

Cyrille Goarant
José Herlin
Dominique Ansquer
David Domalain
Frédéric Imbert
Anne-Laure Marteau

DRV / RST / RA / LAC – 2003 - 02

**Bases des connaissances sur l'épidémiologie
de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique
du « Syndrome d'été » chez les crevettes
d'élevage en Nouvelle-Calédonie**




FICHE DOCUMENTAIRE

Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/RST/2003-02 Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Jean Barret Version du document : définitive	date de publication 2003 nombre de pages 23 bibliographie (Oui / Non) illustration(s) (Oui / Non) langue du rapport : Français
---	---

Titre et sous-titre du rapport :
 Bases des connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique du « Syndrome d'été » chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie

Titre traduit :
 State of the art of the epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, the etiological agent of « summer syndrome » in shrimp aquaculture in New Caledonia.

Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Cyrille GOARANT, Dominique ANSQUER, José HERLIN, David DOMALAIN, Frédéric IMBERT et Anne-Laure MARTEAU	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER / DRV-RA / Laboratoire d'Aquaculture de Nouvelle-Calédonie
---	---

Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
---------------------------------------	---

Travaux universitaires :

diplôme :	discipline :
établissement de soutenance :	année de soutenance :

Titre du contrat de recherche :	n° de contrat IFREMER
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	

Cadre de la recherche : Programme :	Convention :
Projet :	Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

L'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie rencontre depuis 1998 une nouvelle pathologie. Celle-ci se traduit par une mortalité au caractère estival marqué qui lui a valu le nom de « syndrome d'été ». Bien que l'agent pathogène identifié, la bactérie *Vibrio nigripulchritudo*, puisse être retrouvé sur la majorité des sites d'élevage, une seule ferme apparaît réellement affectée par cette maladie.

Ce rapport fait le point des connaissances sur la répartition géographique de ce pathogène dans les sites d'élevage de crevettes, son épidémiologie dans le contexte du « Syndrome d'été » et présente des données sur l'étude du pouvoir pathogène de quelques souches. Il s'efforce ensuite de lister quelques pistes de recherche sur ce « Syndrome d'été ».

Abstract :

A new disease has been affecting the shrimp aquaculture industry of New Caledonia since 1998. This pathology leads to mass mortalities in summer and were therefore called « Summer Syndrome ». Though *Vibrio nigripulchritudo*, the putative etiological agent, can be isolated from almost any farming site, it causes severe mass mortalities in only one farm.

This report is aimed at compiling the current knowledge on geographical distribution of this pathogen in New Caledonia, his epidemiology with regards to the « summer syndrome » and presents data on pathogenicity studies of a few selected strains.

A few research perspectives are summarized at the end of the report.

Mots-clés :

Vibrio ; *nigripulchritudo* ; Pénéide ; aquaculture ; maladie ; Nouvelle-Calédonie

Keywords :

Vibrio ; *nigripulchritudo* ; Penaeid ; aquaculture ; disease ; New Caledonia

Commentaire :

Connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*,
agent étiologique du « Syndrome d'été » chez les crevettes
d'élevage en Nouvelle-Calédonie

1. Introduction	3
2. Répartition géographique : détection dans les écloseries et les fermes de grossissement	5
2.1. Contexte	5
2.2. Méthodes	5
2.3. Résultats	6
2.3.1. Aquamon / Montagnès	6
2.3.2. Écloserie du Nord :	6
2.3.3. Écloserie de la SASV :	6
2.3.4. Écloserie de Mara :	6
2.3.5. Ferme Aquacole de la Ouenghi :	7
2.3.6. La Pénéide de Ouano :	7
2.4. Discussion.....	7
3. Expression du phénomène à Sea Farm : étés 2000-2001 et 2001-2002	9
4. Etude de la pathogénicité de quelques souches	15
4.1. Facteurs toxiques sécrétés (potentiellement exotoxines).....	15
4.2. Infections expérimentales à l'aide de souches de <i>Vibrio nigripulchritudo</i> : résultats préliminaires	17
4.2.1. Matériels et méthodes :	17
4.2.2. Résultats :	18
5. Conclusions et perspectives.....	20



1. Introduction

Beneckeia nigripulchrituda a été décrit en 1971 par Baumann *et al.* à partir d'isolats d'eaux océaniques au large des îles d'Hawaii. Leurs isolats ont pour la plupart été obtenus sur milieu enrichi en chitine à des profondeurs de 0 à 150 mètres. Plus tard (1980), Baumann *et al.* proposent l'abolition du genre *Beneckeia* et la réassignation au genre *Vibrio* des espèces de ce genre. *Beneckeia nigripulchrituda* est ainsi rebaptisé *Vibrio nigripulchritudo*.

Il a été identifié pour la première fois en **1995** en Nouvelle-Calédonie sur des crevettes moribondes des fermes Aquamer et Sodacal, associé à des épisodes de mortalité hivernale de type Syndrome 93 (Costa *et al.*, 1998). Le grand nombre de souches étudiées dans une étude de typage moléculaire (Goarant *et al.*, 1999) n'avait pas permis de démontrer l'implication de cette espèce bactérienne dans un contexte de pathologie en dehors de ces deux fermes. Il avait donc été considéré comme géographiquement limité aux deux fermes aquacoles de Moindou (Aquamer et Sodacal voir figure 1). A ce titre, il avait semblé opportun de proposer quelques mesures de gestion zoosanitaire susceptibles de limiter ou *a minima* de retarder son expansion géographique. Toutefois, des contraintes industrielles et probablement une mauvaise sensibilisation de la filière aux questions sanitaires n'ont pas permis de respecter ces préconisations. *V. nigripulchritudo* a été isolé **fin décembre 1997** sur les bassins 3 et 4 de la ferme Seafarm en baie de Saint Vincent où il était associé à des problèmes de mortalité atypique dans le contexte calédonien, puisque cette mortalité était estivale. Cette pathologie a depuis cette date pris sur cette ferme une épidémiologie particulière et très stéréotypée, caractérisée par des flambées épizootiques après 50 à 60 jours d'élevage environ, sur tous les bassins ensemencés. *V. nigripulchritudo* a été à nouveau isolé de l'hémolymphe de crevettes moribondes à la ferme Blue Lagoon Farms en **mars 1998**. Sur cette ferme, son expression est discrète et se traduit par la mortalité de quelques individus généralement mous, à l'occasion de pics de mue. Enfin, *V. nigripulchritudo* a été isolé dans des conditions similaires en **avril 1998** sur des crevettes moribondes de la ferme Webuihoone. Sur ces deux autres fermes ainsi que sur les fermes Sodacal et Aquamer à Moindou, cette pathologie est une vibriose septicémique typique, au caractère opportuniste reconnu : les circonstances récentes de son observation correspondent à celles d'une vibriose « sanctionnant » des conditions d'élevage défavorables ou un mauvais état physiologique des animaux (chute d'oxygène, chute de bloom dans les bassins, pic de mue...). Son isolement au cours d'épisodes de Syndrome 93 semble donc être anecdotique, comme cela avait déjà été considéré à la suite de l'étude de typage moléculaire citée précédemment (Goarant *et al.*, 1999).



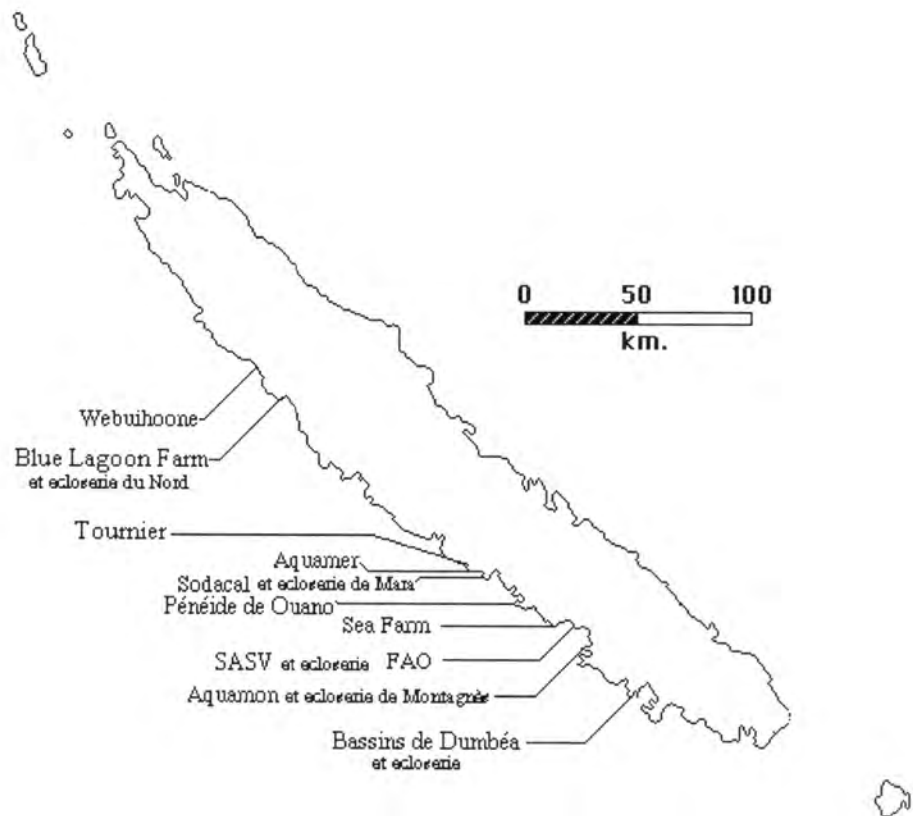


Figure 1 : localisation géographique des fermes de grossissement de crevettes en Nouvelle-Calédonie.

Il apparaît par ailleurs que *V. nigripulchritudo* (ou au moins certaines souches de cette espèce) a un caractère saisonnier différent de celui de *V. penaeicida* et s'exprime préférentiellement en été.

Ce rapport reprend les éléments de connaissance dans un ordre chronologique et tente de faire ressortir la démarche qui a été la nôtre dans l'acquisition des connaissances sur ce pathogène.



2. Répartition géographique : détection dans les écloseries et les fermes de grossissement

2.1. Contexte

Face aux problèmes auxquels ce pathogène est associé à Seafarm, et suite à la visite d'un expert extérieur mandaté par le Groupement des Fermes Aquacoles, il a été envisagé de conduire une expérimentation de sélection massale par reproduction d'individus ayant survécu à des épisodes de "mortalité d'été" à Seafarm impliquant *V. nigripulchritudo*. Des crevettes de cette ferme (potentiellement porteuses de ce pathogène) ont donc été transférées vers l'écloserie de Montagnès (zone considérée comme probablement indemne) afin d'y produire des post-larves susceptibles d'hériter d'une relative résistance à cette pathologie. Des prélèvements préalables au transfert ont été réalisés sur les géniteurs de Seafarm et de Montagnès et des recommandations de quarantaine ont été proposées. Un suivi de certains aspects sanitaires de ces deux productions (géniteurs de Montagnès et géniteurs importés de Sea Farm) menées en parallèle a également été mis en place. A cette occasion, profitant de la reprise d'activité des autres écloseries pendant cette période, une campagne de détection de *V. nigripulchritudo* a été conduite, afin de préciser sa répartition géographique actuelle. Cette campagne s'est déroulée en juin-juillet 2000, sur les géniteurs des écloseries du Nord (Koné), de la SASV (Ouenghi), et de Mara (Moindou). Vu le caractère estival de son expression, il importerait de compléter cette étude en saison chaude ainsi que dans les sites non encore étudiés.

C'est à ce titre que nous avons effectué en avril 2002 une recherche de ce pathogène sur des crevettes des 2 fermes de grossissement les plus proches de Sea Farm : la Ferme Aquacole de la Ouenghi (FAO) et la Pénéide de Ouano, respectivement au Sud et au Nord de Sea Farm.

2.2. Méthodes

Pour les juvéniles et les géniteurs (bassins de grossissement et salles de maturation des écloseries), l'hémolymphe est ponctionnée et étalée sur milieu de ZoBell additionné de glycérol, révélateur de *V. nigripulchritudo*. Les crevettes moribondes sont analysées en priorité mais lors de l'absence de ces dernières, des animaux présumés sains sont étudiés.

Pour les larves et postlarves,

- 40 nauplii prélevés à la micropipette sont étalés directement sur ZoBell glycérol (4 réplicats).
- 40 post-larves sont broyées dans 1 ml d'eau de mer stérile ; 100 µl de broyat sont étalés sur ZoBell glycérol (4 réplicats).



Les milieux de culture sont ensuite incubés de 48 à 72 heures à 30°C. Les colonies noires ou grises sont considérées comme suspectes, isolées et leur identification est confirmée par des tests phénotypiques classiques (état frais, coloration de Gram, galerie API 20E).

2.3. Résultats

(carte des implantations géographiques : cf supra)

2.3.1. Aquamon / Montagnès

Le prélèvement, ayant pour but de vérifier l'absence de portage de *V. nigripulchritudo* par les géniteurs du site Aquamon / Montagnès avant l'arrivée des géniteurs de Sea Farm susceptibles d'être porteurs de ce pathogène, a permis d'isoler une souche issue d'une hémoculture monomorphe présumée *V. nigripulchritudo* à partir d'une femelle moribonde. Cette souche a été isolée, sa caractérisation phénotypique donne une identification présomptive à *V. nigripulchritudo*. Elle a été conservée en congélation, son identification génotypique a été confirmée au Centre Océanologique du Pacifique (Saulnier, com. pers.) à partir d'amorces spécifiques (*rrs*).

Trois autres souches ont, depuis, été isolées d'hémocultures polymorphes de crevettes d'apparence saine (2 isolats) et d'un broyat de larves *Nauplius* (1 isolat) dont l'identification à *V. nigripulchritudo* a également été confirmée au COP.

2.3.2. Écloserie du Nord :

Trois isolats ont été obtenus à partir d'une hémoculture monomorphe d'une femelle moribonde (1 isolat) et de 2 hémocultures polymorphes de géniteurs d'apparence saine (2 isolats). Ces souches ont pu être isolées, caractérisées en galerie API 20E et conservées à -80°C.

2.3.3. Écloserie de la SASV :

Trois isolats ont été obtenus de géniteurs d'apparence saine. Ils ont été conservés à -80°C et leur identification confirmée au COP.

2.3.4. Écloserie de Mara :

Aucune colonie suspecte n'a été relevée sur les hémocultures de 36 géniteurs (dont 2 moribonds) de ce site.



2.3.5. Ferme Aquacole de la Ouenghi :

Aucune colonie suspecte n'a été relevée sur les hémocultures de 20 crevettes juvéniles d'apparence saine de ce site.

2.3.6. La Pénéide de Ouano :

Sur 32 crevettes juvéniles d'apparence saine étudiées provenant de 6 bassins de cette ferme, 8 crevettes ont été trouvées porteuses de *V. nigripulchritudo* en des quantités variables : entre une et plus de 40 colonies par goutte d'hémolymphe, au sein d'hémocultures polymorphes. Six de ces souches ont été archivées pour étude ultérieure.

2.4. Discussion

Cette recherche de *V. nigripulchritudo* dans les fermes et écloséries a permis d'améliorer la description de la répartition géographique de ce *Vibrio* dans les sites aquacoles de Nouvelle-Calédonie.

Il a notamment permis de mettre en évidence sa présence sur des sites où ce *Vibrio* n'avait jamais été détecté jusqu'à présent dans des contextes pathologiques mais où sa présence n'était pas pour autant exclue. Il est connu que par le passé, des crevettes (à différents stades des développement) avaient été transférées sans précaution sanitaire de zones où *V. nigripulchritudo* est enzootique vers ces sites.

Ce *Vibrio* peut également être parvenu (ou naturellement présent, de longue date) dans les baies adjacentes sans rencontrer les conditions favorisant lui permettant d'exprimer son caractère pathogène dans les bassins de grossissement. Enfin, une autre hypothèse est la co-existence au sein de l'écosystème de souches de pathogénités différentes. Il serait à ce titre intéressant d'effectuer un typage des souches conservées. Des mesures zoosanitaires liées à cette pathologie pourraient être instaurées si des clones différents sont mis en évidence sur certains sites géographiques, associés à des contextes pathologiques particuliers.

La détection de *V. nigripulchritudo* associé à des nauplii constituait également une première observation qui a pu être confirmée en plusieurs occasions depuis. Il est vraisemblable qu'il ne soit pas pathogène pour les larves et que les traitements associés à l'élevage larvaire (antibiotique, changements d'eau) ne permettent pas de le retrouver sur les stades post-larves. [Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que la dose d'érythromycine (2 ppm) utilisée en élevage larvaire ralentissait considérablement la croissance de souches de *V. nigripulchritudo*, sans toutefois l'inhiber totalement.] Toutefois, l'absence de détection de ce pathogène sur un échantillon issu d'un broyat de 40 animaux ne



signifie pas son absence au sein du lot de postlarves. Il apparaît ainsi possible que certains lots de postlarves soient porteurs de ce *Vibrio* pathogène, hypothèse qui avait été proposée comme explication à sa généralisation géographique.



3. Expression du phénomène à Sea Farm : étés 2000-2001 et 2001-2002

Un certain nombre de modifications du protocole habituel d'élevage de Sea Farm ont été apportés au cours pour les élevages de l'été austral 2000-2001. Un suivi a été mis en œuvre sur un certain nombre de ces élevages, afin d'appréhender au mieux la chronologie du déroulement du phénomène pathologique. Ce suivi s'est concentré sur les élevages ensemencés en saison chaude, et autour de la période critique de 50 à 60 jours d'élevage.

Notre travail a donc consisté en un suivi de l'évolution des flores bactériennes des hémolymphes à partir du poids moyen de 1 gramme (taille nécessaire à la réalisation des ponctions d'hémolymphe), ainsi qu'en l'analyse des causes de la mortalité le cas échéant.

Les bassins suivis pendant cette période avaient les modifications de protocole suivantes :

- longue mise en eau et fertilisation
- probiotique commercial OTEC et forte aération + faible renouvellement
- forte aération + faible renouvellement sans probiotique
- fond de bassin curé
- antibiothérapie préventive (aliment médicamenteux 12 jours / aliment normal 12 jours)
- probiotique commercial

Au cours de ces suivis, un épisode de mortalité attribué au Syndrome 93 s'est exprimé sur une grande partie des bassins au cours du mois de décembre 2000, faisant suite à une chute de la température matinale de 27 °C à environ 24,5 °C. L'analyse des hémocultures des crevettes moribondes nous a permis de distinguer les deux problèmes.

Les résultats de ce suivi montrent que *V. nigripulchritudo* peut être isolé des hémolymphes de crevettes présumées saines de tous les bassins suivis. Les premières apparitions de ce *Vibrio* ont lieu aux environs de 40 à 45 jours d'élevage, sous la forme de quelques colonies isolées au sein d'une hémoculture polymorphe. *V. nigripulchritudo* a également pu être mis en évidence dans l'eau interstitielle des sédiments des bassins, qu'ils soient curés (bassin 7) ou non (bassin 2) à des concentrations de l'ordre de 10^3 à 10^4 CFU / ml d'eau interstitielle au début de l'épisode de mortalité.

Les résultats de notre suivi montrent que le comptage de la flore bactérienne totale des hémolymphes n'est pas d'un grand intérêt. La flore bactérienne moyenne des hémolymphes varie sans relation évidente avec les paramètres du milieu. De même, l'apparition de la mortalité ne peut pas être reliée à des hémocultures quantitativement élevées.



L'ensemble des bassins suivis a été touché par des épisodes de mortalité au cours de ce suivi. Sur toutes les crevettes moribondes étudiées, une vibriose septicémique a pu être mise en évidence. Toutefois, il est notable que celle-ci commence par une infection impliquant plusieurs germes différents. *V. nigripulchritudo* n'est présent que dans une partie des crevettes moribondes. C'est seulement par la suite que *V. nigripulchritudo* est retrouvé dans toutes les crevettes moribondes, très probablement parce que c'est le plus pathogène des germes présents.

Ainsi, entre le 8 et le 12 décembre 2000 dans le bassin 2 (1 moribonde sur 2 infectée par *V. nigripulchritudo* le 8 décembre puis 4 sur 4 le 12 décembre) et entre le 22 et le 26 décembre 2000 sur le bassin 6 (3 sur 5 le 22 décembre puis 3 sur 3 le 26 décembre 2000). Cette observation a été confirmée lors des suivis de la saison chaude 2001-2002.

Ces éléments semblent confirmer que cette maladie est une pathologie opportuniste, dans laquelle les bactéries de l'environnement voire de la flore saprophyte de la crevette expriment leur pouvoir pathogène à l'occasion d'une altération de l'état physiologique ou immunitaire de l'animal.



Le déroulement serait donc le suivant, résumé sur la figure 2 suivante :


	Bassin	Crevettes	<i>V. nigripulchritudo</i>	<i>Vibrio</i> sp. (autres)	Mortalité
Avant	Équilibre	Bonne santé	Enzootique, Pression faible Effectif faible, <i>Souches virulentes minoritaires ?</i>	Saprophytes, Flore normale	Normale = basale (absence ou très faible)
Basculement = début	Déséquilibre 	Stress ?? → affaiblissement	Croissance forte ?? affectent les crevettes affaiblies par les perturbations du milieu <i>Proportion croissante de souches virulentes ?</i>		
		Mortalité due à une vibriose à plusieurs espèces	<i>Souches virulentes majoritaires ?</i>	opportunistes	début du pic
Pendant	Équilibre déplacé	Moindre stress. Mortalité due aux seuls germes très pathogènes	Très forte pression Effectif ++++ ? <i>Souches virulentes majoritaires ?</i>	Saprophytes, Flore normale	pic de mortalité
Après		mortalité chronique, aggravée aux pics de mue	Forte pression, effectif++ ? <i>Souches virulentes majoritaires ?</i>		chronique ou récurrente

Figure 2 : Schéma hypothétique de l'épidémiologie de *V. nigripulchritudo* dans la mortalité due au « Syndrome d'été » dans la ferme Sea Farm.

Avant *Vibrio nigripulchritudo* est enzootique au site de Seafarm.



= **Facteur déclenchant** : Cause écologique responsable d'un stress des animaux en élevage

Début Le facteur déclenchant va entraîner la mortalité de quelques crevettes d'une vibriose impliquant plusieurs espèces bactériennes, témoins de l'opportunisme de cette affection.

Pendant Parmi ces germes opportunistes, le plus pathogène (*V. nigripulchritudo*) devient prédominant et cause une pression infectieuse telle que cette vibriose est décelée comme un pic de mortalité important.

Après La pression infectieuse reste suffisamment importante pour que la pathologie devienne chronique, ou diminue un peu, de telle sorte qu'elle devient récurrente, souvent calquée sur les cycles de mue, affectant les animaux en mue.

Évolution temporelle des proportions de souches virulentes / non virulentes ? : Cette question pourrait être partiellement étudiée dès la disponibilité de la salle d'infection expérimentale du laboratoire à l'aide des souches de la collection. Les points d'interrogation montrent cette hypothèse.

L'apparition et l'expression de cette maladie correspondraient donc à la présence de facteurs de déséquilibre du milieu conduisant au déclenchement d'une pathologie opportuniste. Les causes de ces épisodes pathologiques seraient donc ces facteurs de déséquilibre, qualifiés dans ce cas de facteurs déclenchants de la mortalité. *V. nigripulchritudo* ne serait alors "que" le révélateur de ces déséquilibres des relations crevette / environnement / flore bactérienne. Toutefois, ce *Vibrio* (ou *a minima* certaines souches de cette espèce) ayant une pathogénicité très importante, les facteurs déclenchants peuvent n'être que des déséquilibres jugés "mineurs", voire passer inaperçus des observateurs.

Dans le cas des bassins suivis, les facteurs déclenchants probables ont souvent été des chutes de bloom associées à des valeurs stressantes de l'oxygène dissous matinal.

Parmi les éléments notables de cette série d'essais, il est intéressant de noter que :

- le bassin non curé a subi en premier et sans facteur déclenchant décelable la mortalité dès 50 jours d'élevage. Cette mortalité est d'abord discrète, puis prend une allure épizootique une semaine après (J57). Le bassin curé, témoin du bassin précédent (même date et lot d'ensemencement, même gestion de l'aliment et des renouvellements...) a subi la mortalité plus tard, et uniquement lorsque celle-ci a été déclenchée par une chute de bloom, accompagnée d'une valeur stressante de l'oxygène matinal. Cette comparaison ne portant que sur 2 bassins ne permet toutefois pas d'interprétation sur le rôle que pourrait jouer le sédiment ;
- le bassin prévu pour être fertilisé n'a malheureusement pas été fertilisé tout au long de l'élevage. Toutefois, ce bassin a connu un élevage sans problème jusqu'à 70 jours d'élevage, terme de notre suivi. Sur ce bassin, les variations du portage de *V. nigripulchritudo* dans les hémolymphes des crevettes saines semblaient également être liées aux variations des valeurs de l'oxygène dissous de l'après-midi ;
- les bassins peu renouvelés et fortement aérés ont eu des niveaux de portage de *V. nigripulchritudo* très faibles au cours de leur séquence à faible renouvellement. Le bassin 5 a ensuite subi un épisode de Syndrome 93 causé par *V. penaeicida*, qui a fortement affecté sa survie. Par la suite, les critères particuliers de gestion zootechnique étudiés sur ces bassins (renouvellement et probiotique) étant suspendus, il n'est pas possible de connaître leur effet sur la mortalité étudiée. L'effet d'un renouvellement limité compensé par une forte aération semble toutefois avoir été favorable du point de vue du portage de *V. nigripulchritudo*. La difficulté (et l'appréhension ?) de maintenir un milieu



aussi riche a poussé à augmenter les renouvellements. Leur hausse rapide pourrait avoir perturbé l'équilibre du système.

Comme au cours des élevages de l'année 1998-1999, la question d'une certaine contagion entre les bassins s'est posée (notamment l'effet de la mortalité du bassin 2 sur les bassins 3 et 4). Bien que ce phénomène, pressenti, soit extrêmement difficile à démontrer, il semble qu'une mortalité sur un des bassins de la ferme ferait peser sur les bassins voisins (bassins sous le vent par exemple) une certaine pression pathologique. Il est également possible que la mortalité fasse suite à des éléments climatiques subis simultanément par tous les bassins en élevage.

Du point de vue diagnostique, ces suivis semblent confirmer que la vibriose observée est une pathologie opportuniste. Il semble que les souches bactériennes en cause sont hautement pathogènes. A ce titre, tout déséquilibre du milieu (aussi infime qu'il puisse apparaître) susceptible de constituer un stress pour les animaux en élevage peut constituer le facteur déclenchant de cette maladie. Une fois la vibriose déclenchée, la pression infectieuse est telle qu'aucune mesure zootechnique corrective ne parvient à rétablir l'équilibre en faveur de l'hôte. Ainsi, dans le contexte de Seafarm où les souches très pathogènes de *V. nigripulchritudo* apparaissent maintenant enzootiques et bien installées, l'attention de l'aquaculteur devra porter à maintenir un milieu d'élevage le plus stable possible. Les valeurs stressantes de la concentration en oxygène dissous, les variations du phytoplancton notamment semblent pouvoir jouer un rôle majeur dans le déclenchement des épisodes pathologiques. Les facteurs à prendre en compte en priorité semblent être cette stabilité du phytoplancton. La stabilité des paramètres physico-chimiques pourrait peut-être être améliorée par des profondeurs d'eau plus importantes dans les bassins. Les taux de renouvellement de l'eau constitueraient sûrement le meilleur outil de gestion de la stabilité recherchée, couplée à l'oxygénation mécanique.

Au cours de la saison estivale 2001-2002, d'autres modifications ont été apportées et un suivi a également été mis en œuvre à la demande du Groupement des Fermes Aquacoles. Les données de ce suivi permettent de confirmer que les crevettes peuvent être porteuses de *V. nigripulchritudo* avant 50 jours d'élevage (dès 30 jours en 2001-2002) et en tout cas avant les épisodes de mortalité observés.

Ce suivi a de plus permis de confirmer l'étiologie bactérienne de la mortalité observée par un diagnostic thérapeutique sur un bassin expérimental dans lequel les crevettes ont été traitées à l'oxytétracycline en aliment médicamenteux.



Enfin, *V. nigripulchritudo* a pu être isolé de différents compartiments du milieu d'élevage, permettant notamment d'enrichir notre collection de souches environnementales. Ainsi des souches ont été isolées de :

- sédiment humide en assec
- eau et sédiment de bassins en élevage (Lemonnier, 2002)
- copépodes de bassins en eau
- épibiotique sur un crabe batailleur (*Portunus pelagicus*) du canal
- hémolymphes de crevettes sauvages (dans les bassins et dans le canal)
- hémocultures de *L. stylirostris* dans le canal d'amenée d'eau (prévalence = 1 / 13)
- eau de pompage en amont des pompes (3 souches archivées)



4. Etude de la pathogénicité de quelques souches

Aucune mesure zootechnique n'ayant été en mesure de contrer l'apparition de cette pathologie, deux hypothèses s'offraient :

- d'une part la « toxicité du site » d'élevage, de nature non connue mais qui serait susceptible, à un niveau subléthale d'affaiblir les crevettes et les rendre plus sensibles à ce *Vibrio* (des crevettes des mêmes lots sont élevées dans d'autres fermes sans mortalité anormale) ;
- d'autre part l'existence de souches de *V. nigripulchritudo* d'un type particulier à Sea Farm, de pathogénicité accrue par rapport aux autres sites d'élevage.

La pathogénicité d'une souche de *V. nigripulchritudo* (AM 102) isolée d'un épisode de mortalité hivernale attribué au Syndrome 93 a été montrée expérimentalement à Tahiti (Saulnier, com. pers.). Toutefois, aucune donnée ne documentait le pouvoir pathogène de souches associées à la mortalité estivale de Sea Farm.

Ne disposant pas (encore) d'une zone contrôlée de pathologie expérimentale, la caractérisation du pouvoir pathogène de nos isolats a porté sur :

- l'expression de facteurs toxiques dans les surnageants de culture pour les isolats provenant de sites extérieurs au laboratoire ;
- l'infection expérimentale par injection intramusculaire d'une souche isolée sur le site du laboratoire.

4.1. Facteurs toxiques sécrétés (potentiellement exotoxines)

Cette première approche consiste à évaluer la toxicité des surnageants de culture de souches bactérienne comme l'un des critères de pathogénicité. En effet, certaines souches pathogènes sécrètent dans le milieu de culture des produits toxiques pour les crevettes, comme cela a notamment été montré pour des souches pathogènes de Nouvelle-Calédonie (Goarant *et al.*, 2000) et qui peuvent correspondre à des exotoxines.

Cette étude a porté sur des souches d'origines différentes, notamment :

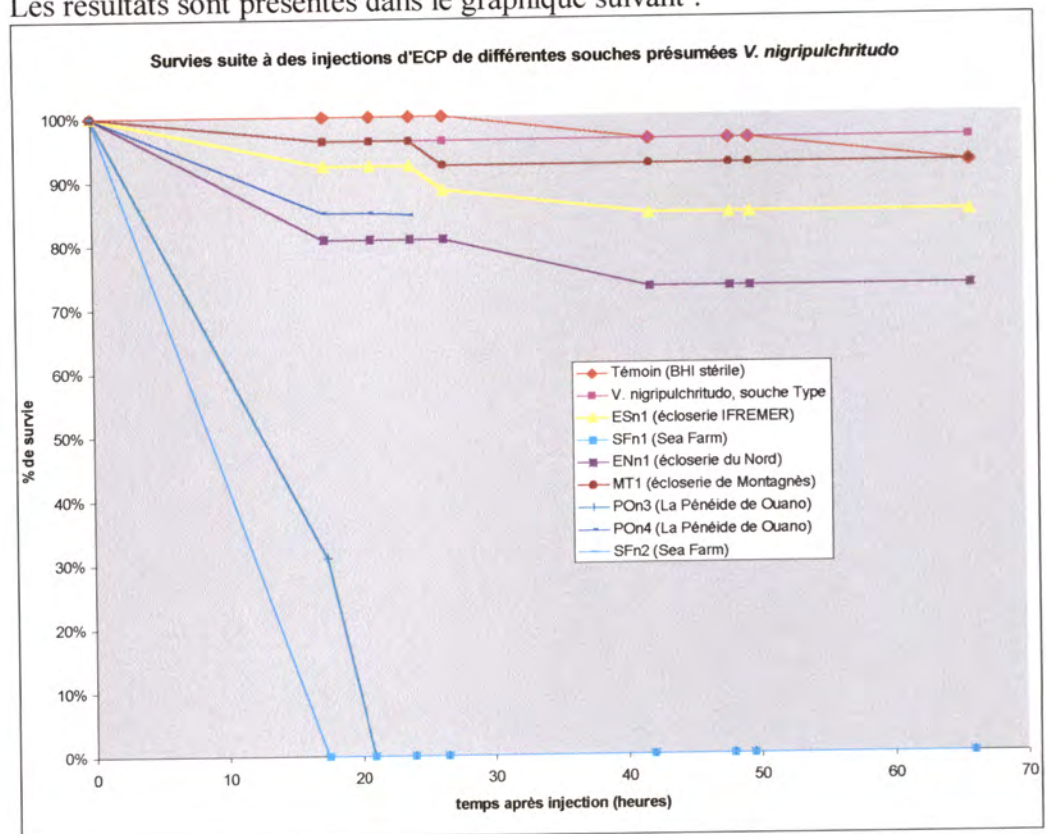
- souche type (*V. nigripulchritudo*^T)
- MT1 : isolat de l'écloserie de Montagnès, géniteur femelle moribonde, Juin 2000
- ESn1 : isolat de l'écloserie du LAC, géniteur femelle saine, Juin 2000
- ENn1 : isolat de l'écloserie du Nord, géniteur mâle sain, Juin 2000
- SFn1 et SFn2 : isolats de juvéniles moribonds de Sea Farm, hémocultures monomorphes, Mars 2000.
- PON3 et PON4 : isolats de juvéniles sains de La Pénéide de Ouano, hémocultures polymorphes, avril 2002



Les souches sont cultivées 48 heures à 28°C en milieu riche (BHI + 2% NaCl). Les cultures sont ensuite centrifugées 10 minutes à 14000 rpm. Le surnageant est filtré à 0,2 µm et injecté (100 µl en intramusculaire) à deux réplicats de 13 crevettes saines d'environ 15 g de poids moyen pour chaque souche. La stérilité des surnageants est vérifiée en déposant 50 µl sur une boîte de Marine Agar.

Le témoin est constitué de milieu de culture stérile.

Les résultats sont présentés dans le graphique suivant :



L'injection de surnageants de culture des souches testées de *V. nigripulchritudo* ne provoque pas de mortalité significative sauf pour les deux isolats de la ferme Sea Farm et l'un des 2 isolats testés de la ferme Pénéide de Ouano. La souche isolée de l'éclouerie du laboratoire en particulier ne sécrète pas de quantités léthales de facteur toxique. Il a donc été décidé de tester cette souche en infection expérimentale avant même de disposer de l'ensemble de la zone de pathologie expérimentale. Plus tard, des souches d'autres origines ont pu être testées lors de la mise en service de la zone de pathologie expérimentale.



4.2. Infections expérimentales à l'aide de souches de *Vibrio nigripulchritudo* : résultats préliminaires

4.2.1. Matériels et méthodes :

Ne disposant pas (dans un premier temps) de zone d'infection expérimentale, cette étude n'a d'abord (pour des raisons zoosanitaires) porté que sur les 3 souches isolées du site du LAC :

ESn1 : éclosion IFREMER, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000

ESn2 : éclosion IFREMER, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000

ESn3 : éclosion IFREMER, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000

Les souches sont cultivées en milieu de ZoBell pendant 24 heures à 30°C sous agitation permanente. La concentration bactérienne est évaluée par une lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 600 nm par rapport à une courbe étalon établie préalablement. Environ 100 à 1000 CFU sont injectées en intramusculaire à des crevettes saines. Le témoin est constitué de l'injection d'un volume identique de milieu de culture stérile.

Par la suite, les souches suivantes ont été testées :

Vibrio nigripulchritudo souche Type (Baumann *et al.*, 1971)

MT2 : éclosion de Montagnès, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000.

MT3 : éclosion de Montagnès, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000.

MT4 : éclosion de Montagnès, bactériologie de larves saines (Nauplii de 2 jours), juin 2000.

ESn2 : éclosion IFREMER, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000.

ENn2 : éclosion du Nord, hémoculture monomorphe, géniteur femelle moribond, juin 2000

ENn3 : éclosion du Nord, hémoculture polymorphe, géniteur femelle saine, juin 2000

POn2 : La Pénéide de Ouano, hémoculture polymorphe, juvénile sain, avril 2002.

POn3 : La Pénéide de Ouano, hémoculture polymorphe, juvénile sain, avril 2002.

POn4 : La Pénéide de Ouano, hémoculture polymorphe, juvénile sain, avril 2002.

SFn1 : Sea Farm, hémoculture monomorphe, juvénile moribond, pic de mortalité, mars 2000.

SFn2 : Sea Farm, hémoculture monomorphe, juvénile moribond, pic de mortalité, mars 2000.

SFn27 : Sea Farm, bactériologie de sédiment de bassin, pic de mortalité, décembre 2000.

SFn32 : Sea Farm, hémoculture polymorphe, juvénile sain, suivi, décembre 2000.

Wn3 : Webuihoone, hémoculture monomorphe, juvénile moribond, épisode de mortalité, janvier 2001



4.2.2. Résultats :

Les résultats, consignés dans le tableau suivant font apparaître de grandes variations de pouvoir pathogène entre les différents isolats.

Souche	Origine	Nombre de CFU injectées / crevette	Survie à 72 heures (* : à 48 heures)
Souche type	Collection	~ 200	100%
ESn1	Écloserie Ifremer	~ 1000	96% *
ESn2		~ 1000	100% *
ESn3		~ 1000	96% *
ENn2	Écloserie du Nord	~ 600	80%
ENn3		~ 600	100%
MT2	Écloserie de Montagnès	10 - 100	65%
MT3		~ 420	100%
MT4		~ 340	100%
POn2	La Pénéide de Ouano	~ 270	0%
POn3		~ 60	0%
POn4		~ 130	100%
SFn1		~ 1400	0%
SFn2	Sea Farm	~ 630	0%
SFn27		~ 500	33%
SFn32		~ 500	60%
Wn3	Webuihoone	~ 600	75%

Certaines souches (grisées en foncé sur le tableau) provoquent 100 % de mortalité en moins de 72 heures. D'autres (non grisées) ne donnent aucune mortalité significative en 48 à 72 heures et apparaissent ainsi non pathogènes (dans nos conditions expérimentales). Enfin, certaines souches (gris clair) donnent des survies intermédiaires (20 – 80%) en 72 heures. Les résultats de ces premiers essais devront être confirmés et précisés, toutefois ils montrent déjà :

- une grande variabilité du pouvoir pathogène entre les différentes souches, dans nos conditions d'infection expérimentale ;
- la « cohabitation » sur le même site de souches pathogènes et non pathogènes (cf. POn 2, POn 3 et POn 4, isolées le même jour et dans les mêmes conditions à La Pénéide de Ouano) ;
- que les souches très pathogènes (mortalité totale en moins de 72 heures) proviennent toutes de Sea Farm ou de la ferme située immédiatement sous le vent de celle-ci : La Pénéide de Ouano.



On note enfin sur ces résultats préliminaires une bonne corrélation entre la survie à l'injection de bactéries vivantes et l'injection d'un surnageant de culture ultrafiltré. Ainsi, la toxicité des surnageants de culture pourrait représenter un bonne première approche dans l'évaluation du pouvoir pathogène des souches.



5. Conclusions et perspectives

A la vue des résultats précédents, l'hypothèse de l'existence sur le site de Sea Farm et à proximité de souches à pathogénicité accrue apparaît vraisemblable. La description de la répartition de ce pathogène dans les fermes et écloséries aquacoles de Nouvelle-Calédonie devra également être précisée au cours d'une nouvelle campagne de prélèvements qui permettront d'enrichir la collection. Toutefois, la mise en évidence récente de souches pathogènes de cette espèce dans une ferme à laquelle aucune pathologie n'est associée soulève certaines nouvelles questions.

- ✓ L'arrivée de ce pathogène sur ce site est-elle récente, à la faveur des vents dominants ? Dans ce cas, la pathologie s'exprimera-t-elle dans les prochains élevages ?
- ✓ Ou ce pathogène est-il présent de longue date sur ce site sans exprimer son pouvoir pathogène ? Dans ce cas, quelles sont les conditions particulières à Sea Farm (zootechniques, nutritionnelles, toxiques, pathologiques sous jacentes...) qui expliqueraient l'expression de la maladie sur cette ferme ?

Afin d'étudier l'épidémiologie de cette espèce (notamment répartition géographique et équilibre entre souches pathogènes et saprophytes), des infections expérimentales seront à nouveau mises en oeuvre à l'aide des souches collectées dans les différents sites d'élevage, ainsi qu'avec les 3 souches collectées en amont de la station de pompage de Sea Farm. Il conviendra dans un premier temps de standardiser la méthode d'infection (conditions de cultures, notamment température, voie d'administration, concentrations bactériennes, durée de l'essai...) afin de disposer d'une méthode d'évaluation rapide de la pathogénicité d'un nombre élevé de souches. A cette occasion, nous nous efforcerons de confirmer ou d'infirmer le pouvoir pathogène des souches pour lesquelles les premiers essais n'ont pas permis de le déterminer avec précision. Ces infections devraient permettre d'établir une typologie des souches en fonction de leur pouvoir pathogène pour *Litopenaeus stylirostris*. La corrélation avec le pouvoir toxigène sera également vérifiée à cette occasion.

Parallèlement, une étude de typage moléculaire d'une sélection de souches cliniques et environnementales de différentes origines géographiques sera réalisée en électrophorèse en champ pulsé (PFGE), technique actuellement disponible à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. L'objectif de cette étude serait bien évidemment de confronter la typologie « pathogénicité » avec la typologie moléculaire dans une optique de meilleure compréhension de l'épidémiologie du phénomène.

Enfin, la connexion de notre programme avec le volet Taxovir du programme CRB (« Collection d'huîtres et de leurs agents pathogènes : un outil pour les



recherches sur les interactions hôtes/pathogènes chez les mollusques bivalves marins ») initié et coordonné par le Laboratoire Génétique et Pathologie de La Tremblade devrait permettre, par une approche de comparaison (hybridation soustractive) des génomes de souches pathogènes et saprophytes de mettre en évidence les gènes impliqués dans la virulence de ces souches.



Références bibliographiques :

Baumann P., L. Baumann, M. Mandel, R.D. Allen (1971) Taxonomy of marine bacteria : *Beneckea nigripulchrituda* sp. n. *Journal of Bacteriology* **108**:1380-1383

Baumann P., L. Baumann, S.S. Bang, M.J. Woolkalis (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium* : abolition of the genus *Beneckea*. *Current Microbiology* **4**:127-132

Costa R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Le Groumellec, P. Grimont (1998) Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**:297-309

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

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

Lemonnier H. (2002) Suivis de la qualité du milieu d'élevage dans le cadre du syndrome d'été. Fiche biotechnique 2002-04 du Laboratoire Aquacole de Nouvelle-Calédonie, 28 pages.



Annexe : Liste des souches citées dans le rapport

souche	Origine géographique	source	bactério	date	Animal
MT1	écloserie de Montagnès	hémoculture	monomorphe	Juin 2000	Moribond
MT2	écloserie de Montagnès	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
MT3	écloserie de Montagnès	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
MT4	écloserie de Montagnès	Broyat de nauplii	polymorphe	Juin 2000	Sains
ESn1	écloserie IFREMER	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
ESn2	écloserie IFREMER	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
ESn3	écloserie IFREMER	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
ENn1	écloserie du Nord	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
ENn2	écloserie du Nord	hémoculture	monomorphe	Juin 2000	Moribond
ENn3	écloserie du Nord	hémoculture	polymorphe	Juin 2000	Sain
POn2	Pénéide de Ouano	hémoculture	polymorphe	Avril 2002	Sain
POn3	Pénéide de Ouano	hémoculture	polymorphe	Avril 2002	Sain
POn4	Pénéide de Ouano	hémoculture	polymorphe	Avril 2002	Sain
SFn1	Sea Farm	hémoculture	monomorphe	Mars 2000	Moribond
SFn2	Sea Farm	hémoculture	monomorphe	Mars 2000	Moribond
SFn27	Sea Farm	Sédiment de bassin	polymorphe	Décembre 2000	Pic de mortalité
SFn32	Sea Farm	hémoculture	polymorphe	Décembre 2000	Sain
Wn3	Webuihoone	hémoculture	monomorphe	Janvier 2001	Moribond
Souche type	Baumann <i>et al.</i> , 1971	CIP 103195			

