



## Fiche Bio 2009-02 : Résistance spécifique à *V. penaeicida* des crevettes « Métisses » issues du croisement de première génération des types génétiques «Calédonie» et «Hawaii»

E. Goyard, D. Ansquer, F. Broutoi, P. Brun, R. Dufour, J-R. Mailliez, J-M. Peignon, D. Pham, E. Vourey, E. Walling, J. Patrois  
Contact : egoyard@ifremer.fr

### 1. Introduction

Le testage de la stratégie d'amélioration génétique du cheptel calédonien de crevettes *L. stylirostris* par croisement de la souche domestiquée en Nouvelle-Calédonie et celle domestiquée à Hawaii a donné lieu à différents travaux menés en partenariat entre les producteurs associés au sein de l'UPRAC-NC, l'Ifremer et les institutions de ce pays. Les deux premières années de testage ont permis de conclure que la souche Hawaïenne constitue un matériel génétique précieux pour le développement de la crevette calédonienne, non pas particulièrement pour ses propres performances qui n'apparaissent pas supérieures à celle de la souche Calédonienne, mais parce qu'elle permet de produire en croisement avec la souche Calédonienne des Hybrides de première génération (ou « Métisses F1 »), par nature non consanguins (Goyard *et al.* 2003), dont les performances de croissance, de survie et par voie de conséquence de production de biomasse sont supérieures à celles des Calédoniennes, au moins en l'absence de développement du virus IHHN. (Goyard *et al.* 2007)

Néanmoins, les résultats obtenus n'avaient pas permis de conclure à une résistance spécifique des « métisses F1 » vis-à-vis de chacune des deux bactéries pathogènes *Vibrio penaeicida* et *Vibrio nigripulchritudo* qui affectent les élevages de crevette en Nouvelle-Calédonie. Les difficultés rencontrées durant ces premiers tests avait été de deux ordres :

- le déclenchement par stress de manipulation de septicémies à *V. nigripulchritudo* lors d'expérimentation sur *V. penaeicida* ;
- la variabilité, pour une quantité donnée de bactéries injectées ou utilisées en balnéation, des résultats de survie en infection expérimentale liée à la variabilité du statut sanitaire et physiologique des animaux.

Les meilleures survies observées lors des infections expérimentales réalisées en 2006 et 2007 n'avaient donc permis de conclure qu'à une meilleure résistance globale au stress et à ces deux bactéries pathogènes.

Sans reprendre en détail l'organisation des différents acteurs Calédoniens pour cette opération de testage ni les résultats déjà présentés (Goyard *et al.* 2007), la présente fiche biotechnique présente les principaux résultats d'une nouvelle infection expérimentale à *V. penaeicida* qui a été réalisée en 2008 suivant un protocole d'infection modifié pour comparer la résistance spécifique à *V. penaeicida* des animaux de type « Hawaii » et « Métisse F1 » par rapport aux animaux « Calédoniens ».

### 2. Matériel et méthodes

La reproduction fin 2007 des 16 familles Hawaïennes nées fin 2006 a permis de disposer de 16 nouvelles familles Hawaïennes « pures » (« HH-2007 ») et de 12 familles Métisses (« F1-2007 »). Simultanément 18 familles Calédoniennes « pures » (« CC-2007 ») ont été produites comme témoin .

Une fois sortis d'écloserie et avant d'être marqués, les 3 types génétiques « CC », « HH » et « F1 » ont été élevés séparément en bassin terre jusqu'à un poids moyen de 2 g. Ce matériel biologique a alors été marqué par injection de silicone coloré et mélangé en bassins terre de 500m<sup>2</sup>.

Cinq semaines plus tard, 60 animaux de type calédonien ont été recapturés et répartis dans 6 aquariums de 30 litres de la salle d'infection de la station de Saint-Vincent. Afin de rechercher l'ordre de grandeur de la quantité de bactéries à injecter pour provoquer une mortalité de 50% des crevettes (DL50) et que cette quantité tienne compte de l'état physiologique et sanitaire de la population calédonienne au moment de cette expérimentation, ces 60 animaux ont été immédiatement infectés, sans acclimatation, par injection avec la souche de *V. penaeicida* AM 101 (Costa *et al.*, 1998) selon un gradient de concentrations en bactéries (tableau 1). La survie finale liée à chaque dose utilisée a été évaluée par comptage direct des survivants 3 jours après injection.

Simultanément 88, 184 et 154 animaux de types « Hawaii », « Métisse F1 », et « Calédonie » ont été repêchés et transférés en salle d'infection expérimentale de la station de Saint-Vincent. La répartition a été faite de façon à équilibrer les effectifs des 3 types génétiques dans chacun des 17 bacs de 200 litres utilisés pour cette expérience. Après une acclimatation de six jours suivant le protocole de transfert en condition de confort physiologique (pas d'alimentation et eau à 26‰ pendant 48 heures – Pham *et al.* 2008), les animaux survivants de chaque population ont été recomptés dans chaque bac. Les survivants de tous les bacs (sauf deux) ont alors subi une infection artificielle par une injection avec la souche de *V. penaeicida* AM 101 dont la dose a été déterminée en fonction de la première infection en aquarium décrite ci-dessus. Les animaux des deux bacs non infectés ont été manipulés de façon similaire mais n'ont subi qu'une injection d'eau de mer stérile pour servir de « témoins d'infection ». La survie finale a été évaluée dans tous les bacs par comptage direct des survivants 3 jours après injection.

On dispose donc pour chaque type génétique de :

- la survie à l'issue de la semaine d'acclimatation
- la survie post infection
- la survie totale

### 3. Résultats commentés

#### 3.1. Détermination de l'ordre de grandeur de la DL 50 à adapter à l'état physiologique et sanitaire de la population calédonienne au moment de l'expérimentation

Les effectifs initiaux et finaux observés dans les 6 aquariums utilisés pour l'évaluation de la DL 50 sont donnés dans le tableau 1. Il apparaît un effet du gradient de concentration dans la survie et que les témoins non infectés (mais manipulés) ont survécu à 100% et qu'une dose aussi faible que 6 bactéries injectées en moyenne par crevette provoquait 80% de mortalité.

**Tableau 1 : Doses de *V. penaeicida* injectées et effectifs de crevettes calédoniennes observés pour rechercher la DL50**

Aquarium	A	B	C	D	E	F
Dose injectée (CFU/crevette)	0	0	6	29	58	290
Effectif initial (Calédoniennes)	10	10	10	10	10	10
Effectif final (Calédoniennes)	10	10	2	1	0	0

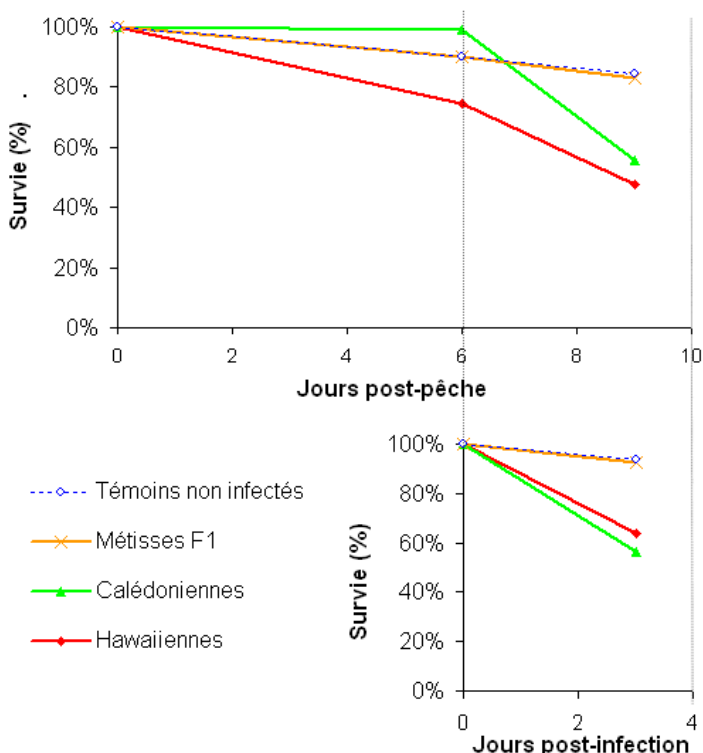
**Tableau 2 : Nombre d'animaux vivants observés au cours du test de résistance aux infections à *V. penaeicida* et survies associées**

	Animaux infectés (15 bacs)			Animaux témoins non- infectés (2 bacs)
	Hawaii	Métisses F1	Calédonie	
effectif initial	78	161	136	51
effectif manipulé en fin de stabulation	58	145	135	46
infectés survivants finaux	37	134	76	43
<b>survie phase stabulation seule</b>	<b>74%</b>	<b>90%</b>	<b>99%</b>	<b>90%</b>
<b>survie phase d'infection seule</b>	<b>64%</b>	<b>92%</b>	<b>56%</b>	<b>93%</b>
<b>survie totale</b>	<b>47%</b>	<b>83%</b>	<b>56%</b>	<b>84%</b>

Compte tenu de ces résultats démontrant la nécessité de n'infecter qu'avec des doses très faibles pour éviter une mortalité massive qui n'aurait pas permis de conclure, la dose de *V. penaeicida* à injecter dans la seconde infection expérimentale a été choisie inférieure à 10 CFU/crevette. Les calédoniennes qui avaient été stabulées durant 6 jours sans mortalité significative (tableau 2) et qui ont été injectées à cette dose ont enregistré une mortalité proche de 40% (tableau 2 et figure 1b).

### 3.2. Survie différentielle des 3 types génétiques

Les effectifs observés des témoins et des différents types génétiques infectés sont donnés dans le tableau 2. Les survies ont été calculées sur la base des effectifs initiaux (tableau 2 et figure 1a) mais aussi sur la base des effectifs en début d'infection (tableau 2 et figure 1b).



**Figure 1 : survies des 3 types génétiques exprimées en fonction des effectifs en début d'acclimatation (a) et des effectifs disponibles lors de l'injection**

Les survies observées chez les « Métisses F1 » et les témoins non-infectés ne sont pas significativement différentes et restent fortes (seulement 16-17% de mortalité au total). On note que les courbes de survie correspondantes ne s'infléchissent pas au moment de l'injection : pour les témoins non-infectés et les « métisses F1 », l'injection de *V. penaeicida* est donc sans effet.

Parallèlement, les survies observées chez chacune des 2 lignées pures « Calédonie » et « Hawaii » sur la seule phase d'infection (64% et 56% respectivement – figure 1b) et sur les 2 phases cumulées (47% et 56% respectivement – figure 1a) sont significativement plus faibles que celle des « métisses F1 » (tests du Chi-2 -  $p < 0,001$ ). On note par ailleurs que les Hawaiiennes ont subi une mortalité de 26% sur la seule phase de stabulation (figure 1a) mais l'effet de l'injection de *V. penaeicida* est proportionnellement le même chez les animaux injectés des 2 souches pures (41% de mortalité en moyenne – figure 1b -  $p > 0,10$ ).

## 4. Conclusions et perspectives

La première infection en aquarium avec gradient de concentration et sur un nombre limité d'animaux apparaît comme une voie intéressante pour contourner les problèmes de variabilité de réponse des crevettes élevées en Nouvelle-Calédonie aux infections expérimentales. Cette première étape de recherche de la dose optimale pour le test ne rallonge pas le temps d'occupation de la salle d'infection si elle est réalisée en parallèle de la phase d'acclimatation des animaux sur lesquels le test *sensu stricto* est réalisé immédiatement après.

Cette expérience confirme que la souche Hawaiienne constitue un matériel génétique précieux pour le développement de la crevette culture calédonienne : les hybrides de première génération (ou « Métisses F1 ») qu'elle permet de produire en croisement avec la souche Calédonienne s'avèrent plus résistants spécifiquement à *V. penaeicida*. Ce résultat complète ceux publiés précédemment sur en plus leurs performances de croissance et de rusticité globale (Goyard *et al.* 2007).

Pham D., Wabete N., Lemaire P., Mailliez J-R., Broutoi F., Chim L. (2008). Contribution à l'amélioration des survies & performances de reproduction de *L. stylirostris* en saison fraîche en NC. Ifremer/DAC/Fiche Bio. 2008-01

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

Goyard, E., Arnaud, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D., Wyban, J., Boudry, P., Aquacop, (2003). Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New-Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquat. Living Resour.* 16, 501-508.

Goyard E., Goarant C., Ansquer D., Broutoi F., Brun P., de Decker S., Dufour R., Galinié C., Mailliez J-R., Peignon J-M., Pham D., Vourey E., Harache Y., Patrois J. (2007). Introduction en Nouvelle-Calédonie de la souche de crevettes *Litopenaeus stylirostris* domestiquée à Hawaii : Bilan de l'opération après deux années de testage de performances des crevettes de types génétiques « Calédoniennes », « Hawaiiennes » et « Métisses » Ifremer/DAC/RST 2007- 01, 48 pp