettes en pré-mue (n=15), l'autre des crevettes en post-mue (n=34).

Annexe 2 : La salle d'infection

Afin de pouvoir disposer d'un contrôle positif lors de l'utilisation des techniques d'hybridation *in situ*, un troisième lot de dix crevettes a été infecté en intramusculaire. Environ 200 µl d'une culture bactérienne pure de la souche AM101 ont été injectés, à l'aide d'une seringue, dans le muscle du quatrième segment abdominal de chaque crevette.

2-1-2 Les prélèvements et traitements de tissus

2-1-2-1 Fréquence des prélèvements

Les crevettes du deuxième lot destiné aux prélèvements de tissus sont prélevées à différents temps : T0 (fin de la période de balnéation), T2 (2h post-infection), T12, T24, T48 et enfin T72. Les animaux d'apparence malades sont sacrifiés en priorité. Le nombre d'animaux prélevés à chacun des temps post-infection est le suivant : 8 crevettes à T2 et T12, 5 crevettes de T24 à T72, 2 crevettes non infectés de T0 à T72

Concernant le troisième lot d'animaux infectés par intramusculaires seule une crevette est prélevé à T2 et une autre à T4 car à 4 heures post-infection les 8 autres crevettes sont déjà mortes.

2-1-2-2 Traitements des tissus pour l'observation des signes cliniques

➤ **L'hémolymphe**

Environ 200 μ L d'hémolymphe sont ponctionnés au niveau du sinus ventral du céphalothorax à l'aide d'une seringue de 1 mL puis versés dans 4 à 5 puits d'une micro plaque stérile pour culture cellulaire afin de déterminer le nombre d'hémocytes circulants totaux, le temps de coagulation de l'hémolymphe et l'importance de la flore bactérienne hétérotrophe totale présente dans l'hémolymphe. Le point d'injection a été préalablement désinfecté à l'aide d'une pissette remplie d'alcool.

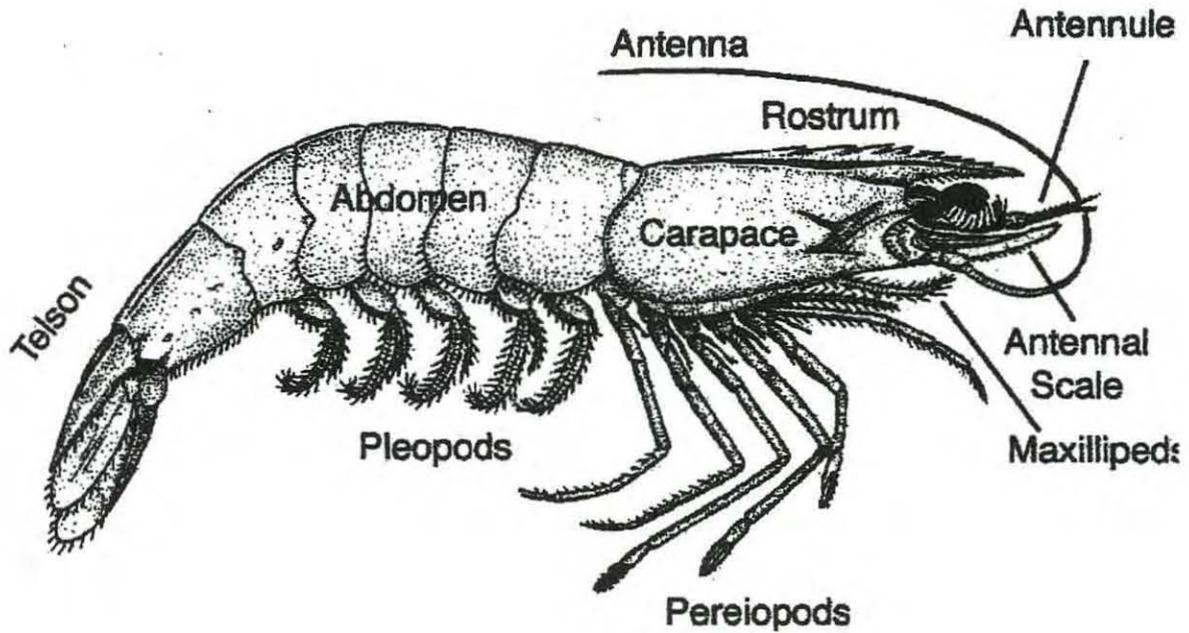
20 μ L d'hémolymphe sont immédiatement repris à l'aide d'une micro pipette munie d'un cône pour y être mélangés à 80 μ L d'une solution (formaldéhyde à 4% préparé en solution anticoagulante d'Alsever) permettant la fixation des hémocytes et leur conservation prolongée à 4°C. Les hémocytes sont ensuite dénombrés en utilisant une cellule de Malassez placée sur un microscope. Les résultats sont exprimés en nombre d'hémocytes par millilitre d'hémolymphe et traités statistiquement à l'aide du logiciel StatView.

50 μ L d'hémolymphe sont également immédiatement étalés sur boîte de Petri contenant du Marine agar 2216 E à l'aide d'une pipette Pasteur façonné en forme de râteau. Les boîtes sont incubées 48h à 27°C et les colonies bactériennes dénombrées. Du fait d'une grande variabilité individuelle, les résultats sont exprimés selon le degré d'importance de la bactériémie observée. Une bactériémie faible correspond à des valeurs de dénombrement de la flore hétérotrophe totale inférieures à 500 CFU/ml d'hémolymphe, une bactériémie intermédiaire à des valeurs comprises entre 500 CFU/ml et 5000 CFU/ml, enfin une bactériémie élevée révèle des valeurs > à 5000 CFU/ml.

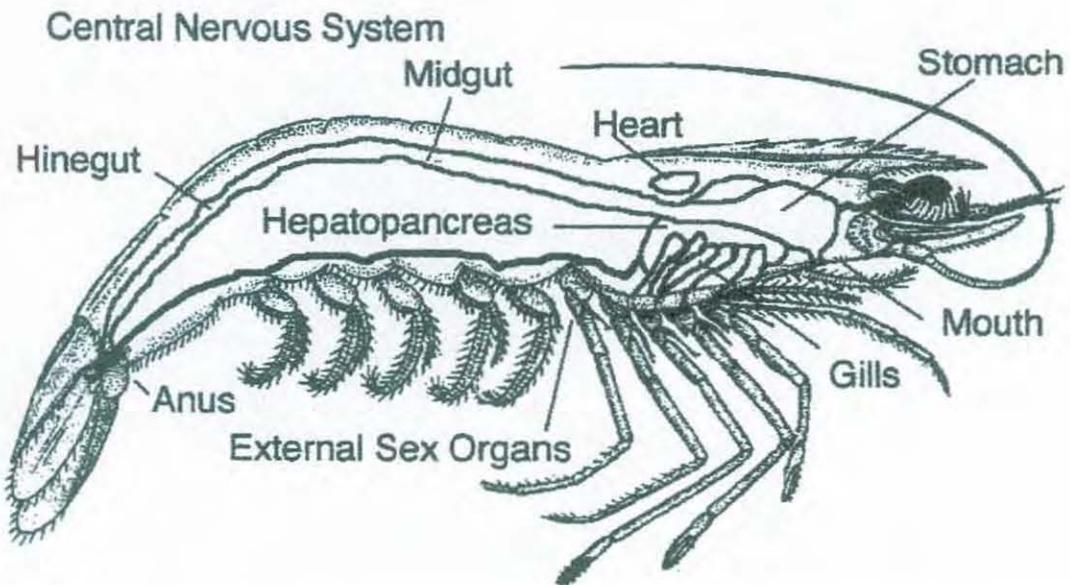
Le reste de l'hémolymphe, soit environ 130 μ L contenus dans le reste des puits de la micro plaque, sert à déterminer le temps de coagulation de l'hémolymphe. A des temps réguliers, un cône stérile 10-200 μ l monté sur une micro pipette est immergé dans le prélèvement. Une coagulation est notée lorsqu'il n'est plus possible d'aspirer le prélèvement d'hémolymphe, une coagulation se traduisant par la formation d'un gel. Un même prélèvement d'hémolymphe a été déposé dans différents puits, dans l'hypothèse où le cône pouvait avoir une action d'activation de la coagulation en provoquant la lyse de certains hémocytes et la libération de transglutaminase notamment à l'origine du phénomène (Yeh et

Figure 6 : Anatomie de la crevette pénéide

Anatomie externe



Anatomie interne



al., 1998). Sur les premiers échantillons d'hémolymphe traités, ces essais étaient réalisés toutes les 30 secondes, mais devant l'absence de réaction de coagulation nous avons été amenés à considérablement allonger le temps entre deux essais successifs.

➤ **Les branchies et périopodes**

Figure 6 : Anatomie de la crevette pénéide

Les branchies et les périopodes de chaque animal prélevé ont été examinés macroscopiquement ainsi qu'à la loupe binoculaire après dissection dans l'objectif de révéler d'éventuelles réactions de mélanisation.

2-1-2-3 Traitements des tissus pour l'histologie

Le céphalothorax, quelque pléopodes ainsi qu'une portion des branchies et de l'intestin de chaque animal a est prélevé et immédiatement plongé dans un fixateur permettant de garantir une conservation optimale des ARN cellulaires. Ce fixateur est préparé extemporanément avec 349 mL de formaldéhyde (37%), 407 mL d'éthanol à 95°, 222 mL d'eau DEPC, 22 mL d'hydroxyde d'ammonium (29%), pH 6.0-6.5. Il est nécessaire d'ajouter 9 volumes de fixateur pour 1 volume de tissus, soit 30 mL de fixateur par céphalothorax. Le fixateur est injecté à l'aide d'une seringue dans les organes internes de façon à assurer une fixation optimale. Les tissus sont incubés à 4°C pendant au moins 48h avant d'être déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de degrés croissants. Nous procédons ensuite à plusieurs bains successifs de xylène et de paraffine en fusion (GABE, 1968) puis nous disposons, en les orientant, les différentes pièces dans des moules en inox afin de préparer des blocs permettant la réalisation au microtome de coupes de 5 µm d'épaisseur.

Annexe 3 : Le microtome

Les coupes sont déposées dans un bain d'eau bi-distillée chauffé à 37°C puis sont récupérées sur des lames traitées à la poly-L-lysine. Après séchage 2 heures à 60°C, les coupes peuvent être utilisées pour l'hybridation *in situ*.

2-1-3 La préparation d'une sonde ADN de *V. penaeicida*

Un fragment du gène codant l'ARN16S de *V. penaeicida* est amplifié par PCR en utilisant comme ADN matrice le plasmide recombinant pBluescript cloné au Laboratoire (Saulnier et al., 2000). Les amorces VdigF et VdigR s'hybrident au niveau de la séquence 5'

de chacun des brins d'ADN de l'insert. Le marquage de la sonde est effectué en utilisant dans le volume réactionnel pour PCR un mélange de dNTPs où une partie des dTTPS ont été substitués à des dUTPs marqués à la digoxygénine (un stéroïde d'origine végétale) à raison de 19 moles de dTTPs pour une 1 mole de dUTP-Dig. L'amplification par PCR est réalisé dans un volume réactionnel de 50 μ L contenant le plasmide recombinant purifié (environ 50 pg), 10 mM de Tris HCl, pH 9.0, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.1% de Triton x100, 200 μ M de dNTPs (comprenant des dUTPs-Dig), 0.2 μ M de chacune des amorces et 0.2 U de Taq polymerase. Le programme de PCR comprend une étape de dénaturation initiale des ADN à 94°C pendant 1 minute suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'hybridation à 58°C pendant 1 minutes et d'élongation à 72°C. Le programme s'achève par une élongation finale de 1 minute à 72°C et un maintien des tubes à 10°C dans le thermocycleur avant leur congélation.

Annexe 4 : Les thermocycleurs

Cette sonde peut être conservée plusieurs mois à -20°C.

2-1-4 L'hybridation sur membrane

Les échantillons d'ADN à analyser (produits de PCR ou ADN plasmidique) sont mélangés à un tampon de dilution 10X contenant 500 μ g mL⁻¹ d'ADN de sperme de saumon, 100 mM de Tris HCl pH 8 et 10mM d'EDTA de manière à l'obtenir 1X final.

Afin de déterminer la sensibilité de l'insert ARN 16S VP, nous pouvons procéder à des dilutions successives (de 2 en 2) de l'ADN de l'insert dans le même tampon de dilution des ADN afin d'obtenir une gamme étalon.

L'ADN de sperme de saumon et l'ADN cible sont ensuite dénaturé à 95°C pendant 10 minutes, puis les tubes sont immédiatement plongés dans la glace.

1 μ L est ensuite déposé sur une membrane de nylon. La fixation de ceux-ci se fait par crosslinking aux UV à 160 mJ/cm² sur la membrane de papier Whatman encore humide.

La membrane est ensuite rincée brièvement dans de l'eau bi distillée puis séchée sous hotte.

Il s'ensuit l'étape de pré hybridation. La membrane est transférée 3 heures dans le tampon de pré hybridation préchauffé à 42°C constitué de Formamide 50%, de SSC 5X, de sodium-lauroylsarcosine 0.1% w/v, de SDS 0.02% w/v, et de 2% d'agent de saturation (Blocking Reagent, Boehringer).

Afin de réaliser l'hybridation, 5 μ L de la sonde ADN-DIG préalablement dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 minutes sont ajoutés à 10 mL de tampon de pré hybridation. La membrane est incubée une nuit à 40°C.

Une fois l'hybridation terminée, il vient les étapes de lavage. La membrane est rincée 15 minutes à température ambiante sous rotation dans le tampon 1 (2X SSC, 0,1X SDS). Ensuite, la membrane est transférée dans un second tampon de lavage (0,5X SSC, 0,1% SDS) 15 minutes à 37°C.

Finalement, nous procédons à l'immuno-révélation avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline. La membrane est équilibrée 1 minute à température ambiante dans un tampon de lavage (acide maléique 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,5, 0,03% tween 20). Puis elle est saturée 30 minutes à température ambiante dans la solution de blocage (1% w/v de « blocking reagent for nucleic acide hybrid » préparée en tampon acide maléique) contenant l'anticorps anti-DIG dilué au 1/5000^{ème}.

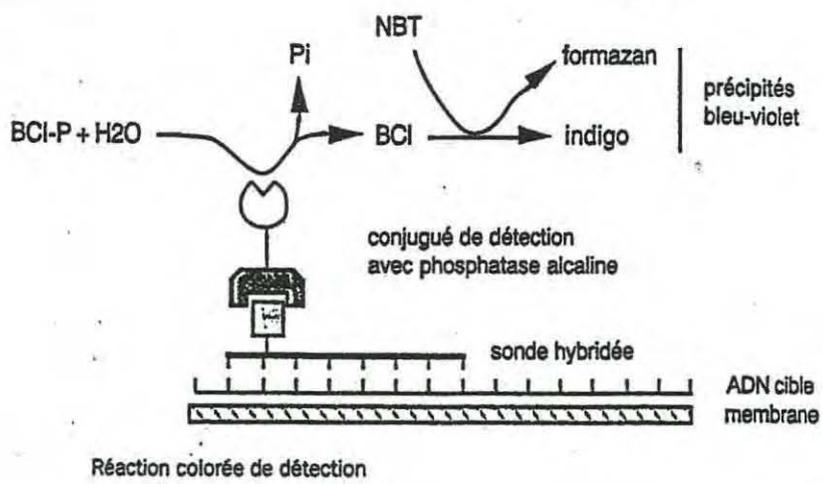
La membrane est ensuite lavée 2 fois 15 minutes avec du tampon de lavage. Puis elle est équilibrée 2 minutes à température ambiante dans un tampon de détection (Tris HCl 10 mM, NaCl 10 mM, pH 9). Les substrats de l'enzyme, NBT et BCIP, sont ensuite ajoutés à hauteur de 90 µL et 70 µL et laissés en contact 12 heures à température ambiante avant que la réaction ne soit stoppée à l'eau courante.

2-1-5 L'hybridation in situ

2-1-5-1 Traitements des tissus et hybridation

Les coupes sont déparaffinées en chauffant les lames à 65°C puis en les plongeant dans un bain de xylène pendant 10 minutes. Les coupes sont ensuite réhydratées en les plongeant pendant 5 minutes dans des bains successifs d'éthanol de degré décroissant : deux bains d'éthanol absolu, deux bains d'éthanol 90%, deux bains d'éthanol 75% et enfin deux bains réalisés en eau ultra pure. Les lames sont séchées puis disposées dans un incubateur à lame préchauffé à 37°C. Afin de rendre la cible tissulaire accessible à la sonde (digestion des protéines associées à l'ADN), un traitement enzymatique des coupes à la protéinase K est effectué, à une température d'incubation de 37°C. La durée de protéolyse, ainsi que la concentration en protéinase K utilisée, doivent être adaptées à la nature du tissu traité afin de trouver un compromis entre l'efficacité de protéolyse et une bonne préservation de la structure des tissus. Des essais préliminaires commentés dans la partie résultat ont donc été entrepris. Après ce traitement les coupes sont post fixées avec du paraformaldéhyde 4% préparé en tampon PBS pendant 5 minutes afin d'améliorer la conservation des tissus et l'adhérence des coupes puis sont rincées dans deux bains d'eau ultra pure pendant 5 minutes avant d'être séchées. Les coupes sont ensuite incubées 15

Figure 7 : Principe du marquage à la digoxigénine



minutes à 65°C dans un mélange contenant du formamide à 95% et du SSC 0.1x afin de dénaturer l'ADN cible. Pendant ce temps nous pré chauffons à 37°C le tampon d'hybridation, conservé au congélateur, composé de SSC 4x, de 50% de formamide, de solution de Denhardt 1X et de 5% (poids/volume) de sulfate de dextran. De même, nous dénaturons pendant 5 minutes et séparément la sonde ADN DIG obtenue par PCR ainsi que l'ADN de sperme de saumon à 10mg/ml que nous refroidissons ensuite sur glace trois minutes, mais pas davantage afin d'éviter que les ADNs ne se renaturent. La sonde et l'ADN de sperme de saumon sont alors immédiatement ajoutés au tampon d'hybridation de façon à obtenir des concentrations finales de 1-2 ng/µl et 0,5 mg/ml, respectivement. Une fois l'ADN cible dénaturé, les lames sont plongées dans un tampon SSC 0,1x à 4°C pendant 5 minutes. Elles sont ensuite sorties du bain puis égouttées. Nous versons alors sur chaque lame 200µl du mélange d'hybridation que nous recouvrons ensuite d'une lamelle spéciale (Sigma) faisant office de chambre d'incubation. Les lames sont incubées une nuit à 37 °C. Les lames sont ensuite lavées dans du tampon SSC en augmentant les conditions de stringence entre chaque bain de façon à séparer les hybrides ADN-sonde ADN mal appariés : SSC 2x pendant 30 minutes à température ambiante, SSC 1x pendant 10 minutes à 37°C, SSC 0.5X pendant 10 minutes à 37°C.

2-1-5-2 Immuno-révélation des hybrides

Figure 7 : Le marquage à la digoxigénine

Les coupes sont équilibrées 20 minutes à température ambiante dans un tampon TBS contenant 50 mM de Tris HCl, 50 mM de NaCl et de pH 7.6. Chaque lame est ensuite incubée à 37°C pendant 1h avec 200 µL de tampon TBS contenant un agent de saturation des sites non spécifiques (0,5% poids/volume de « blocking reagent » Boehringer) ainsi que l'anticorps Fab anti-Dig marqué à la phosphatase alcaline et dilué au 1/2000^{ème}. Les lames sont ensuite lavées dans deux bains successifs de TBS, pendant 5 minutes chacun puis dans un bain contenant un tampon pour la phosphatase alcaline (TPh) constitué de Tris-HCl 100 mM, pH 9, de MgCl₂ 50 mM et de NaCl100mM. 45 µl de NBT (à 75 mg/ml) et 35 µl de BCIP (à 50 mg/ml) sont ajoutés à 10 ml de tampon TPh. Nous versons ensuite 200µl de ce mélange sur chaque coupe puis nous incubons les lames à température ambiante et dans l'obscurité pendant 7h à une nuit. La réaction est stoppée en plongeant les lames dans un bain d'eau bi distillée.

Les coupes sont ensuite lavées dans un bain d'HCl à 1% puis contre colorées en plongeant les lames dans un bain de colorant de Bismarck à 0,5% préparé en eau bi distillée qui colore les noyaux cellulaires en marron-orange. Les coupes sont alors déshydratées par

des bains d'éthanol de degré croissant suivi par un bain de xylène et enfin montées entre lame et lamelles avec de l'Eukit.

Les lames sont observées au microscope. Un signal d'hybridation se traduit par l'apparition d'une tâche de couleur violet-sombre.

2-1-6 Recherche par PCR de colonies bactériennes appartenant à l'espèce *V. penaeicida*

Trois colonies bactériennes ont été sélectionnées sur chacune des boîtes ayant servi au dénombrement bactérien sur la base de leur aspect macroscopique, semblable à celui de la souche AM101, et sur le fait qu'elles étaient suffisamment isolées des autres colonies bactériennes. L'ADN génomique bactérien est extrait au ChelexTM 100 (Sigma). Une colonie est prélevée à l'aide d'une anse stérile puis est mise en suspension dans un tube contenant 400 µL de Chelex et de la protéinase K à une concentration finale de 100µg/mL. Après digestion d'une nuit à 56°C le mélange est porté à ébullition 10 minutes afin d'inactiver la protéinase K. La technique de PCR utilise les amorces VpF et VpR décrites dans l'article.

L'amplification par PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 30 µL contenant :

- L'ADN bactérien extrait au Chelex (10 µL),
- L'eau ultra pure (10.90 µL),
- Le tampon 10X pour la Taq polymérase (Promega) (3 µL),
- Le Mg Cl₂ (1.80 µL, 1.5 mM),
- Les dNTP (3 µL, 0.2 mM chacun),
- 0.2 µm de chacune des deux amorces spécifiques,
- 0.5 U Taq polymérase (Eurogentec).

Les cycles d'amplification réalisés sur un thermocycleur (Eppendorf) débutent par une dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 2 minutes et sont suivis de 35 cycles qui comprennent une étape de dénaturation à 96°C durant 45 secondes, une étape d'hybridation à 62°C pendant 45 secondes puis une étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes. Une élongation terminale est réalisée à 72°C durant 5 minutes. La conservation des tubes se fait à 10°C en fin de procédure.

Les produits d'amplification sont chargés sur un gel d'agarose à 1% w/v contenant 0.5 µg mL⁻¹ de bromure d'éthidium. Le gel est soumis à un voltage constant de 20 V/cm dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1mM EDTA). La visualisation des amplicons générés est réalisée après exposition du gel aux UV.

2.2 Méthodologie

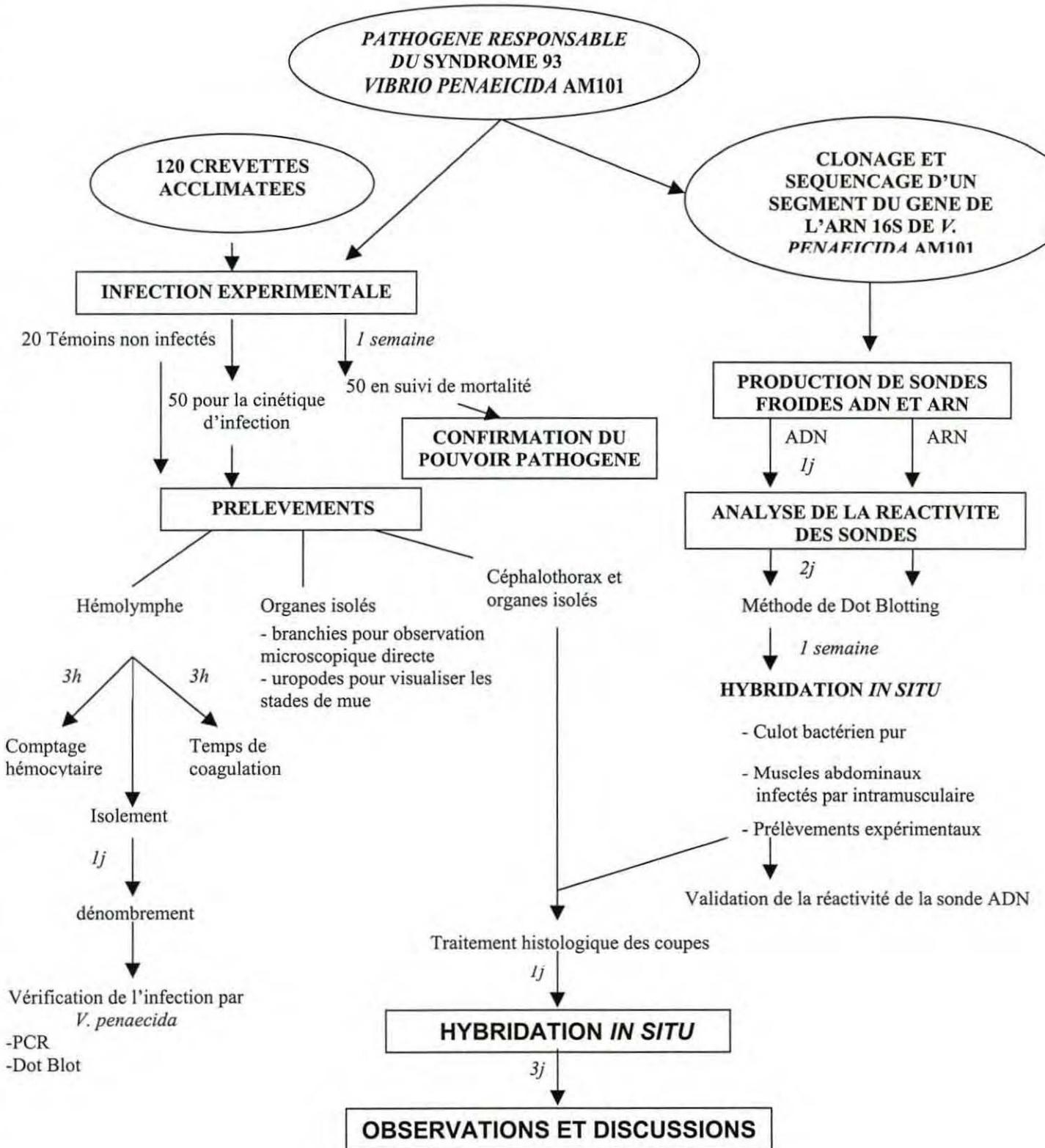
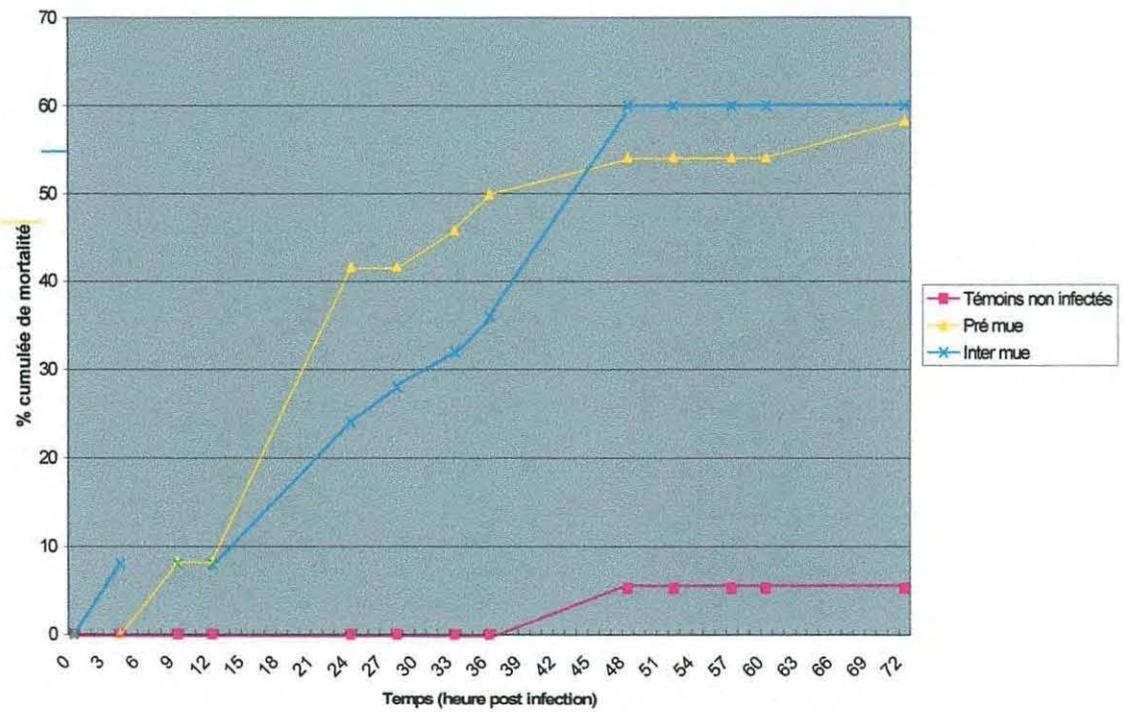


Figure 8 : Cinétique de mortalité des témoins non infectés et des animaux infectés



3/ RESULTATS

3.1 L'infection expérimentale

3.1.1 Confirmation du pouvoir pathogène de la souche bactérienne

Figure 8 : Cinétique de mortalité des témoins non infectés et des animaux infectés

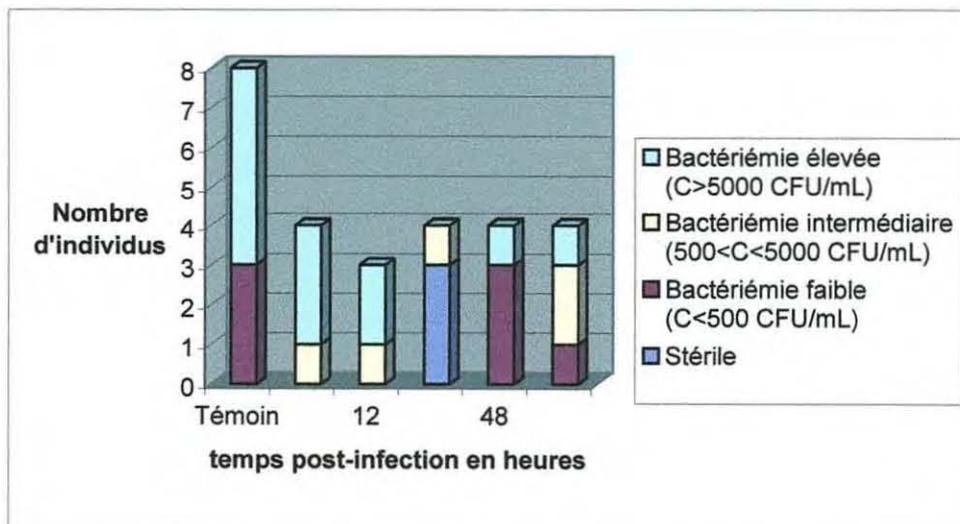
Par balnéation : La concentration de la suspension bactérienne de *V. penaeicida* utilisée lors de la balnéation des crevettes a été déterminée à postériori. Elle est de $3.6 \cdot 10^4$ CFU/mL pour un objectif théorique initial de $4 \cdot 10^4$ CFU/mL. Les mortalités débutent 4 heures post-infection. A 72 heures post-infection ces deux lots de crevettes présentent une mortalité équivalente (58 à 60% de taux de mortalité finale). Ces résultats sont conformes à ceux attendus puisqu'une DL50 de $1.3 \cdot 10^4$ CFU/ml a été déterminée auparavant au sein du laboratoire en suivant le même protocole d'infection expérimentale. Cependant dans les 72 premières heures suivant l'infection, le suivi des mortalités permet de mettre en évidence l'existence d'une sensibilité différente des animaux à l'infection par *V. penaeicida* selon leur stade de mue initial. En effet, le pic de mortalité obtenu, correspondant à la pente du segment de droite le plus important chez chacun des deux lots d'animaux, s'exprime plus précocement chez les animaux en pré-mue que chez ceux en post et inter-mue. En pré-mue il se situe entre 12 et 24 heures post-infection, tandis que chez les crevettes en post et inter-mue il se situe entre 36 et 48 heures post infection. La mortalité chez le lot de crevettes non infectées servant de contrôle est très faible (5%) puisqu'un seul animal est retrouvé mort à la 48^{ème} heure du suivi.

Par infection intramusculaire : Dix crevettes ont été injectées entre le 4^{ème} et 5^{ème} segment abdominal avec une suspension bactérienne de *V. penaeicida* contenant $4 \cdot 10^8$ CFU afin de pouvoir disposer d'un contrôle positif lors de la réalisation des tests d'hybridation *in situ*. Une crevette a été sacrifiée à 2 heures puis une autre à 4 heures post-infection pour être traitées pour l'histologie. Les 8 crevettes restantes ont été retrouvées mortes seulement 4 heures post-infection ce qui atteste de la virulence de la souche bactérienne utilisée.

Figure 9 : Coloration des appendices et blanchissement abdominal



Figure 10: Bactériémie totale de l'hémolymphe



3.2 Recherche des signes cliniques d'infection

3.2.1 Les symptômes de la maladie

De façon inattendue, aucune réaction de mélanisation, se traduisant par des dépôts de mélanine dans les tissus sous cuticulaire, n'a été observée chez les animaux infectés et sacrifiés à différents temps post-infection. Cet examen a été réalisé macroscopiquement sur l'animal entier ou à l'aide d'une loupe binoculaire à partir de prélèvements de branchies ou de périopodes.

Figure 9 : Coloration des appendices et blanchissement abdominal

Une nette coloration rouge des pléopodes est apparue au cours du suivi chez les animaux infectés mais cette coloration a également été notée chez des crevettes témoins avec une fréquence identique. Ce changement de coloration semble davantage être lié au stress de manipulation des animaux qu'à l'action du pathogène lui-même.

De la même manière, un blanchissement des muscles abdominaux a été noté chez les crevettes infectées mais également chez les animaux témoins. Cette opacification des muscles abdominaux apparaît donc plus comme la conséquence d'une atonie se traduisant par une activité ambulatoire réduite qu'un signe patent d'une vibriose déclarée.

Finalement aucun symptôme spécifique de vibriose n'a pu être mis en évidence au cours de ce suivi.

3.2.2. Le portage bactérien dans l'hémolymphe

Figure 10 : Bactériémie totale de l'hémolymphe

Concernant les animaux infectés par balnéation et prélevés à différents temps post-challenge, une grande variabilité individuelle est notée qui rend difficile toute interprétation des résultats. On observe cependant chez les animaux préalablement sélectionnés au stade post inter-mue une diminution notable du nombre de bactéries retrouvées dans l'hémolymphe 24 heures post-infection. De même quelques individus prélevés à 48 heures présentent une bactériémie faible. Compte tenu des résultats extrêmement variables d'un individu à l'autre il est impossible de déterminer si le stade de mue initial des crevettes a une incidence quelconque sur les niveaux de portage bactérien.

Figure 11 : Mise en évidence de *V. penaeicida* par PCR chez deux individus

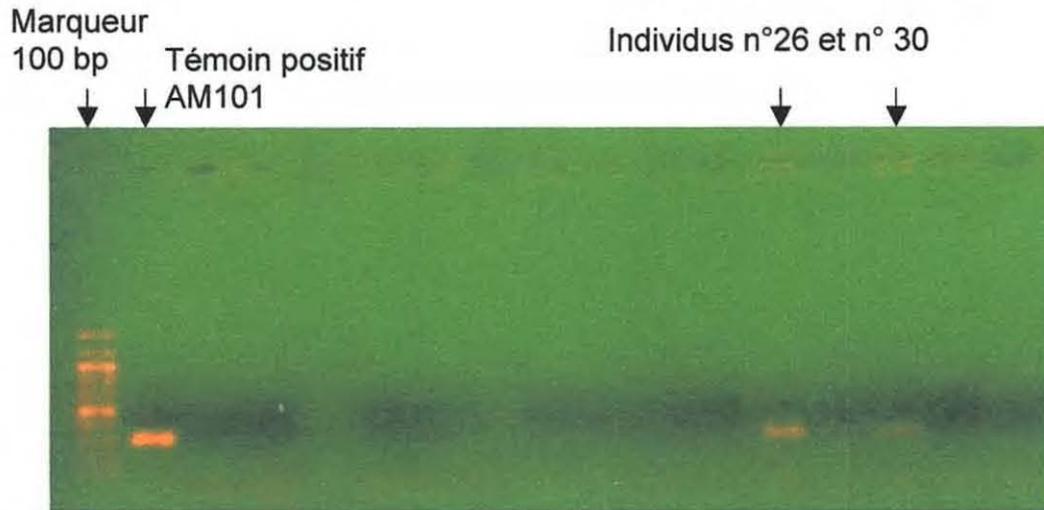


Figure 12

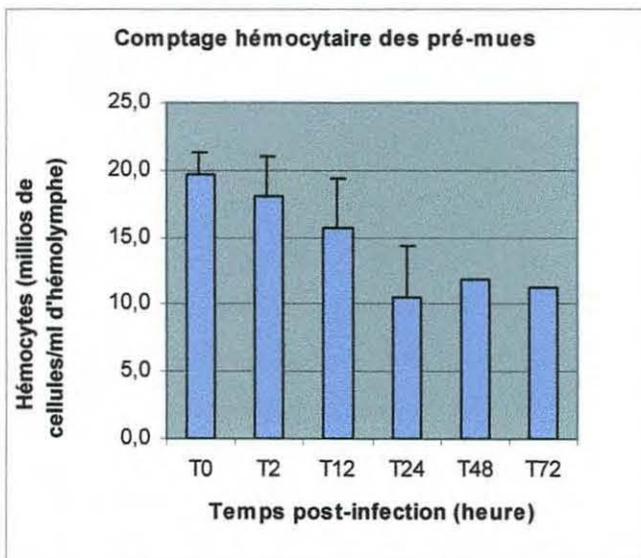
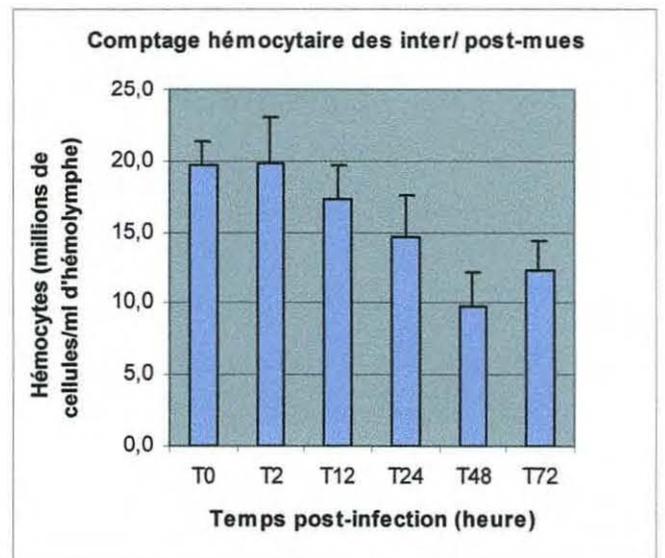


Figure 13



3.2.3 Présence de la souche AM101 dans l'hémolymphe

Nous avons voulu confirmer au moyen d'un test de détection spécifique par PCR la présence de *V. penaeicida* dans les prélèvements d'hémolymphe effectués. Nous voulions également comparer la sensibilité de cette technique de diagnostic à celle qui consisterait à coupler la PCR à une technique d'hybridation sur membrane. Cette dernière méthode présente en effet théoriquement une sensibilité accrue par rapport à un test de diagnostic simple effectué par PCR.

Figure 11 : Mise en évidence de *V. penaeicida* par PCR chez deux individus

Au total, 80 isolats bactériens ont été sélectionnés de part l'aspect microscopique des colonies similaire à celui de la souche AM101, puis leurs ADN extraits. Les résultats de PCR indiquent que trois colonies appartiennent bien à l'espèce *V. penaeicida*. Ces colonies proviennent :

- d'une crevette infectée d'apparence saine prélevée à T12 et initialement sélectionnée en stade d'inter/post-mue (concentration bactérienne indéterminable du fait de l'importance de la bactériémie se traduisant par un tapis bactérien)
- de deux crevettes moribondes prélevées à T24 (2 000 CFU/ml d'hémolymphe pour l'inter/post-mue) présentant toutes les deux des appendices fortement colorés en rouge.

Le protocole d'hybridation sur membrane appliqué à la détection des amplicons n'a pas permis de révéler de nouveaux isolats bactériens appartenant à *V. penaeicida*. Seuls les 3 isolats ayant donné par PCR un signal positif ont également généré un signal d'hybridation positif.

3.2.4 Les comptages hémoctaires

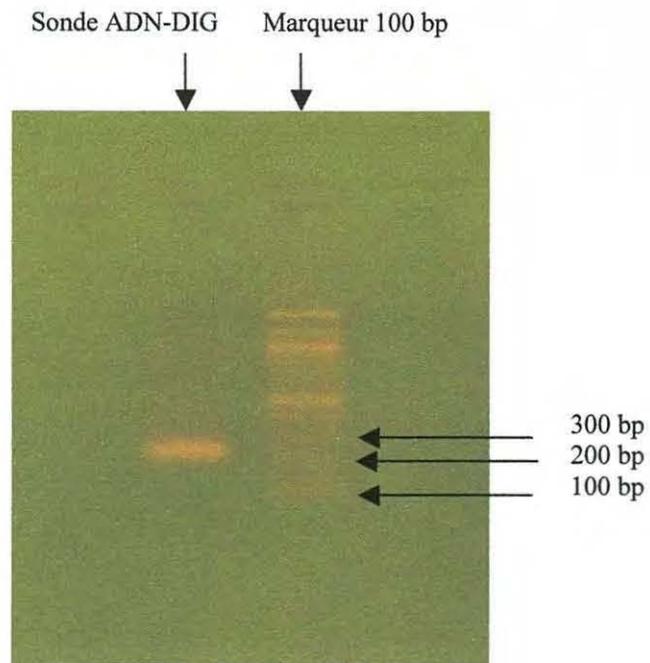
Annexe 5 a et b: Traitements statistiques des comptages hémoctaires

Figure 12 : Comptages hémoctaires des pré-mue

L'analyse des numérations hémoctaires obtenues à partir des prélèvements d'hémolymphe d'animaux préalablement sélectionnés au stade de pré-mue révèle une chute brutale du nombre d'hémocytes circulants. Cette baisse est significative dès 12h post-infection ($p=0,05$) et un minimum est obtenu à 24h post-infection. Les concentrations hémoctaires obtenues à 48 et 72h post-infection sont données à titre indicatif car l'effectif n'était que d'un individu par temps de prélèvement.

Figure 13 : Comptage hémoctaires des inter/post-mues

Figure 14: visualisation de la sonde ADN-DIG par PCR



Une chute de la concentration hémocytaire est également observée chez les crevettes préalablement sélectionnées en inter/post-mues. Celle-ci apparaît cependant retardée, avec un minimum observé à 48h post-infection. A ce temps du suivi la diminution du nombre d'hémocytes circulants est hautement significative ($p < 0.001$).

Quel que soit le stade de mue initial des crevettes considérées, il est important de noter que l'effectif des animaux s'enrichit dans le temps en crevettes potentiellement « résistantes », en effet les crevettes les plus « sensibles » meurent plus rapidement.

Du fait de la difficulté de ponctionner l'hémolymphe en quantité suffisante, les concentrations en hémocytes circulants de cinq individus sur un total de 44 n'ont pu être déterminées.

3.2.5 Le temps de coagulation

De façon inattendue, il n'a pas été possible de mesurer le temps de coagulation de l'hémolymphe des animaux. En effet pour environ 70% des prélèvements réalisés (44 au total) celui-ci dépassait une bonne heure alors que nous nous étions organisés sur la base d'un temps de coagulation beaucoup plus court. En revanche, il a été observé que des prélèvements réalisés de manière non optimale, telle l'aspiration à la seringue de bulles d'air, aboutissaient fréquemment à une coagulation très rapide de l'hémolymphe. Il a donc été impossible de comparer le temps de coagulation selon le statut d'infection des animaux (crevettes infectées ou témoins) ou le temps post-infection considéré.

3.3 Obtention des sondes et tests de sensibilité

3.3.1 Visualisation des sondes

Figure 14 : Visualisation de la sonde ADN-DIG sur gel d'agarose

Une sonde ADN spécifique d'un segment de l'ARN16S de *V. penaeicida* a été produite par PCR. Un aliquote est déposé sur un gel d'agarose. Après migration, un seul amplicon est visualisé qui correspond à la taille attendue (230 pb) par comparaison au profil d'électrophorèse obtenu avec un marqueur de poids moléculaire.

Le marquage de la sonde ADN par la digoxygénine est vérifié en déposant un aliquote de la sonde sur une membrane de nylon. Après fixation aux UV et utilisation du protocole

Figure 15 : Sensibilité de la sonde ADN

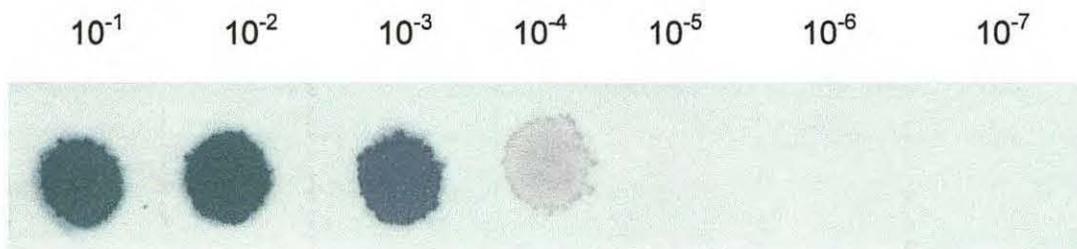
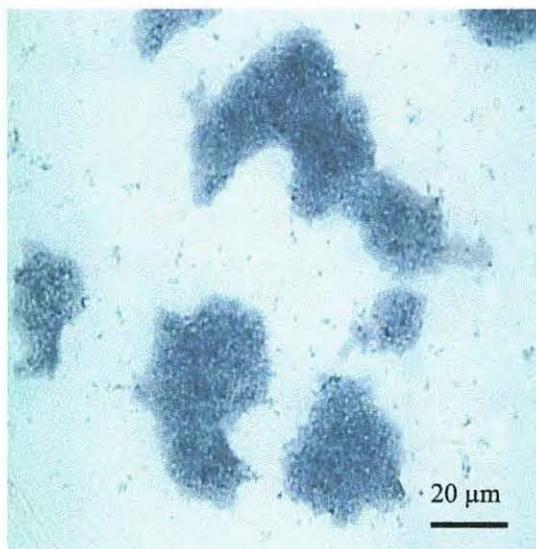


Figure 16a



**a) Hybridation *in situ* avec sonde
sur culot bactérien de
V.penaecida AM101
Coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 100X**

d'immuno-révélation décrit pour la méthode d'hybridation sur membrane, les dépôts d'acides nucléiques apparaissent en effet colorés en bleu-violet.

La concentration de la sonde obtenue est estimée à 50 ng/μL par comparaison avec l'intensité de fluorescence d'un marqueur de taille de concentration connue.

3.3.2 Sensibilité de la sonde ADN-DIG

Figure 15 : Sensibilité de la sonde ADN-DIG

L'insert du plasmide recombinant portant la séquence du fragment de l'ARN16S de *V. penaeicida* a été utilisé comme ADN cible. Il a été précédemment obtenu par digestion de l'ADN plasmidique à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et Xho puis extrait sur gel d'agarose. Sa concentration a été estimée à 10 ng/μL. Des dilutions successives (de 10 en 10) ont été effectuées dans un tampon contenant de l'ADN de sperme de saumon puis 1 μL de chacune des dilutions a été déposé sur une membrane de nylon. L'hybridation insert-sonde permet de révéler la présence d'un signal visible pour une concentration minimum d'ADN matrice de 10 pg/μL (dilution 10⁻³)

3.3.3 Confirmation de la réactivité des sondes en hybridation *in situ* et améliorations du protocole d'hybridation

La réactivité de la sonde ADN produite a été appréciée par hybridation *in situ* en utilisant des coupes histologiques dont nous étions certains qu'elles contenaient les bactéries *V. penaeicida*. Deux types de blocs ont été préparés :

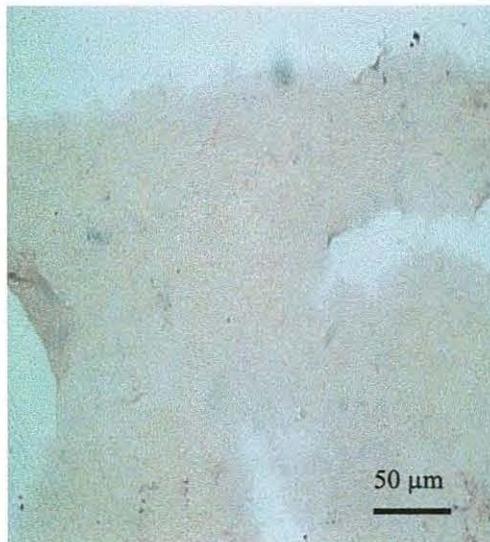
- Certains constitués de culots bactériens de la souche AM101 préalablement obtenus par centrifugation d'un bouillon de culture pur,
- D'autres réalisés à partir des prélèvements de muscles abdominaux effectués chez les crevettes infectées en intramusculaire avec *V. penaeicida*.

3.3.3.1 Sur culot bactérien

Figure 16.a : Hybridation *in situ* avec sonde sur culot bactérien

Des signaux d'hybridation se manifestant par une coloration violette à noirâtre sont obtenus lorsque la sonde *V. penaeicida* est utilisée. Les taches observées correspondent bien à des amas bactériens car lorsque nous faisons jouer la vis micrométrique du

Figure 16b



b) Hybridation *in situ* sans sonde sur culot bactérien de *V.penaecida* AM101
Coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 40X

Figure 17



Hybridation *in situ* avec sonde sur tissus infectés en intramusculaire par *V.penaecida* AM101
Coloration au Bismarck
Observation 40X

microscope nous pouvons distinguer au plus fort grossissement des bactéries présentant un aspect réfringent et légèrement incurvé, en forme de virgule ce qui est une caractéristique du genre *Vibrio*.

Figure 16.b : Hybridation *in situ sans* sonde sur culot bactérien

Aucun marquage n'est observé entre les amas bactériens. En revanche lorsque nous omettons volontairement d'ajouter la sonde au tampon d'hybridation, tout en respectant les différentes étapes du protocole d'hybridation, aucun signal n'est mis en évidence. Le marquage précédemment obtenu est donc dû à l'hybridation de la sonde sur les acides nucléiques bactériens.

3.2.4.2 Hybridation *in situ* sur tissus de crevettes infectées par injection intramusculaire de *V. penaeicida*

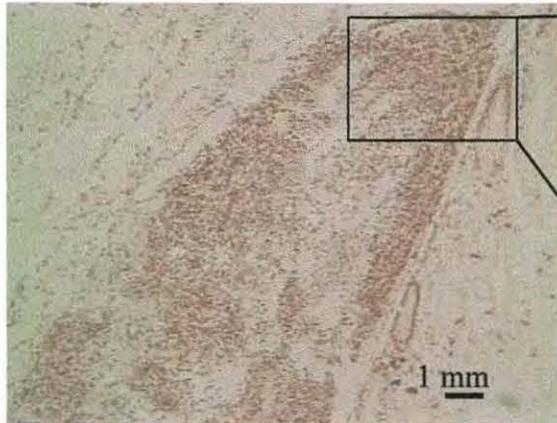
Les coupes réalisées sur les portions de muscles abdominaux correspondant au point d'injection de *V. penaeicida* ont été utilisées. Des signaux d'hybridation disposés en ligne et localisés dans des zones où les tissus semblent être lésés sont mis en évidence sur plusieurs coupes

Figure 17 : Hybridation *in situ* avec la sonde ADN sur tissus musculaires infectés par intramusculaire

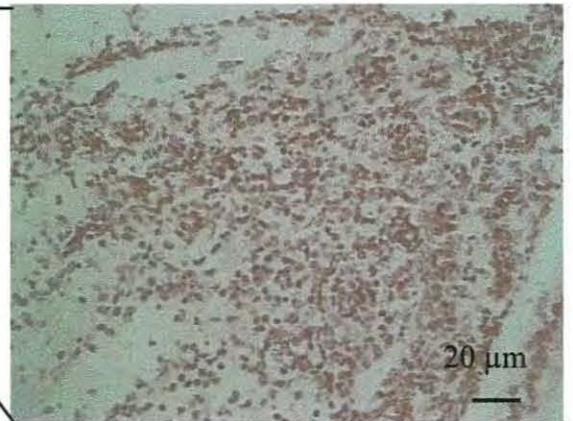
La déstructuration des tissus pourrait correspondre au trajet emprunté par l'aiguille lors de l'injection à moins qu'elle ne soit due aux exotoxines de *Vibrio penaeicida* probablement présentes dans l'inoculum de départ. Aucun signal d'hybridation n'est révélé dans les zones d'apparence saine du muscle abdominal, ce qui illustre la spécificité de la sonde, à l'exception toutefois de la cuticule quelquefois marquée par endroits. Ce phénomène est couramment décrit dans la littérature mais ne gêne en rien l'interprétation des résultats.

Ces mêmes coupes de tissus ont également été utilisées afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de la protéinase K lors de l'hybridation *in situ*. En faisant varier soit la concentration de protéinase K utilisée soit la durée d'incubation de la protéase, il a été décidé pour la suite des échantillons histologiques à traiter d'utiliser la protéinase K à une concentration de 300 µg/mL et d'incuber les coupes à température ambiante pendant 10 minutes. Ces conditions permettent en effet de ne pas trop altérer les tissus tout en autorisant l'accès de la sonde à sa cible tissulaire. Le temps de contre coloration au Bismarck a été fixé à 1h de manière à faire apparaître les noyaux des cellules qui prennent une coloration marron.

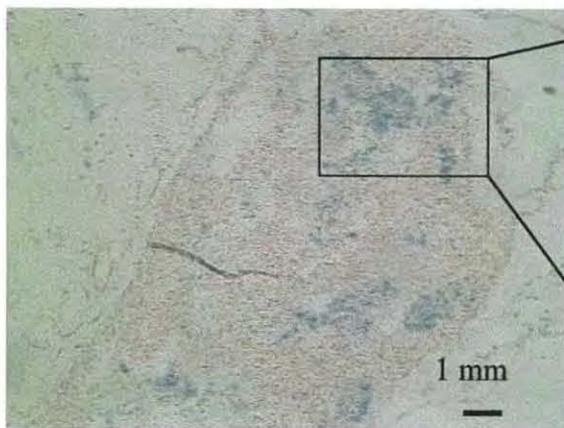
Figure 18 : Observations d'organes lymphoïde sain et infecté



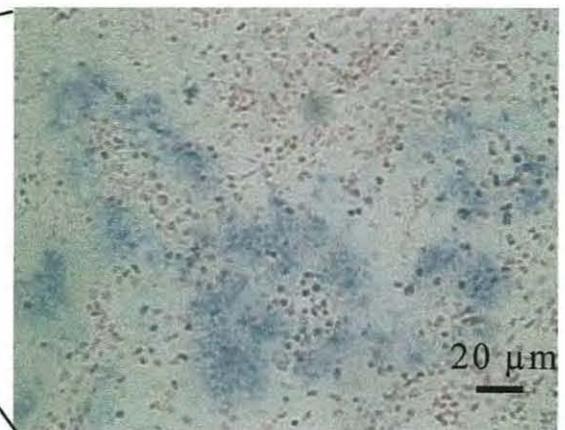
Organe lymphoïde sain
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 10X



Organe lymphoïde sain
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 40X



Organe lymphoïde infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 10X



Organe lymphoïde infecté
Contre coloration au bismarck
Observation à l'objectif 40X

3.4 Essais de localisation tissulaire de *V. penaeicida* chez des crevettes infectées par balnéation

Bien que des sondes ARN16S aient été produites au laboratoire avant que ce stage ne débute celles-ci n'ont pu être utilisées faute de temps. Aussi, seule la sonde ADN-DIG a été utilisée sur les coupes de tissus infectés provenant d'animaux infectés à différents temps. Ne pouvant pas également, faute de temps, traiter tous les prélèvements histologiques réalisés au cours de ce stage, nous avons dû en sélectionner quelques-uns seulement. Ces blocs correspondent aux animaux témoins non infectés ainsi qu'à des animaux infectés déclarés moribonds ou présentant une forte bactériémie ou encore trouvés porteurs de *V. penaeicida* dans leur hémolymphe. Le céphalothorax de chaque animal a été découpé selon un plan sagittal et l'hybridation *in situ* réalisée sur un minimum de 4 coupes.

Aucun signal d'hybridation spécifique n'a été observé chez les animaux témoins.

Figure 18 : Observations d'organes lymphoïdes sains et infectés

En revanche des signaux d'hybridation ont été obtenus à plusieurs reprises dans l'organe lymphoïde de certains animaux infectés. Il s'agissait d'une crevette présentant des signes cliniques de stress 12 heures post-infection et de deux crevettes moribondes prélevées 24h post-infection. Ces trois crevettes présentaient toutes une bactériémie élevée (>3000 CFU/mL). Différentes coupes réalisées à partir d'un même bloc histologique présentent un profil de marquage similaire. Des amas bactériens sont localisés dans l'organe lymphoïde. Il n'est cependant pas possible de déterminer si les bactéries reconnues étaient viables ou mortes au moment où les crevettes ont été sacrifiées. En effet, l'organe lymphoïde est le siège de nombreuses réactions de défense exercées par les hémocytes et il a pu être montré sur un modèle d'infection virale que celui-ci avait une fonction de destruction et de filtration des particules virales.

Figure 19 : Observations de branchies saines et infectées

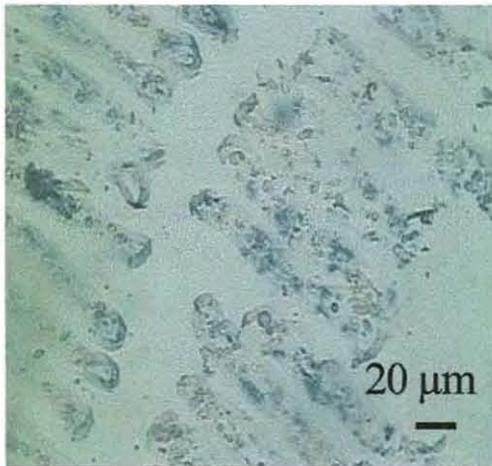
Figure 20 : Observations de cœur, hépatopancréas, estomac, intestin infectés à 24h post-infection

Des signaux d'hybridation ont également été observés dans d'autres tissus:

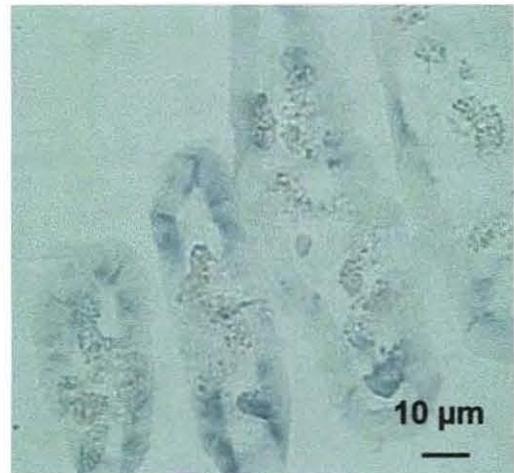
- les branchies chez un animal prélevé 12 heures post-infection
- le cœur, l'hépatopancréas, l'estomac, l'intestin ainsi que les tissus musculaire et conjonctif chez deux animaux moribonds prélevés 24h post-infection et présentant les signes d'une septicémie.

A 12 heures mais également à 48 et 72h post-infection, *V. penaeicida* n'a été détecté dans aucun tissu.

Figure 19 : Observations de branchies saines et infectées



Branchies infectées à 12h post-infection
Contre colorées au Bismarck
Observation à l'objectif 40x



Branchies infectées à 12h post-infection
Contre colorées au Bismarck
Observation à l'objectif 100x

4/ DISCUSSION

4.1 Discussion des résultats

4.1.1 Confirmation du pouvoir pathogène et premiers signes cliniques

Le modèle d'infection par baignade est standardisé. Sa reproductibilité a été étudiée par Saulnier *et al.* en 2000. La mortalité cumulée de 50% que nous avons obtenue à 48h quel que soit le stade de mue confirme la réussite du challenge.

Les mortalités fortes et rapides font preuve de la réelle pathogénicité de l'agent *V. penaeicida* et réfutent l'idée qu'il ne soit qu'opportuniste (Lighthner, 1988).

La mortalité plus précoce observée chez des animaux en pré-mue peut s'expliquer par le fait que la cuticule, fragilisée, ne constitue plus une barrière efficace vis à vis des bio agresseurs présents dans le milieu extérieur (Goarant *et al.*, 2000).

Les signes cliniques pathognomoniques décrits par Lighthner et Sinderman, (1988) puis par Goarant *et al.*, (1998) n'ont pu être mis en évidence dans notre expérimentation.

Au niveau macroscopique, nous avons bien observé le rougeoiement des appendices. Cependant, il est apparu plutôt lié au stress environnemental qu'à l'infection. De la même manière, l'opacification de l'abdomen des crevettes infectées comme des témoins négatifs serait liée au stress ou au manque d'activité ambulatoire dans les bails d'infection.

L'activité phénoloxydasique de défense contre les pathogènes, visible par le biais de réactions de mélanisation cuticulaire et branchiale, n'a pas pu être observée

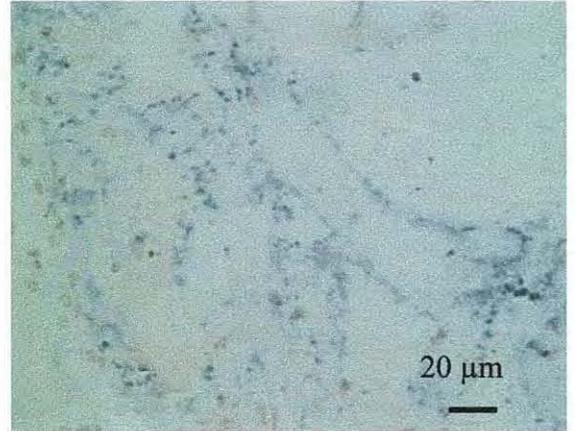
L'évolution de la bactériémie totale de l'hémolymphe n'a pu être reliée ni au temps post-infection ni au stade de mue. L'hypothèse selon laquelle le temps de coagulation est indicateur de la propreté du prélèvement n'est pas vérifiée. La fiabilité de nos résultats de dénombrement n'est donc pas confirmée. Cependant, la stérilité de plusieurs étalements vérifie la fiabilité des manipulations d'isolements.

L'hémolymphe des animaux moribonds est fortement contaminée ce qui est en accord avec les résultats de Mermoud et Costa (1996). Cependant, ils avaient mis en évidence une hémolymphe quasi stérile (100 CFU/mL) chez les animaux d'apparence saine ce qui est loin d'être le cas ici.

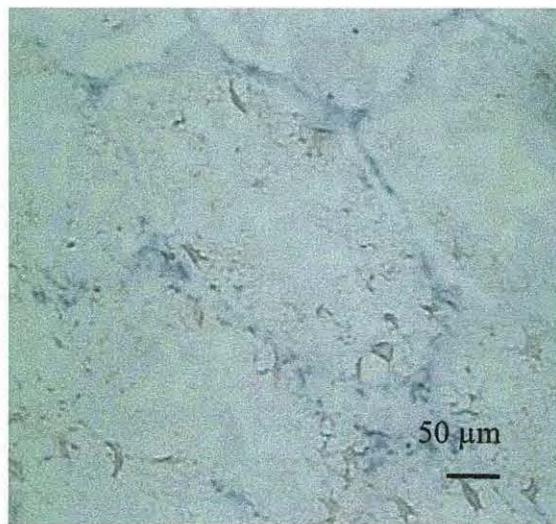
Figure 20 : Observations de cœur, hépatopancréas, estomac, intestin infectés à 24h post-infection



Cœur infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 10X



Cœur infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 40X



Tubule de l'hépatopancréas infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 25X

L'abaissement du niveau de la valeur du paramètre immunitaire : nombre d'hémocytes circulant est signe de moindre résistance à la vibriose (Le Moullac *et al.*, 1999-WAS Sydney). Nos résultats sont en accord avec ceux de Goarant *et al.* (2000), qui avaient montré l'effet lytique des produits extracellulaires de *V. penaeicida* sur les hémocytes. Le recrutement des hémocytes sur le lieu de l'infection coïncide avec nos résultats. La néosynthèse d'hémocytes circulants tend à augmenter leur effectif après la chute brutale de celui-ci durant le pic de mortalité.

Contrairement aux résultats annoncés par Mermoud *et al.* (1996), le temps de coagulation n'a pas pu être associé ni au stade de mue ni au temps post-infection. L'hémolymph ne coagule pas plus lentement, tout en restant proche de la minute, chez les crevettes infectées. Beaucoup des prélèvements n'ayant coagulés qu'1h après la ponction, nos résultats semblent être fortement corrélés à la qualité du prélèvement.

4.1.2 De l'obtention des sondes aux tests de réactivité

L'amplification de l'extrait d'ADN du *Vibrio* avec les amorces VecoR et VxhoR (Saulnier *et al.*, 2000) a donné les résultats escomptés. La ribosonde mesure bien 230 pb. De plus, nous avons vérifié la pureté de cette sonde obtenue par cette méthode de linéarisation du plasmide suivie de la transcription par les ARN polymérases phagiques. Le rendement d'amplification proche de 10 donc du rendement théorique rappelle la puissance de cette méthode.

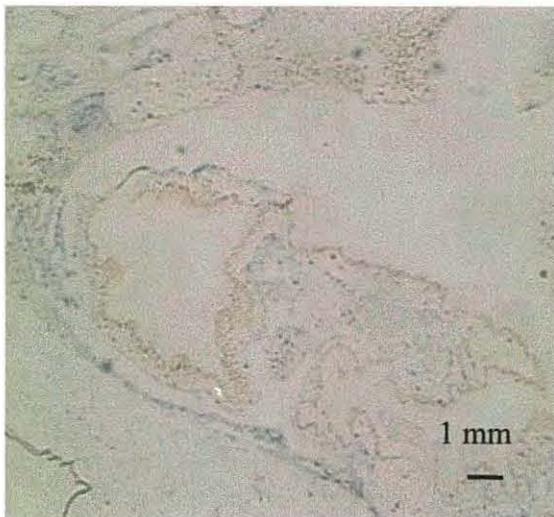
Le seuil de détectabilité de la sonde ADN-DIG déterminée en Dot est de 10 pg/ μ L. Ceci permet d'envisager son utilisation dans la technique de localisation de pathogènes par hybridation *in situ*.

La réactivité de cette sonde ADN vis-à-vis du *Vibrio* s'est révélée excellente sur culots bactériens comme sur coupes de tissus infectés expérimentalement. Nous validons ainsi son utilisation dans le protocole d'hybridation *in situ* employé sur les crevettes infectées par balnéation.

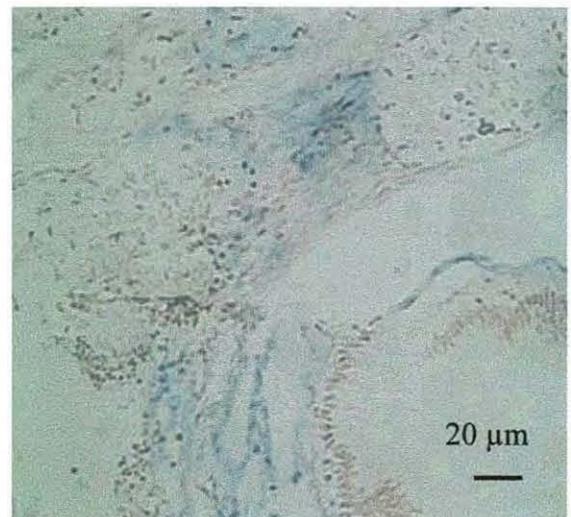
4.1.3 Localisation du pathogène après infection par balnéation

Les voies d'entrée constatées sont les mêmes que celles annoncées par L. de la Peña *et al.* (1994) et H.-H. Sung *et al.* (1996) à savoir : le système circulatoire via les branchies et le système digestif via la voie orale.

Figure 20 suite: Observations de cœur, hépatopancréas, estomac, intestin infectés à 24h post-infection



Intestin infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 10X



Intestin infecté
Contre coloration au Bismarck
Observation à l'objectif 40X

La cinétique d'infection observée grâce à cette présente étude diffère sur certains points de celle décrite par H-H Sung *et al.* (1996). Confrontons en détail ces deux cinétiques.

- Le *Vibrio* ne nous apparaît pas avant 12h post-challenge. Tandis qu'ils avaient détecté les antigènes de *V. vulnificus* inactivés sur *P. monodon* 5 minutes après balnéation et jusqu'à 24h dans tous les tissus (hémolymphe, hémocyte, branchies, estomac, hépatopancréas, intestin antérieur, intestin postérieur, colon, tissus hématopoïétique). De 3 à 6h, ils constataient que l'infection se disséminait des branchies et de l'estomac à l'hépatopancréas puis l'intestin (antérieur et postérieur) en suivant le transit digestif. Le fort signal détecté sur les hémocytes à 6h confirmait leur rôle dans l'immunité.

- Des signaux de fluorescence à un niveau faible à 12h dans tous les tissus exceptés l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde où ils étaient plus intenses. C'est également à 12h que nous observons pour la première fois l'agent pathogène dans l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde.

- La septicémie que nous observons à 24h sur les crevettes moribondes a été décrite par H-H Sung *et al.* ainsi que par Goarant *et al.* (1998) sur *L. stylirostris*. Cependant, ils affirment la stérilité du cœur alors qu'il est contaminé dans notre étude. Les *Vibrio* que nous utilisons ne sont pas inactivés donc que leur pouvoir invasif est plus important.

- A 3j post-infection, ils détectaient encore de faibles signaux dans les branchies, l'hépatopancréas, l'organe lymphoïde et les tissus hématopoïétiques. A l'opposé, ces organes sont sains à ce temps dans notre expérimentation. Les bactéries seraient éliminées par le système de défense immunitaire des crevettes.

Une seconde cinétique d'infection a été décrite par L de la Peña *et al* (1994). Ils avaient utilisé la souche *V. penaeicida* AM101 mais un mode d'infection oral. La comparaison des voies d'entrée de l'agent pathogène est donc difficile. Les différentes phases décrites étaient les suivantes :

- Ils ont constaté qu'à 8h l'infection s'étend à partir du foyer d'infection (l'estomac) à l'hépatopancréas et aux muscles.

- Les *Vibrio* ne sont plus visibles à 12h que dans l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde.
- Puis la phase de « disparition » où la bactérie est indétectable
- Finalement la septicémie apparaissait à 24h.

Il est donc possible de préciser la pathogénie à *Vibrio penaeicida*. Ces phases diffèrent de celles décrites dans les deux modèles évoqués précédemment.

- La bactérie pénètre dans l'organisme de l'hôte par la voie branchiale et digestive.

- Il s'ensuit la phase « cachée » de l'agent pathogène. L'agent pathogène est indectable dans tous les organes.
- Dès 12h l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde sont les lieux d'une intense multiplication.
- Finalement, les *Vibrio* ont colonisé tous les tissus à 24h.

4.2 Discussion méthodologique

4.2.1 Confirmation du pouvoir pathogène et premiers signes cliniques

Le modèle d'infection expérimentale de *V. penaeicida* sur *L. stylirostris* par baignation utilisant la DL50 a été retenu car il est jugé reproductible (Saulnier *et al*, 2000).

Toutefois la reproductibilité de notre cinétique de mortalité en fonction du stade de mue n'est pas totale. En effet, la séparation en deux lots pré-mue et post/inter-mue fut délicate et temporaire. La détermination des stades de mue par visualisation des soies d'un uropode n'est pas aisée. De plus, la manipulation des animaux durant les transferts jusqu'en salle d'infection semble accélérer leur rythme d'exuviation.

Le manque d'équipement de la salle d'infection expérimentale ne s'est pas révélé être un point critique dans la réalisation des techniques de microbiologie.

La méthode de comptage hématocytaire est satisfaisante. Seul l'effectif des animaux prélevés est insuffisant car les derniers comptages en pré-mue ont été réalisés sur un individu par temps.

La méthode d'extraction de l'ADN bactérien au Chelex est moins efficace que la méthode classique au chloroforme cependant elle est beaucoup plus rapide et déjà utilisée sur le C.O.P (Saulnier *et al*, 2000).

Le nombre limité de colonies testées ne permet pas de conclure quant à l'absence de AM101 sur les boîtes n'ayant donné aucun résultat positif. Il n'était pas possible de traiter toutes les colonies au Chelex puis par PCR dans le temps impartit. Le choix de celles-ci c'est fait uniquement par observation macroscopique en comparaison avec un témoin AM101.

4.2.2 De l'obtention des sondes au test de réactivité

La technique de marquage à froid des sondes a été choisie car elle présente l'intérêt de ne pas avoir recours à la radioactivité pour la détection de la molécule de digoxigénine (DIG). Il suffit d'employer un anticorps (détection immuno-enzymatique de la DIG). De plus, ces sondes présentent une grande stabilité, elles se conservent plus d'un an. Le critère essentiel est qu'elles sont aisément manipulables, ne nécessitant pas de disposer d'équipements particuliers. Dans ce souci de facilité de manipulation, il est important de rappeler que les sondes ADN sont beaucoup moins contraignantes que les sondes ARN. En effet, tout le matériel ne doit pas être sans Rnase, enzymes très courantes sur toutes les surfaces.

La technique de Dot blot permet de visualiser la validité de la technique de marquage à froid des sondes et de mettre en évidence la sensibilité des sondes.

La technique de détection des *Vibrio* par PCR est spécifique. En effet des tests réalisés sur des cultures pures d'autres espèces du genre *Vibrio* se sont tous révélés négatifs (Saulnier *et al.*, 2000). Notre méthode de détection est ainsi validée.

4.2.3 La technique d'hybridation *in situ*

Il est opportun de se poser quelques questions sur la technique d'hybridation *in situ*. Quel est le seuil de sensibilité de la méthode dans nos conditions expérimentales ? Combien de bactéries la sonde est-elle capable de détecter ? Pour y répondre, il serait nécessaire de réaliser plusieurs séries de manipulations.

H-H Sung *et al.* ont utilisé la méthode IFAT de détection des antigènes de *Vibrio* tués. L'utilisation d'anticorps apporte un haut niveau de sensibilité mais aussi une forte contrainte économique. Il nous est donc apparu judicieux de choisir la technique d'hybridation *in situ* bien que plus longue.

CONCLUSION

Les vibrioses de crevettes pénéides sont des infections très virulentes et contagieuses. La mise en place d'enquêtes épidémiologiques dans les élevages est nécessaire pour en suivre le statut sanitaire. Pour réaliser les suivis zoo sanitaires, il est impératif d'avoir un outil de diagnostic pouvant d'une part permettre la mise en évidence l'agent pathogène et d'autre part d'aider à mieux comprendre la cinétique d'infection de ce *Vibrio*.

Nous avons développé au C.O.P un outil bio moléculaire de diagnostic. Il s'agit d'une sonde froide à ADN construite à partir de la séquence ARN 16S spécifique de *V. penaeicida*. Sa sensibilité, sa spécificité et son seuil de détectabilité en font un outil diagnostique rapide et fiable. Il est donc possible de l'utiliser dans la technique d'hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* avec cette sonde sur des animaux infectés expérimentalement par balnéation a permis de détecter la présence de l'agent pathogène. Elle a également permis de préciser la virulence de celui-ci. Les voies d'entrée sont les branchies et le système digestif. La bactérie est ensuite totalement indétectable avant d'entamer une multiplication intense à 12 heures dans l'hépatopancréas et l'organe lymphoïde. La septicémie est déclarée dès 24 heures post-infection.

Cet outil de diagnostic mis au point, il est maintenant nécessaire de mettre en place un réseau de prélèvements, de collecte et d'analyse d'échantillons d'animaux provenant des fermes pénicoles principalement néo-calédoniennes.

La recherche sur la pathologie des crevettes est très active. En effet, des essais de traitements préventifs contre les vibrioses ont été testés au C.O.P mais se sont toutes révélées inefficaces (antibiothérapie, immunostimulation aux α -glucan et vaccin antivibronique).

Pour aider à mieux comprendre les mécanismes de défenses immunitaires des études sont menées sur la recherche d'effecteurs immunitaires (recherche de peptides antimicrobien telles que les pénaeidines), sur les relations Hôte-Environnement. Une sélection génétique basée sur des critères immunitaires est même en cour.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Costa *et al.* (1998)

De la Peña L., Toshihiro N. and Kiyokuni M.(1995) Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in Organs of Orally Infected Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology* 30: 39-45.

Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J/ and Bachère E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biochemical Chemistry* 272, 28398-28406.

Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.L., Martin C. & Martin B. (2000) Toxic factors of *Vibrio* stains pathogenic to shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 101-107.

Goarant C., Merien F., Berthe F., Mermoud I, Perolat P. (1999) Arbitrary primed PCR to type *Vibrio spp* pathogenic for shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1145-1151.

Kita-Tsukamoto (1993).

Lee K.K., Yu S.R. & Liu P.C. (1997) Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology* 34, 110-117.

Le Groumellec M., Goarant C., Haffner P., Mermoud I., and Costa R. (1996) Study of episodes of mortality observed in reared *Litopenaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia: Investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. Poster présenté au *congrès annuel de la World Aquaculture Society*, 29 janvier au 2 février 1996, Bangkok.

Lightner D.V. (1996) Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture society*, Baton Rouge, Louisiana.

Lightner D. and Sinderman (1988).

Lightner D. and Lewis (1975).

Liu P.C. and Lee K.K. (1999) Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 428-430

Martin G.G., Poole D., Poole C., Hose J.E., Arias M., Reynolds L., McKrell N. and Whang A (1993) In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *J. Invertebrates Pathologies.* 117, 155-168.

Munoz M., Fisch S., Garnier J., Zatylny C., Bulet P., Vandenbulke F., Saulnier D. and Bachère E. (in prep) Characterization of members of the penaeidin family in *Litopenaeus stylirostris* and analysis of gene expression and peptide distribution in shrimps infected by *Vibrio penaeicida*.

Munoz M.; Vandenbulcke F., Saulnier D. and Bachère E. (2002) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur; j; Biochem.* 269, 2678-2689.

Persson M., Cerenius L. and Soderhall K (1987). The influence of haemocyte number on the disease resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *J. Fishes Diseases.* 10, 471-477.

Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P. and Ansquer D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.

Smith V.J. and Ratcliffe N.A. (1980). Cellular defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*: in vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria. *J. Invertebrates. Pathologies.* 35, 65-74.

Sudheesh P.S. and Xu H.S. (2001). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius : possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196, 37-46

Yeh M.S., Chen Y.L. and Tsai I.H. (1998) The hemolymph clottable proteins from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comparative biochemistry and Physiology* 121B, 169-176.

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ANOVA : Analyse de Variance
ARN : Acide Ribonucléique
BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate
C.O.P : Centre Océanologique du Pacifique
CFU : Clony Forming Unit
°C: Degré Celsius
DIG : Digoxygénine
DL 50 : Dose létale de 50%
dNTP : Désoxyribonucléoside 5'triphosphate
Dnase : désoxyribonucléase
D.R.I.M : Laboratoire de Défense et Résistance des Invertébrés Marins
dTTP : Ensemble des dNTP
dUTP : Désoxyribo-uracile 5'triphosphate
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
F.A.O : Food and Agriculture Organization
IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Technic
L. stylirostris : *Litopenaeus stylirostris*
mJ/cm² : Millijoule/cm²
mM : MilliMolaire
μL : Microlitre
NBT : Nitroblue Tetrazolium Chloride
pb : Paire de Bases
pBluescript : Plasmide pBluescript
PBS : Tampon phosphaté salin
PCR : Polymerase Chain Reaction
pg : Picogramme
PH : Potentiel Hydroxyde
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
S93 : Syndrome 93
SSC : Solution Saline Concentrée
TA : Température Ambiante
TAE : Tampon Tris Acétate EDTA
TBS : Tampon Tris Salin
TRIS : Tris-hydroxyméthyléthylènediamine
T0 : Temps zéro
U: Unité enzymatique
UV: Ultraviolet
V/cm : Volt/cm
Vp: *Vibrio penaeicida*
W/V : Weight/Volume

TABLE DES ILLUSTRATIONS

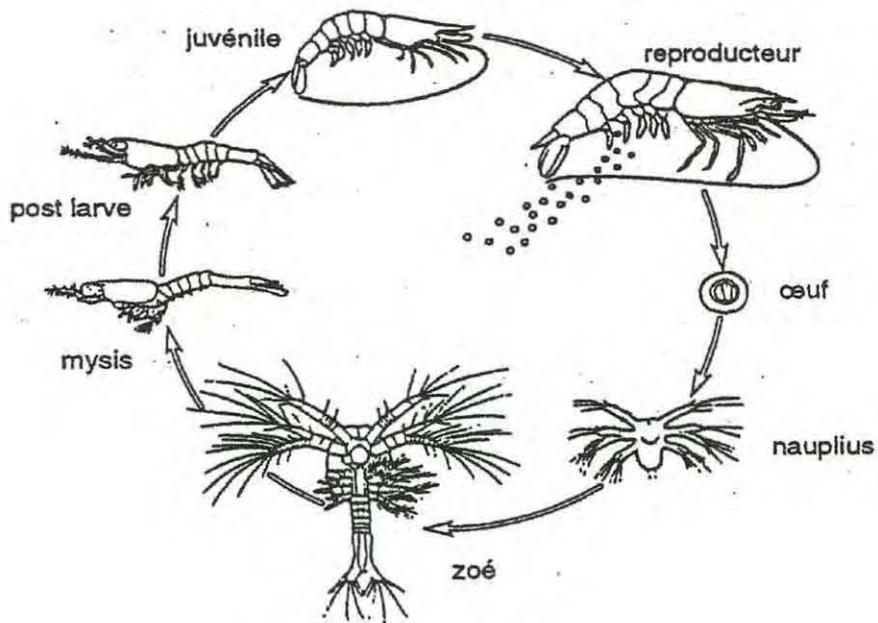
<u>Figure 1 : Production mondiale totale de crevettes</u>	6
<u>Figure 2 : Production de crevettes dans les principaux pays producteurs</u>	6
<u>Figure 3 : Les principales espèces élevées et leurs aires de répartition</u>	7
<u>Figure 4 : La crevetticulture en Polynésie Française</u>	7
<u>Figure 5 : La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie</u>	8
<u>Figure 6 : Anatomie de la crevette pénéide</u>	20
<u>Figure 7 : Le marquage à la digoxigénine</u>	23
<u>Figure 8 : Cinétique de mortalité des témoins non infectés et des animaux infectés</u>	26
<u>Figure 9 : Coloration des appendices et blanchissement abdominal</u>	27
<u>Figure 10 : Bactériémie totale de l'hémolymphe</u>	27
<u>Figure 11 : Mise en évidence de <i>V. penaeicida</i> par PCR chez deux individus</u>	28
<u>Figure 12 : Comptages hémycytaires des pré-mue</u>	28
<u>Figure 13 : Comptage hémycytaires des inter/post-mues</u>	28
<u>Figure 14 : Visualisation de la sonde ADN-DIG sur gel d'agarose</u>	29
<u>Figure 15 : Sensibilité de la sonde ADN-DIG</u>	30
<u>Figure 16.a : Hybridation <i>in situ</i> avec sonde sur culot bactérien</u>	30
<u>Figure 16.b : Hybridation <i>in situ sans</i> sonde sur culot bactérien</u>	31
<u>Figure 17 : Hybridation <i>in situ</i> avec la sonde ADN sur tissus musculaires infectés par intramusculaire</u>	31
<u>Figure 18 : Observations d'organes lymphoïde sain et infecté</u>	32
<u>Figure 19 : Observations de branchies saines et infectées</u>	32
<u>Figure 20 : Observations de cœur, hépatopancréas, estomac, intestin infectés à 24h post-infection</u>	32

TABLE DES ANNEXES

<u>Annexe 1 : Cycle de croissance des crevettes pénéides</u>	12
<u>Annexe 2 : La salle d'infection</u>	18
<u>Annexe 3 : Le microtome</u>	20
<u>Annexe 4 : Les thermocycleurs</u>	21
<u>Annexe 5 a et b: Traitements statistiques des comptages hémycytaires</u>	28

ANNEXES

Annexe 1 : Cycle de croissance des crevettes péneïdes



Annexe 2 : La salle d'infection



Annexe 3 : Le microtome



Annexe 4 : Les thermocycleurs



Annexe 5 a : Traitements statistiques des comptages hémocytaires pour les Inter/post mue

Tableau ANOVA pour millions hémocytes

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Temps	5	405,617	81,123	15,088	<,0001	75,442	1,000
Résidu	24	129,037	5,377				

Tableau de moyennes pour millions hémocytes

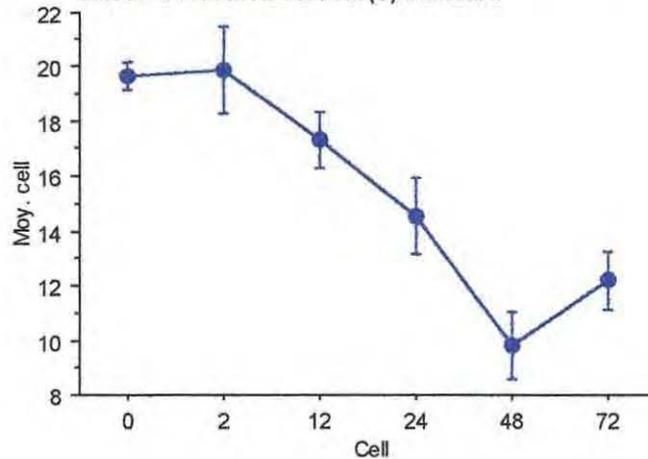
Effet : Temps

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
0	9	19,667	1,635	,545
2	4	19,900	3,182	1,591
12	5	17,340	2,324	1,040
24	4	14,550	2,792	1,396
48	4	9,825	2,505	1,253
72	4	12,225	2,117	1,059

Courbe des interactions pour millions hémocytes

Effet : Temps

Barres d'erreur: ± 1 Erreur(s) standard



Test PLSD de Fisher pour millions hémocytes

Effet : Temps

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
0, 2	-,233	2,876	,8684	
0, 12	2,327	2,669	,0846	
0, 24	5,117	2,876	,0012	S
0, 48	9,842	2,876	<,0001	S
0, 72	7,442	2,876	<,0001	S
2, 12	2,560	3,210	,1128	
2, 24	5,350	3,384	,0033	S
2, 48	10,075	3,384	<,0001	S
2, 72	7,675	3,384	<,0001	S
12, 24	2,790	3,210	,0855	
12, 48	7,515	3,210	<,0001	S
12, 72	5,115	3,210	,0031	S
24, 48	4,725	3,384	,0082	S
24, 72	2,325	3,384	,1690	
48, 72	-2,400	3,384	,1562	

Annexe 5 b : Traitements statistiques des comptages hémocytaires pour les pré mue

Tableau ANOVA pour Nombre d'hémocytes

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Temps	5	214,538	42,908	7,186	,0025	35,930	,976
Résidu	12	71,652	5,971				

Tableau de moyennes pour Nombre d'hémocytes

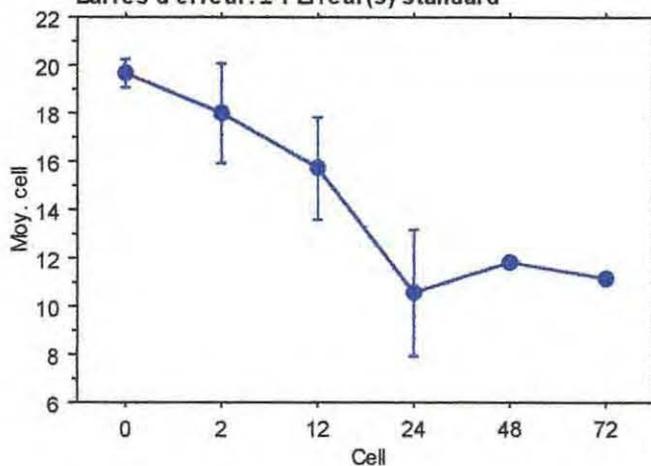
Effet : Temps

	Nombre	Moyenne	Dév. Std.	Err. Std.
0	9	19,667	1,635	,545
2	2	18,000	2,970	2,100
12	3	15,733	3,702	2,137
24	2	10,550	3,748	2,650
48	1	11,800	.	.
72	1	11,200	.	.

Courbe des interactions pour Nombre d'hémocytes

Effet : Temps

Barres d'erreur: ± 1 Erreur(s) standard



Test PLSD de Fisher pour Nombre d'hémocytes

Effet : Temps

Niveau de significativité : 5 %

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
0, 2	1,667	4,162	,4001	
0, 12	3,933	3,549	,0326	S
0, 24	9,117	4,162	,0005	S
0, 48	7,867	5,612	,0100	S
0, 72	8,467	5,612	,0065	S
2, 12	2,267	4,860	,3296	
2, 24	7,450	5,324	,0101	S
2, 48	6,200	6,521	,0605	
2, 72	6,800	6,521	,0423	S
12, 24	5,183	4,860	,0385	S
12, 48	3,933	6,148	,1886	
12, 72	4,533	6,148	,1341	
24, 48	-1,250	6,521	,6836	
24, 72	-,650	6,521	,8317	
48, 72	,600	7,529	,8651	