

## INFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES DE CRUSTACES

### PENEIDES (*PENAEUS JAPONICUS* BATE) EN ELEVAGE

Par

S. EGUSA<sup>1)</sup>, J.C. GUARY et M. GUARY<sup>2)</sup>

#### INTRODUCTION

—Durant les cinq dernières années, au Japon, certains élevages de Pénéides ont été gravement et fréquemment endommagés par des attaques de bactéries et de champignons.

Jusqu'à présent, les maladies bactériennes affectant les Crustacés en eau libre ou en élevage se limitaient, pour l'essentiel, à la maladie des homards (*Gaffkemia*) causée par le microcoque *Gaffkya homari* (HITCHENER et SNIESZKO, 1947), et aux maladies de l'exosquelette (Shell disease ou Brown spots disease, en anglais) provoquées par des bacilles chitinodestructeurs et observées chez plusieurs crabes (GORDON, 1966 ; ROSEN, 1967), chez le homard (HESS, 1937) et chez la crevette *Palaeomon serratus* (ANDERSON et CONROY, 1968). —

La maladie qui frappe la crevette *Penaeus japonicus* en élevage est due à une bactérie du genre *Vibrio* (Spirillaceae, Pseudomonadales). Quelques vibrioses ont déjà été mises en évidence chez des Poissons marins (COLWELL et MORITA, 1964).

Chez *P. japonicus* adulte, tout l'appareil digestif semble attaqué : l'hépatopancréas est cependant l'organe le plus touché. A ce degré d'infection, le telson puis l'abdomen et les différents organes céphalothoraciques prennent une coloration rouge très visible ; l'infection gagne tout le corps, la mort survient rapidement (Figure 1).

Cette vibriose affecte également les post-larves du Pénéide. Mais il importe surtout à l'aquaculteur de connaître le terrain qui favorise la propagation de cette maladie, les éléments nouveaux qui permettent à cette bactérie de se développer aussi activement aujourd'hui dans les élevages de Pénéides.

Actuellement, au Japon, de nouvelles maladies affectent l'homme et sont attribuées, à juste raison semble-t-il, à l'utilisation anarchique d'insecticides et à la grande dispersion de déchets industriels comme certains métaux lourds

---

1) Laboratory of Aquaculture biology. Dpt. of Fisheries. TOKYO Univ.

2) Station Marine d'Endoume. 13007 MARSEILLE.

(mercure, cadmium) qui se concentrent jour après jour dans la chaîne alimentaire.

La position de certains élevages japonais, à proximité de grandes industries, semble accréditer cette hypothèse.

Insecticides et métaux lourds, présents en quantité de plus en plus forte dans la nourriture offerte aux Pénéides adultes et aux post-larves, en affaiblissant l'hôte, prépareraient ainsi un terrain des plus favorables à l'infection bactérienne.

Si ce problème n'est pas encore celui de l'aquaculteur français, il ne doit pas le laisser tout à fait indifférent.

Une mycose décrite pour la première fois en 1968 par ISHAKAWA (1968) est également la cause d'une très forte mortalité observée dans les élevages de *P. japonicus*.

Cette maladie est caractérisée par la présence de nombreuses taches noires sur les branchies du Pénéide, d'où son nom anglo-saxon de "black gill disease".

ISHIKAWA avait reconnu la présence d'un champignon dans les filaments branchiaux des Crustacés atteints : il avait alors attribué la cause de cette maladie à ce champignon sans toutefois pouvoir l'isoler en culture pure.

En 1972, EGUSA et UEDA ont isolé l'agent pathogène responsable à partir de filaments branchiaux de crevettes atteintes de cette mycose.

Une culture monoaxénique de ce champignon a été réussie sur un milieu comportant 1 pour cent de chlorure de sodium, et composé de dextrose, de soytone (Nissan) et d'agar, et de quelques bactéricides puissants comme le chloramphénicol.

Sa morphologie et sa reproduction ont été étudiées pour l'identifier : le mycelium est ramifié, cloisonné et composé d'hyphes généralement hyalines de 3 à 4,5  $\mu$  de diamètre. En se développant sur le milieu de culture, la colonie produit un pigment brunâtre caractéristique.

Le mycelium donne naissance principalement à deux types de conidies, portées par des conidiophores simples ou quelques fois ramifiés : les macroconidies, en forme de canoe, sont le plus souvent tetra ou hexacellulaires, et mesurent de 30 à 50  $\mu$  (figure 2).

Les microconidies sont plus ovoïdes et plus courtes (6 à 10  $\mu$ ) (Figure 2).

Aucun autre organe de reproduction n'a pu être observé *in vivo* ou *in vitro*.

Ces critères morphologiques permettent de penser qu'il s'agit d'un Champignon imparfait ou Deutéromycète, appartenant au genre *Fusarium*.

Des injections intra-musculaires d'une suspension de conidies dans de l'eau de mer stérilisée ( $10^5$ /ml) sont effectuées pour démontrer la pathogénicité du champignon.

A chaque crevette en expérience, on injecte 50  $\mu$ l de cette suspension. Aux crevettes du lot témoin, placées dans un bassin et dans des conditions identiques, on injecte le même volume d'eau de mer stérilisée.

Quatre jours après le début de l'expérience, deux crevettes meurent. Il y a par la suite, plusieurs morts par jour. Aucun animal ne résiste aux deux semaines d'expérience.

L'observation microscopique révèle la présence de nombreuses taches noires sur les branchies des crevettes mortes. Le dépôt de pigment brunâtre se fait invariablement dans le filament branchial, autour de la conidie qui s'y est logée et des hyphes qui s'y sont développées. (Figure 3).

Cependant, on n'observe pas de dépôt de pigment dans les filaments branchiaux presque complètement envahis par le mycelium.

De tous les fragments de filaments branchiaux infectés et cultivés sur le milieu décrit précédemment à 25-27°C, le même champignon que celui qui a été injecté a été isolé pratiquement en culture pure.

Par contre, aucun décès n'est survenu parmi le lot témoin durant le même temps, et l'examen des branchies de ces Crustacés n'a pas révélé la présence de ce champignon pathogène.

De ces observations et expériences, il ressort que :

a - les filaments branchiaux des crevettes atteintes de la maladie des branchies noires sont porteurs d'un champignon,

b - ce champignon est capable de provoquer la maladie et la mort de *P.japonicus* lorsque ses conidies sont injectées par voie intra-musculaire au Pénéide,

c - dans ce cas, on peut isoler ce champignon, sans exception, à partir des filaments branchiaux des crevettes infectées,

d - les branchies des crevettes saines (lot témoin) ne sont jamais porteuses de ce champignon.

Nous pouvons donc en conclure que ce champignon est bien l'agent pathogène qui provoque la maladie des branchies noires chez *P.japonicus*.

Le genre *Fusarium* est un genre assez commun de Deutéromycète, très cosmopolite. Il est surtout connu comme parasite du riz au Vietnam.

C'est la première fois qu'il est identifié chez des animaux marins, en particulier chez des Crustacés.

Des expériences préliminaires semblent démontrer sa toxicité : ses toxines, solubles dans l'eau, sont capables de tuer une culture d'*Artemia salina* (HASHIMOTO, com. pers.).

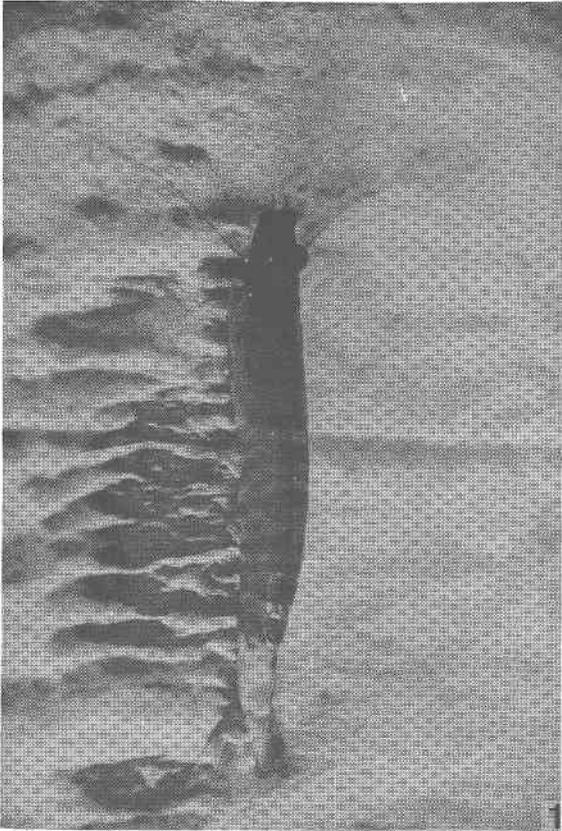
L'expérience d'injection a été reprise quelque temps après dans le but de confirmer la pathogénicité de ce champignon et de connaître le ou les organes principalement atteints par l'infection.

A une quinzaine de Pénéides en bonne santé, on fait une injection intra-musculaire d'une suspension de conidies dans de l'eau de mer stérilisée (même concentration que précédemment). quinze minutes après l'injection, on prélève 50 µl d'hémolymphe à la première crevette : un comptage des conidies présentes dans ce volume, un frottis "sanguin" (coloration et fixation à l'aide de la solution de May-Grünenwald Giemsa) et des cultures de fragments de filaments branchiaux et d'hémolymphe sur le milieu décrit précédemment sont effectués.

Ces opérations sont ensuite répétées trente minutes, une, deux, trois, cinq, dix et vingt-quatre heures après l'injection. On s'aperçoit ainsi que les conidies ne séjournent qu'un temps très bref dans l'hémolymphe (Figure 5).

Quatre jours après l'injection, on constate que toutes les conidies ont quitté l'hémolymphe.

L'examen des frottis sanguins révèle que la forme des conidies est différente : elles sont plus courtes et plus ovoïdes (figure 4). Parallèlement, l'observation des filaments branchiaux des crevettes en expérience montre l'apparition de taches noires visibles à l'oeil nu, quarante huit heures environ après



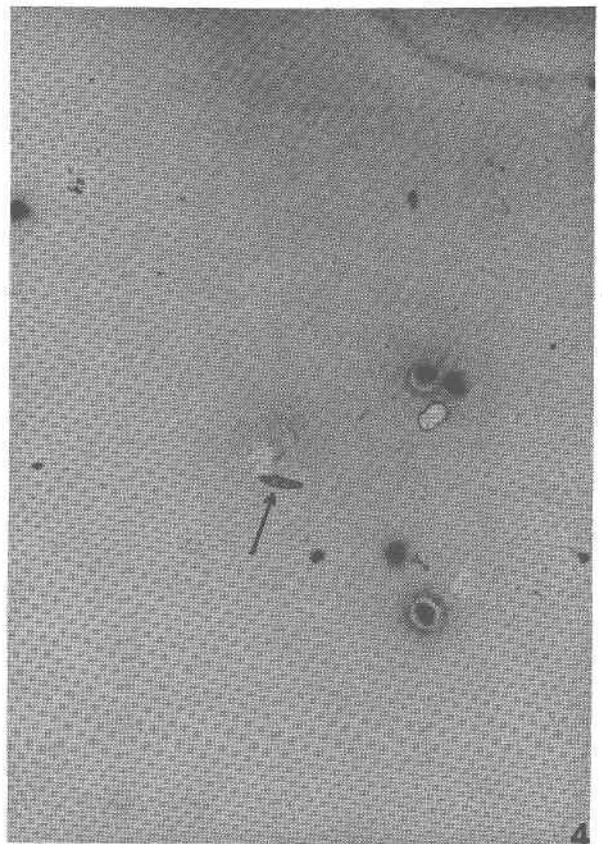
Penaeus japonicus atteinte de la vibriose



macroconidies et quelques rares microconidies



pigmentation noire des hyphes



conidies sur un frottis sanguin.

l'injection. Seules, les branchies paraissent atteintes.

L'examen des cultures de fragments de filaments branchiaux prélevés déjà quinze minutes, puis trente minutes, une, deux, trois, cinq, dix heures (etc..) après l'injection trahit la présence du champignon.

Les conidies injectées par voie intra-musculaire sont donc très rapidement conduites par le courant sanguin jusqu'aux filaments branchiaux du Pénéide.

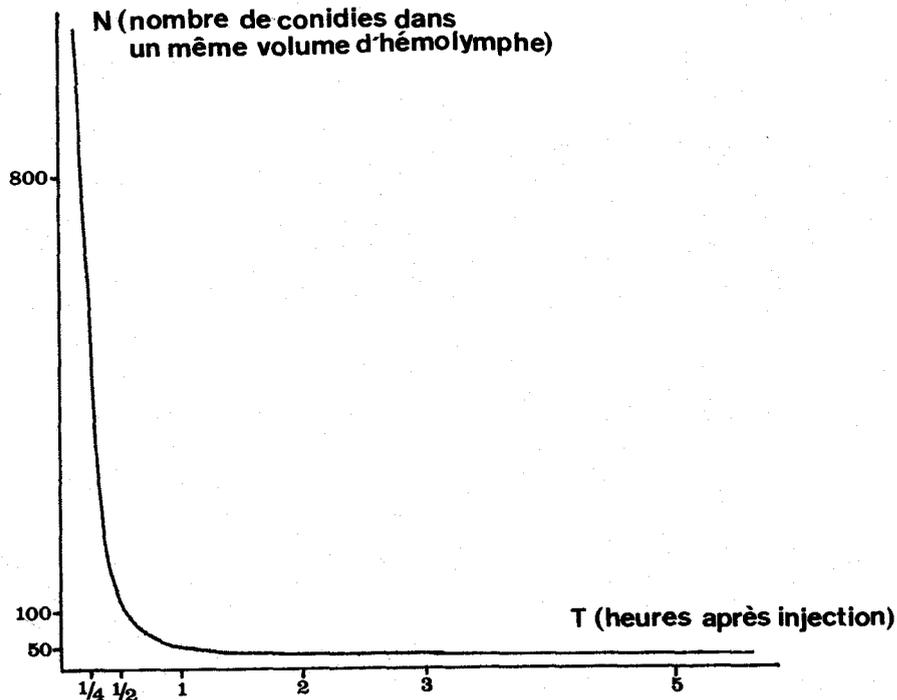


Figure 5 - Courbe de distribution des conidies dans l'hémolymphe de *P. japonicus* en fonction du temps.

Parvenues dans le tissu branchial, elles développent un mycelium qui se ramifie rapidement, entouré de pigment brunâtre (Figure 6).

Certains filaments branchiaux peuvent être totalement envahis par les conidies, et on ne distingue plus les cellules du tissu branchial (Figure 7).

Le courant sanguin branchial est complètement perturbé, les branchies se nécrosent et le Pénéide meurt rapidement.

L'infection se localise donc dans le tissu branchial de *P. japonicus*, et uniquement dans ce tissu.

Dans les conditions normales, par quelle voie ce champignon atteint-il les branchies du Crustacé ?

Deux voies peuvent être empruntées :

a - la voie interne : absorption de germes pathogènes en même temps que la nourriture, transport dans l'hémolymphe jusqu'aux branchies,

b - la voie externe : pénétration directe du germe pathogène à travers la membrane chitineuse des filaments branchiaux.

L'expérience utilisant des aliments porteurs de germes pathogènes ne fournit pas de résultats très satisfaisants. Aucune conidie ne peut être mise en évidence dans l'hémolymphe, alors que toutes les cultures de fécès, de fragments d'intestin

et certaines cultures de fragments de filaments branchiaux sur le milieu décrit précédemment sont positives.

Tout au plus pouvons-nous constater l'extrême résistance de ce champignon aux attaques enzymatiques et aux dures conditions de pH et d'oxygénation rencontrées dans l'appareil digestif.

Il est donc probable que les filaments branchiaux de ces crevettes soient infectés par pénétration directe des conidies présentes dans l'eau du bac d'élevage après la dissolution de l'aliment composé que l'on propose à ces Pénéides.

La voie externe, directe, reste donc le seul mode de pénétration des conidies dans les filaments branchiaux. Pour tenter de le démontrer, trois expériences simples, fondées sur le même principe, sont effectuées : il s'agit de favoriser le contact entre les conidies de ce champignon et les filaments branchiaux de *P. japonicus*, en conservant quelques crevettes dans un faible volume d'eau de mer, non renouvelé, auquel on ajoute un nombre important de conidies.

En aucun cas, ces expériences suffisent à provoquer l'apparition des taches noires visibles à l'oeil nu sur les branchies. Cependant, l'observation microscopique nous révèle, à plusieurs reprises, la présence de conidies comme piquées au sommet ou sur les côtés des filaments branchiaux et développant déjà un mycelium au sein du tissu branchial (Figure 8).

L'observation des cultures faites à partir de fragments de filaments branchiaux montre que l'infection apparaît lentement à partir du quatrième jour d'expérience et ne devient importante qu'à partir du sixième jour.

Aucune mortalité ne survient durant ces expériences. Par contre, on peut constater que la virulence d'un stock de conidies placées dans un faible volume d'eau de mer réoxygénée par bullage décroît jour après jour.

La troisième expérience, au cours de laquelle on renouvelle chaque jour le stock de conidies, démontre que l'attaque par la voie externe directe peut être très violente si la concentration de conidies dans l'eau du bassin d'élevage est constamment élevée. Ce champignon semble donc capable de pénétrer directement à l'intérieur des filaments branchiaux de *P. japonicus*.

En 1958, SORDI a étudié une mycose assez semblable chez la langouste et chez le homard en aquarium : il pense que les conidies des champignons imparfaits des genres *Ramularia* et *Didymaria* peuvent pénétrer dans les filaments branchiaux de ces Crustacés au travers de lésions de la membrane chitineuse. Dans ce cas, comme dans celui de *P. japonicus*, il peut s'agir d'un phénomène enzymatique.

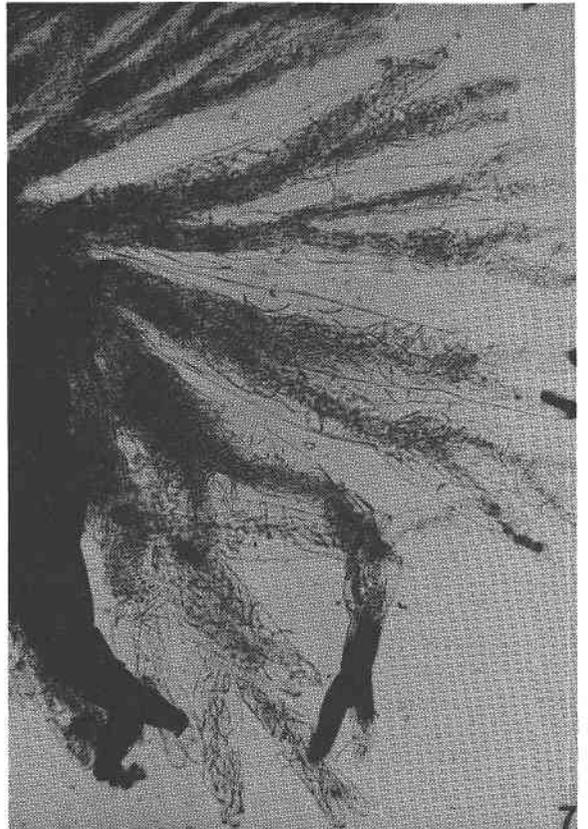
L'attaque de la paroi chitineuse entourant les filaments branchiaux peut être le fait de chitinases présentes dans les conidies ou le mycelium du champignon, ou de la chitinolyse induite par les nombreuses bactéries qui se développent à la surface des filaments branchiaux.

En effet, les branchies des crevettes élevées en bassin sont, pour la plupart rapidement recouvertes de cyanophycées, de diatomées et de bactéries sur lesquelles s'agglomèrent les nombreuses particules organiques en suspension dans l'eau. Leur présence facilite donc également le contact du champignon avec son hôte. Parmi ces bactéries, on note surtout un grand nombre de *Leucothrix* (ISHIKAWA, 1967) qui jouent donc un rôle particulièrement important dans la pénétration du champignon (Figure 8).

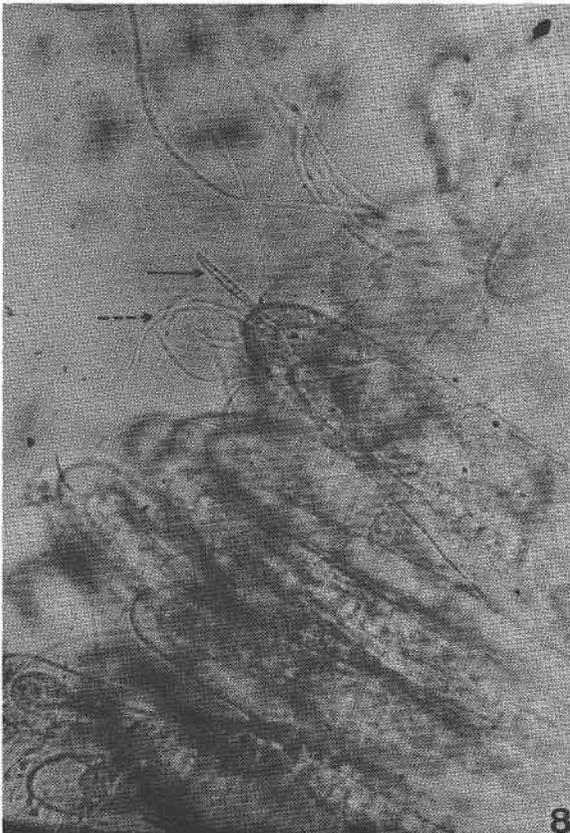
Au cours de ces expériences, trois crevettes ont mué. On constate ainsi,



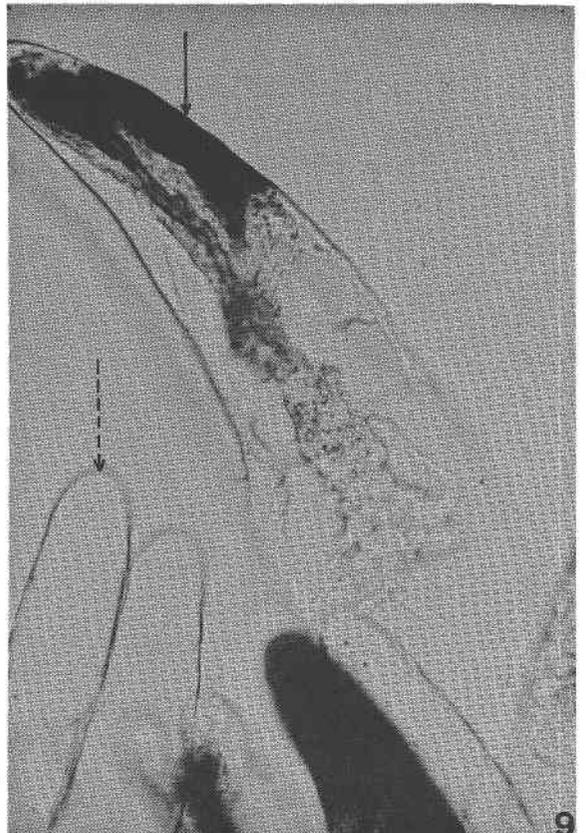
mycélium dans les branchies



filament branchial envahi par des conidies



présence de leucothrix sur les branchies



filaments branchiaux après une mue

chez une crevette ayant reçu une injection intra-musculaire de conidies quatre vingt dix heures auparavant, que la plupart des filaments branchiaux exuviés contiennent des hyphes, des conidies et une grande quantité de pigment brunâtre. Le tissu branchial exuvié par la même occasion est plus ou moins rétracté dans la partie médiane du filament (Figure 9). Certains autres filaments exuviés ne sont plus représentés que par la membrane chitineuse et ne contiennent ni tissu branchial, ni germes pathogènes (Figure 9) : il est probable que ces filaments n'aient pas encore subi l'attaque du champignon au moment de l'exuviation.

Les nouveaux filaments branchiaux ne paraissent pas gravement infectés : on y trouve peu ou pas de conidies, mais leurs cultures sur le milieu précédemment décrit deviennent positives après deux ou trois jours.

Le phénomène de mue n'est donc apparemment pas trop perturbé. Peut-être permet-il même aux Pénéides infectés de se débarrasser de la plus grande partie, sinon de la totalité, des germes pathogènes contenus dans les filaments branchiaux ?

D'autres expériences sont nécessaires pour vérifier ces observations et confirmer ces hypothèses. Il semble cependant évident que, dans un bassin d'élevage à population dense, insuffisamment oxygéné, et où les éléments organiques en suspension dans l'eau sont nombreux, cette mycose aura toute chance de se propager rapidement sans que la mue soit un moyen de défense suffisant pour les Pénéides infectés.

Il reste à découvrir le fongicide efficace, et surtout, la cause exacte de l'apparition de ce champignon, de nos jours, au Japon, dans les bassins d'élevage de Crustacés, et le support véritable de l'induction et de la propagation de cette mycose.

Nous devons rester attentifs à toute recherche effectuée dans cette direction, et tendant à accroître nos connaissances sur l'écologie de ce champignon, sur ses conditions de développement (paramètres physiques et chimiques de l'eau de mer, qualité du sédiment, état des sujets attaqués, etc...), car nos bassins d'élevage ne sont nullement à l'abri des attaques de ce pathogène cosmopolite.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON J.I. et CONROY D.A., 1968

Proc. 3rd. Sympos. Mond. Comm. Off. Intern. Epizoot., 3 : 8 p.

COLWELL R.R. et MORITA R.Y., 1964

J. Bacteriol., 88 : 381 p.

EGUSA S. et UEDA T., 1972

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38 : 1253 - 1260.

GORDON I., 1966

Mem. Inst. Fondam. Afr. noire., 77 : 27 - 86.

HESS E., 1937

J. Biol. Bd. Canada, 3 : 358 - 362.

HITCHNER E.R. et SNIESZKO S.F., 1947

J. Bacteriol., 58 : 48 p.

ISHIKAWA Y., 1967

Fish Pathol., 2, (1) : 68 - 72.

ISHIKAWA Y., 1968

Fish Pathol., 3 (1) : 34 - 38.

ROSEN B., 1967

J. Invertebrate Pathol., 9 : 348 - 353.

SORDI M., 1958

Riv. Parasitol., 19 : 131 - 137.

STEWART J.E. et RABIN H., 1970

A Symposium on diseases of fish and shellfish, Am. Fish. Soc., spec. Public., 5 (2).

DISCUSSION

LEDOUX : Est-ce que cette mycose se produit sur tous les stades de la crevette, ou est-ce qu'il y a des stades préférentiels ?

GUARY : Les observations n'ont portées que sur des adultes pour le moment et à ma connaissance, aucun cas d'infection par ce champignon n'a été démontré dans les bassins de post-larves ou de larves.

LASSERRE : Est-ce qu'on peut suspecter que les insecticides ou les métaux lourds pourraient induire des vibrioses ou favoriser l'apparition des vibrioses ? A-t-on fait des dosages d'insecticides et de métaux lourds à chaque fois que les vibrioses ont été diagnostiquées ou plutôt a-t-on diagnostiqué des vibrioses dans des cas où il y avait pollution ?

GUARY : C'est plutôt ce dernier cas. Il s'agit d'une hypothèse, il n'y a pas eu encore de mesures faites à ce sujet, ni de dosages, on a simplement constaté la coïncidence qui est presque une évidence. Au Japon, c'est surtout là que ça se produit du fait de la densité importante des grosses industries et de la position des bassins d'élevage, les industries sont déjà pour la plupart dans l'eau, on prend sur la mer pour construire.

HONG : Il me semble avoir déjà vu cette maladie, il y a 5 ou 6 ans au Japon, mais à ce moment-là on avait pensé que c'est une maladie environnementale. On avait trouvé une corrélation entre la maladie des branchies noires et on avait lié cette maladie avec la présence d'hydrogène sulfuré. Mais on ne savait pas qu'il s'agissait d'une mycose à cette époque.

GUARY : A ce moment là, le champignon n'avait pas été découvert.

HONG : Vous parlez ensuite d'une autre bactérie ; est-ce que vous avez trouvé une corrélation entre le nombre d'individus atteints par cette maladie et les élevages où il y a un mauvais environnement ?

GUARY : *Leucothrix* se fixe sur les branchies de *P. Japonicus* dans pratiquement tous les élevages. Cependant, dans certains élevages, dans la mesure où le substrat est très réduit, où l'environnement est mauvais pour le *P. Japonicus*, on a remarqué que tous les filaments branchiaux étaient envahis non seulement de *Leucothrix*, mais d'un tas de micro-organismes, qui sont un piège à particules organiques, et éventuellement à germes pathogènes.

LE BITOUX : Les *Aeromonas*, *Pseudomonas*, Vibrions et Myxobactéries sont des bactéries communes de l'environnement des Poissons et des Crustacés. Il semble qu'il en soit de même pour les champignons *Fusarium*. Ce sont des bactéries et des champignons qui ne deviennent pathogènes que lorsque les conditions de milieu et un état affaiblit de l'hôte le permettent. C'est une question sur laquelle je reviendrai.

HONG : Avez-vous fait des essais pour induire cette maladie sur des stades jeunes ?

GUARY : Non, pas encore.

LE BITOUX : J'ai lu dans des publications que les japonais utilisaient un cilié pour limiter les proliférations bactériennes dans leurs bacs d'élevage de crevettes. Est-ce que vous en avez entendu parler ?

GUARY : Non, je ne peux pas fournir de confirmation à ce sujet.

DRACH : Une remarque générale : la pollution crée sans doute un état d'affaiblissement qui favorise les maladies, mais toute concentration plus élevée que dans la nature d'individus comme en comportent naturellement nos élevages, favorise évidemment les épidémies.

Deuxième remarque : je ne pense pas que les mues successives, mêmes rapides, puissent guérir la maladie. Les dernières images que vous avez montrées, indiquent que toute la partie terminale du filament branchial, qui est la partie par laquelle le filament fait sa croissance pour la mue suivante, est résorbée et obliterée. A ce moment là l'épithélium se referme au-dessous de la partie malade et à la mue suivante vous aurez un tube branchial beaucoup plus court qui sera sain, mais tous ceux qui n'ont pas subi cette nécrose totale de la partie terminale du filament resteront infectés.

GUARY : On remarque dans la plupart des cas que les conidies pénétrant à l'intérieur du filament branchial se trouvent au sommet. Tout est groupé au sommet du filament branchial et le manchon principal de pigment brunâtre se trouve également au sommet, ce qui n'empêche pas la conidie de pousser ensuite des hyphes à l'intérieur du filament.

HONG : Au Japon, les crevettes atteintes de cette maladie des branchies noires sont dépréciées au point de vue valeur commerciale parce qu'elles ont un mauvais goût et une mauvaise présentation.

GUARY : La mauvaise présentation est particulièrement importante au Japon, et ces crevettes ont en outre un goût douteux.