



### Fiche Bio 2007-02

## Interactions crevettes / *Vibrio nigripulchritudo* HP : quelques résultats d'intérêt.

S. De Decker, D. Ansquer, C. Goarant

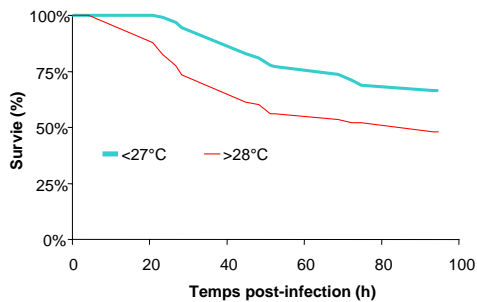
Contact : cgoarant@ifremer.fr



Le Syndrome d'été a été attribué à des souches hautement pathogènes (HP) d'un type génétique particulier de *Vibrio nigripulchritudo*. Dans le cadre de l'étude de cette maladie, une souche modèle a été choisie, souche nommée SFn1, notamment pour mener des essais d'infections expérimentales visant à mieux appréhender la relation hôte-pathogène dans le cadre du Syndrome d'été. Cette fiche biotechnique a pour but de présenter quelques résultats concernant l'équilibre hôte - pathogène obtenus dans le cadre de l'étude du Syndrome d'été.

### Effet de la température sur la sensibilité de la crevette *Litopenaeus stylirostris* à une infection expérimentale à *V. nigripulchritudo* HP (souche SFn1)

Dans le but de tester l'effet de la température sur l'équilibre hôte-pathogène, une infection expérimentale a été réalisée sur 400 *Litopenaeus stylirostris* (16 bacs de 25 individus). Ces crevettes ont été soumises à une baignade dans une suspension de *V. nigripulchritudo* SFn1 à  $1.2 \times 10^4$  UFC/mL pendant 2h à 27°C. Quatre bacs non infectés constituaient les témoins d'infection. A l'issue de l'infection, les animaux ont été transférés dans des bacs dont la température de l'eau était régulée grâce au système d'échangeurs. Les températures testées variaient de 23°C à 29°C. Les mortalités post-infection ont été suivies durant 4 jours et sont représentées sur la figure suivante.



Survie à une infection à *V. nigripulchritudo* SFn1 de *L. stylirostris* : effet de la température.

Les survies des animaux des bacs dont la température était supérieure à 28°C et celle des animaux des bacs dont la température était inférieure à 27°C sont significativement différentes : respectivement 48% et 67%. ( $p < 0.01$ ). Ce résultat confirme en conditions expérimentales contrôlées le rôle central de la température dans l'équilibre entre la crevette et une souche hautement pathogène de *V. nigripulchritudo* associée au syndrome d'été. Toutefois, comme seulement 2 températures ont été testées, nos données ne permettent pas de mettre en évidence un effet de seuil.

### Sensibilité de la crevette à une infection en fonction de son stade de mue et de son poids

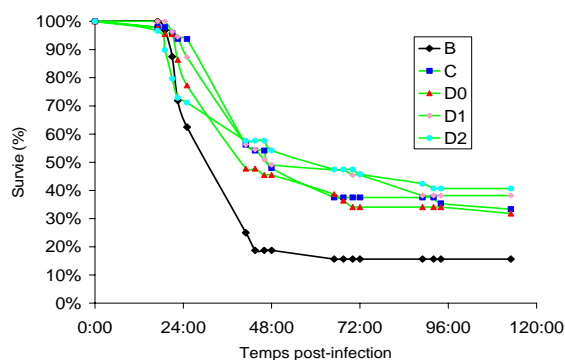
Au cours de différentes infections expérimentales, comme au cours des épisodes de mortalité en bassins, il est noté que les crevettes moribondes sont fréquemment proches de la mue. La

sensibilité des crevettes à une infection en fonction de leur stade de mue constitue de plus un élément important pour la compréhension d'ensemble des épisodes de mortalité en bassins.

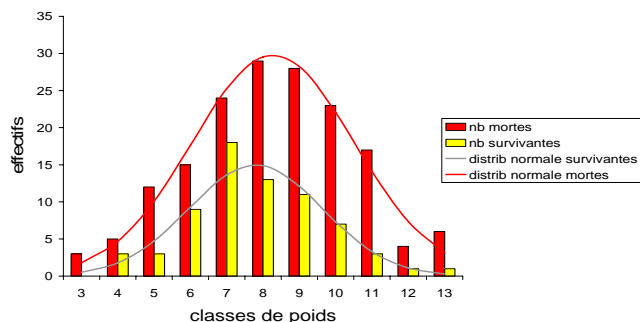
Par ailleurs, une sensibilité accrue des crevettes à une infection par *V. nigripulchritudo* à une certaine taille (ou un certain poids) était suspectée pour expliquer l'expression stéréotypée du syndrome d'été.

Pour cette étude, les stades de mue et les poids individuels de 285 *L. stylirostris* (entre 3 et 13 grammes) ont été déterminés. Les crevettes ont ensuite été marquées et réparties dans 16 bacs de la salle de pathologie expérimentale de façon à pouvoir être reconnues individuellement (couleur et emplacement de la marque de silicone et bac expérimental de destination). Ces crevettes ont été soumises à une infection expérimentale par baignade dans une suspension de *V. nigripulchritudo* SFn1 à  $5 \times 10^4$  UFC/mL durant 2h. Trois bacs non infectés constituaient les témoins d'infection. Les mortalités post-infection ont été suivies durant 6 jours et les individus recueillis morts identifiés individuellement.

La survie des individus infectés en postmue (stade B) est significativement inférieure aux autres. Ainsi, le temps moyen pour obtenir 50% de mortalité en postmue est de 1,8 jour contre 2,8 et 3,8 jours pour les crevettes respectivement en intermue et en prémue. L'effet de ce stade de mue (phase de fragilité ou de vulnérabilité de la crevette) dans les phénomènes d'infection mais aussi de contagion mériterait d'être mieux étudiée.



Survie de *L. stylirostris* en fonction de leur stade de mue au moment de l'infection par *V. nigripulchritudo* SFn1.

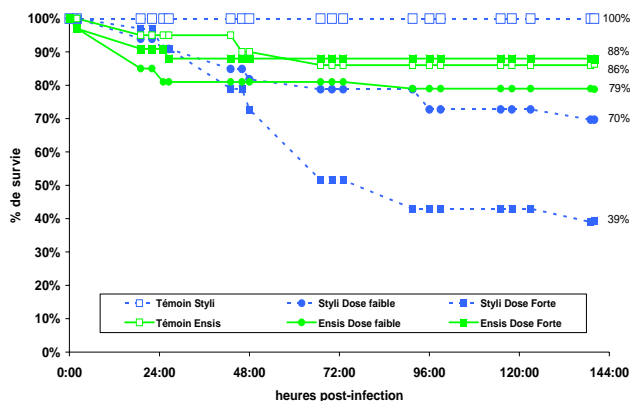


Histogrammes représentant les effectifs par classe de poids des crevettes mortes et des crevettes survivantes, et leurs distributions « normalisées »

La comparaison des poids des crevettes survivantes ou mortes montre que le poids des individus morts (2,45g) est significativement ( $p < 0,05$ ) supérieur au poids des individus survivants (1,96g). Ce résultat pourrait évoquer l'existence d'une phase critique dans le développement de *L. stylirostris* ou dans sa sensibilité à une souche pathogène de *V. nigripulchritudo*. Cette étude visait à évaluer l'hypothèse de l'existence d'une « période critique » pendant la phase juvénile de *L. stylirostris*. Les connaissances bibliographiques sur la biologie et l'ontogenèse de *L. stylirostris* ne semblent pas indiquer de période de fragilité dans cette tranche d'âge / poids. On pourrait cependant penser que la période pubertaire (mise en place des organes génitaux, début de la gamétogenèse) ou un changement de régime alimentaire ou tout autre modification physiologique pourraient affaiblir la crevette la rendant plus sensible à des conditions défavorables de l'environnement et/ou aux agressions de pathogènes. La détermination du poids moyen à la puberté chez *L. stylirostris* permettrait d'évaluer un éventuel effet de ces modifications physiologiques sur la sensibilité aux pathogènes.

### Spécificité du pouvoir pathogène de *V. nigripulchritudo* HP (souche SFn1) pour la crevette *L. stylirostris* : essai d'infection d'une espèce indigène : *Metapenaeus ensis*.

Un lot de *Metapenaeus ensis* sauvages a été constitué au DAC afin de disposer d'individus d'une autre espèce que *L. stylirostris*, pour évaluer la spécificité du pouvoir pathogène de *V. nigripulchritudo* SFn1. *M. ensis* n'est pas, pour des raisons biologiques et commerciales, une espèce susceptible d'être élevée en remplacement de *L. stylirostris*, mais la disponibilité d'individus de cette espèce en faisait un bon modèle d'étude de la spécificité de ce pathogène. Le but de cette infection par balnéation était de comparer la sensibilité de ces 2 espèces, *L. stylirostris* (souche domestiquée en Nouvelle-Calédonie) et *M. ensis* (souche sauvage) à une infection expérimentale par *V. nigripulchritudo* SFn1. La température des bacs est maintenue à 26°C grâce au système d'échangeurs. Deux doses infectantes (forte et faible) sont testées.



### Survie de *L. stylirostris* et de *M. ensis* infectées par *V. nigripulchritudo* SFn1 à deux doses différentes et témoins non infectés.

Les survies observées sur les *L. stylirostris* sont caractéristiques de celles observées lors d'une infection par balnéation à l'aide d'une souche pathogène, par leur cinétique d'une part et le net effet de la dose d'autre part. A l'opposé, les survies des *M. ensis* varient principalement au cours des 24 premières heures, très probablement liées aux stress de manipulation et ne montrent d'autre part aucun effet de la dose infectante. **Elles démontrent que *M. ensis* n'est pas sensible à une infection par *V. nigripulchritudo* SFn1, du moins aux doses et selon le modèle d'infection par balnéation utilisés.**

D'un point de vue scientifique des travaux complémentaires permettraient de montrer si ce phénomène est lié à une

résistance à l'infection *sensu stricto* (i.e. le pathogène ne pénètre pas dans la crevette), à une résistance à la bactériémie (réponse immunitaire permettant d'empêcher efficacement le déclenchement de la septicémie) ou à une résistance aux toxines sécrétées par *V. nigripulchritudo* SFn1. Cela permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action du pathogène.

D'un point de vue industriel, le fait que *M. ensis* soit résistante suggère de tester la sensibilité ou la résistance d'autres espèces indigènes (*Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, *P. latisulcatus* et *Fenneropenaeus merguensis*), ou de la souche Hawaïenne de *L. stylirostris* et ses hybrides afin d'évaluer leur intérêt comme espèce ou souche de substitution dans les fermes affectées par le Syndrome d'été.

Ces résultats, présentant un intérêt dans le cadre d'études sur les échanges de pathogènes entre espèces cultivées et sauvages, ont fait l'objet d'une Newsletter pour le réseau DIPnet (Diseases Interaction and Pathogen exchange between farmed and wild animals : a European network) DIPnet Newsletter n°23.

**Newsletter 23**  
Virulence specificity of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen for farmed shrimp in New Caledonia

By Sophie DE DECKER, Dominique ANSQUER, Emmanuel GOYARD and Cyrille GOARANT\*  
Cyrille.Goarant@ifremer.fr

Penaeid shrimp farming is a developing industry in New Caledonia, based on a captive stock of the exotic species *Litopenaeus stylirostris* introduced 25 years ago from Mexico and bred in captivity since then. However, its profitability is threatened by seasonal mortality episodes due to two different *Vibrio* species: *V. penaeicida* during the cold season ("Syndrome 93") and *V. nigripulchritudo* in summer ("Summer syndrome"). In both cases, survival rates can be as low as 20%, instead of a "normal" 50-60%.

Since 1993, all growout farms have been affected by the Syndrome 93 and *V. penaeicida* is found at high prevalence in all farms. By contrast summer syndrome is currently restricted to two adjoining farms in the same bay, even though pathogenic *V. nigripulchritudo* strains have been isolated from other farms. However, the high genetic diversity of *V. nigripulchritudo* isolates makes the hypothesis of an emerging clonal pathogen plausible and therefore, the risk of its spreading must be evaluated. Even though vibriosis are major disease problems in all farmed marine animals, they have been little researched, so limited knowledge has been gained on their pathology and epidemiology. Because of the total ban of antibiotics in shrimp growout systems in New Caledonia, a research program aiming at a global understanding of vibriosis (DeSanS, possibly translated as Stylirostris Health Challenge) has been set up.

VEBO, Norway  
September 27<sup>th</sup> 2005

As part of this program, the virulence of *V. nigripulchritudo* towards farmed *L. stylirostris* has been studied. Additionally, in order to evaluate:

- the risk that wild indigenous Penaeid could act as a vector in spreading this pathogen from farm to farm,
- the possibility of rearing an alternate shrimp species in the two farms affected,
- the complex interactions between the pathogen and its host,

we undertook an examination of virulence specificity of a pathogenic *V. nigripulchritudo* strain isolated from summer syndrome in indigenous Penaeid species.

Various indigenous Penaeid species are considered for these purposes and broodstocks are currently being constituted. Because wild *Metapenaeus ensis* is easily available in the surrounding waters, they were first considered for preliminary experimental pathology experiments. This shrimp species is frequently found in low numbers in farm ponds, probably introduced as larvae with the renewal water and grown as a competitor. However, it does not meet the requirements for commercial-scale culture, because it is a small species and very susceptible to any stress.

As a first experiment, wild *Metapenaeus ensis* were infected by dipping in *V. nigripulchritudo* SFn1 suspensions together with farmed *L. stylirostris* of the same size. The survival in *M. ensis* was not different whether they were infected or not and there was no dose-response relationship. In contrast, infection reduced the survival of *L. stylirostris* and there was a strong dose-related effect. Taken together, these results clearly demonstrate that the wild species is more resistant to the pathogen.

Further work is in progress to assess the susceptibility of other indigenous shrimp species (from stocks that we still have to constitute), to evaluate the resistance/susceptibility under various infection techniques for each species, and to assess the status of surviving animals (whether they carry the pathogen or not). From an production point of view, the numerous species that may valuably be reared which are present in New Caledonian waters (including *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, *P. latisulcatus* and *Fenneropenaeus merguensis*) and another *L. stylirostris* line that was recently imported under strict quarantine conditions will be tested in priority.

The results from these studies will allow evaluation of the potential interactions between cultured and wild Penaeid with regards to this particular pathogen, notably the role of wild shrimp in disseminating this pathogen.

VEBO, Norway  
September 27<sup>th</sup> 2005