

Vers la production commerciale d'un probiotique calédonien ?

Unité de Recherche Lagon, Eco-système et Aquaculture Durable,
Ifremer

BP 2059, Nouméa – Nouvelle-Calédonie

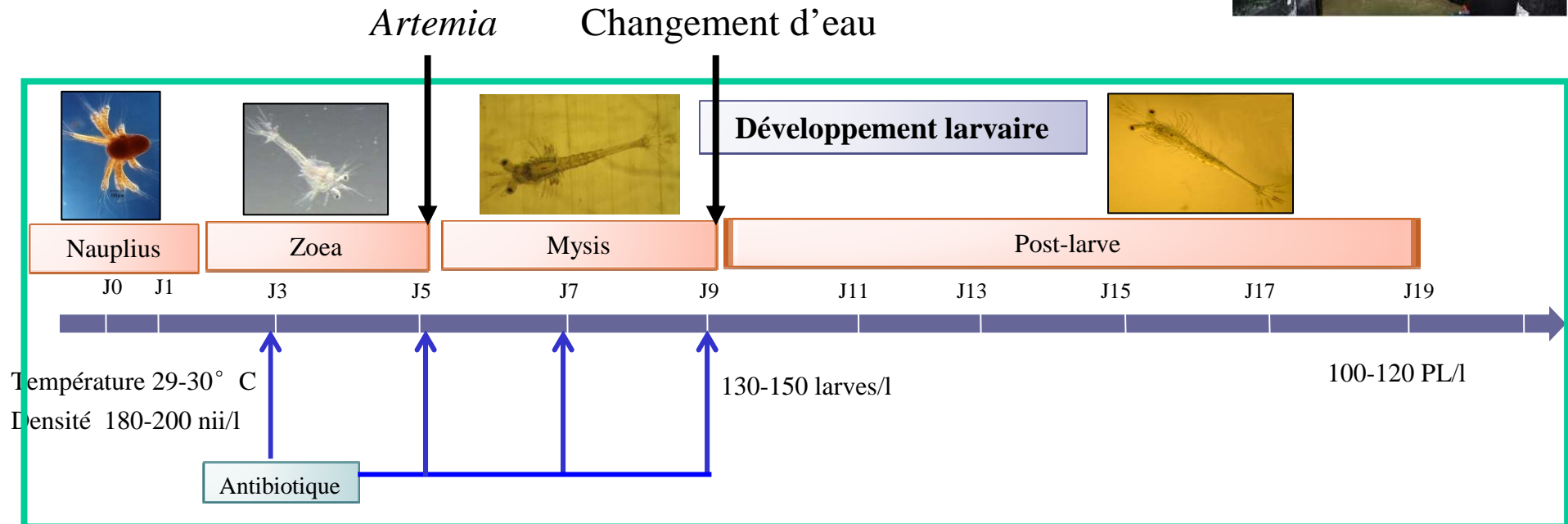
Restitution programme « Soutien scientifique et technique à la filière crevette »

Jeudi 29 Octobre 2015 – Province Sud

Ifremer

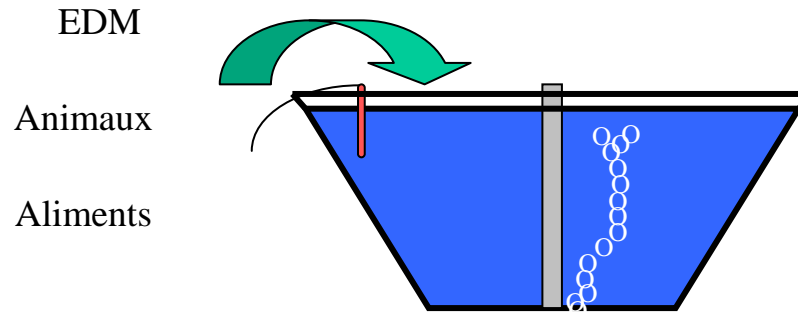


Elevage larvaire de crevettes en NC



- Introduction des *Artemia* à J5
- Début des changements d'eau à J9... mais tributaire des antibiotiques dans les 9 premiers jours

L'élevage larvaire : un milieu propice aux bactéries



Pas de changement
d'eau pendant 9 jours

- **Contrainte : Éviter l'installation de bactéries pathogènes dans le milieu par :**
- **traitements physiques de l'eau (décantation, filtration, stérilisation...)**
- **traitement chimique de l'eau (chloration, antibiotique)**
- **Propice à l'installation et le développement de bactéries opportunistes et/ou résistantes dans le milieu d'élevage**
- **Protocole inadapté ...si rien de plus**

Quelle stratégie adopter ?



Favoriser l'installation de bactéries bénéfiques au dépend des bactéries pathogènes → Contrôle biologique

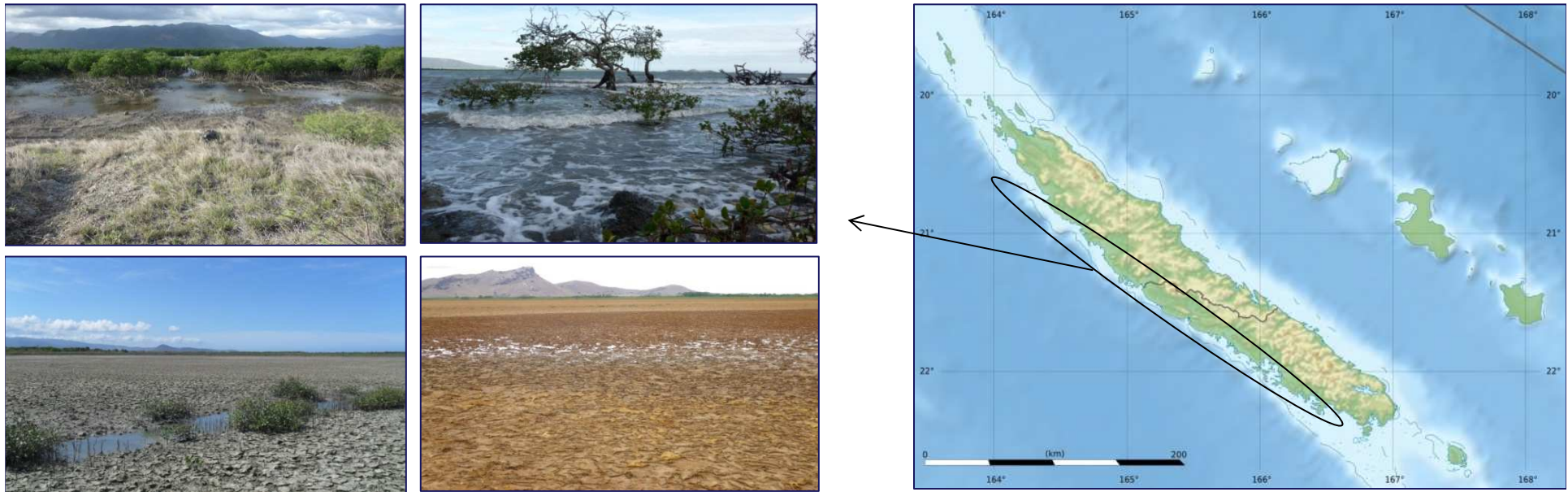
Définition d'un probiotique :

micro-organisme vivant avec effets bénéfiques sur l'hôte

- en modifiant les communautés microbiennes locales ou associées à cet hôte;
- en améliorant la disponibilité de la nourriture ou sa valeur énergétique;
- en stimulant la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'une maladie ou de pathogènes;
- en améliorant la qualité de l'environnement de l'hôte considéré (Veschuere et al., 2000).

Existe t'il des bactéries marines locales probiotiques ?

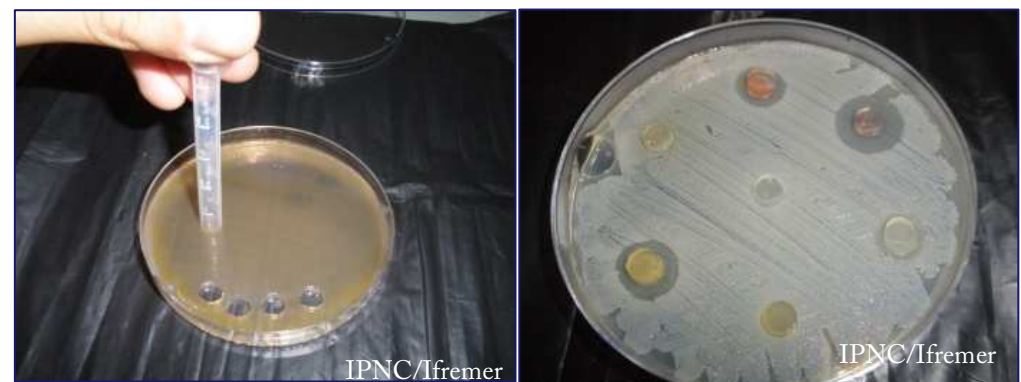
Sélection de bactéries à potentiel probiotique



493 isolats d'environnements marins extrêmes de Nouvelle-Calédonie (NC1 à NC493)

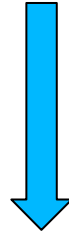
Recherche d'activité antagoniste vis-à-vis de *V. nigripulchritudo*.

Sélection of 7 souches :
NC72, NC197, NC201, NC203, NC204,
NC257 et NC297



Approche Expérimentale

Probiotique Potentiel



- Test d'inhibition *in vitro*
- Test d'innocuité
- Test d'efficacité en élevage larvaire

Essai d'inhibition de croissance de *V. harveyi* ORM4-GFP



1

V. harveyi GFP

x 3

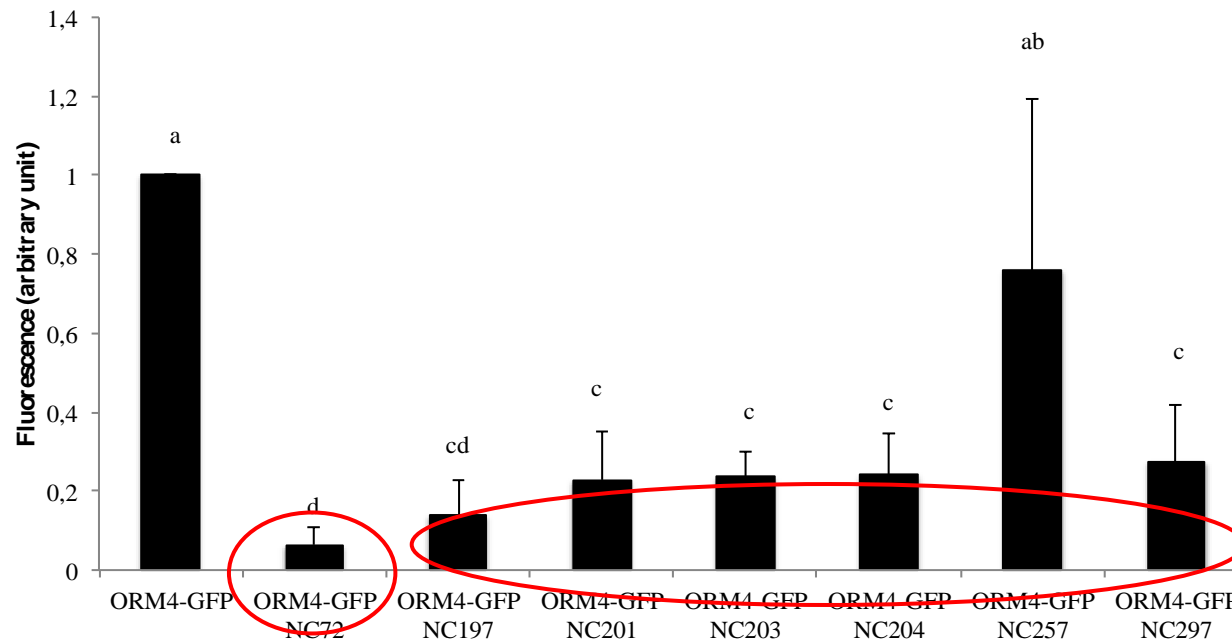
10^5 CFU.mL⁻¹

29°C

2

V. harveyi GFP + Isolat

Lecture de la fluorescence après 48h



- Très forte inhibition de NC72

Forte inhibition de NC197, NC201, NC203, NC204, NC297

Excellente activité antagoniste de 6 des 7 isolats envers *V. harveyi* ORM4-GFP

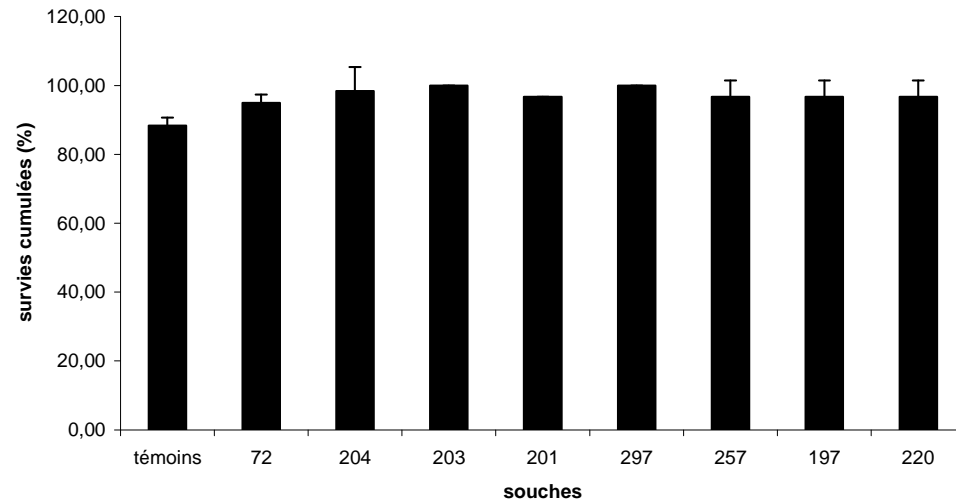
Innocuité des candidats probiotiques



Tests de pathogénicité à une concentration finale de 10^5 CFU/mL :

- Mysis 2 sur 48 heures
- PL9 sur 72 heures

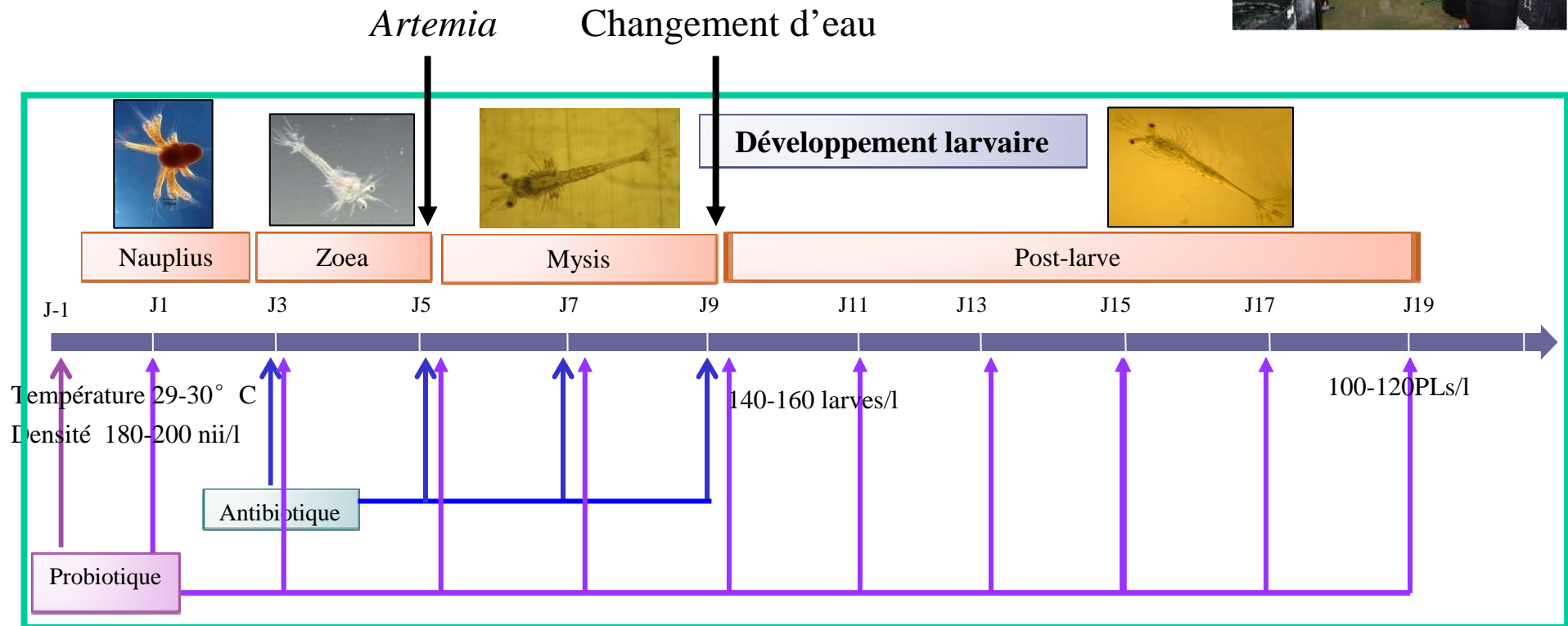
Stade Mysis



- Pas d'effet sur la survie
- Pas de déformations des animaux

Pas de pathogénicité des souches testées

Efficacité des probiotiques en élevage larvaire : De nauplius à P9

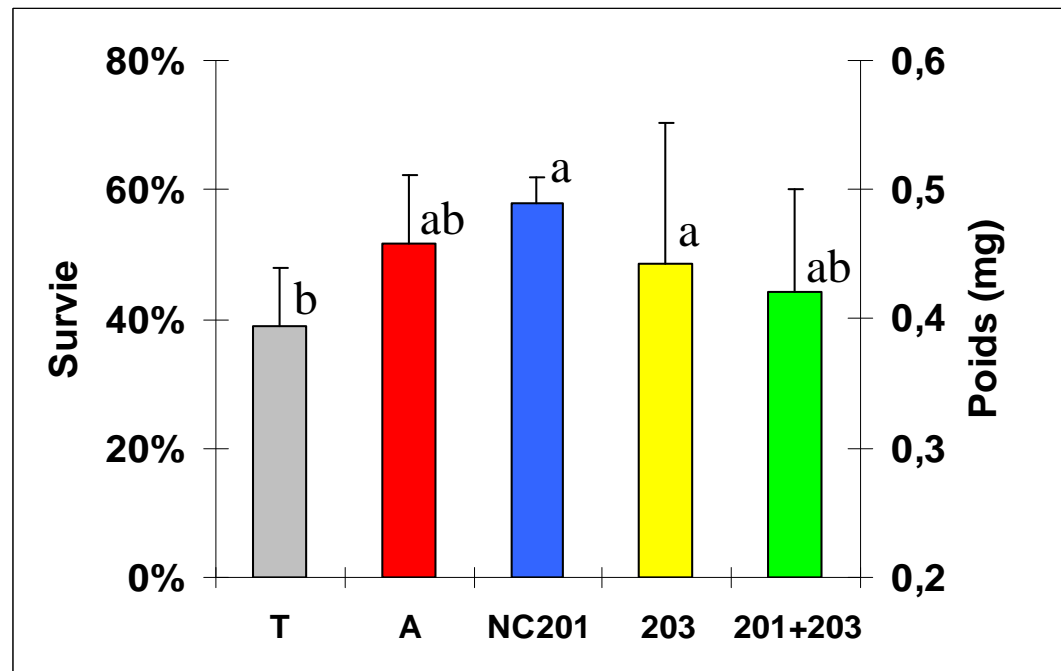


- Tests en triplicat :
 - **Témoin vs antibiotique vs NC201 vs NC203 vs NC201+NC203**
 - Antibiotique (érythromycine) (2,5g/m³) à J3, J5, J7 et J9
 - Probiotiques ajoutés tous les deux jours (concentration finale 10⁵ CFU/ml) jusqu'en fin d'élevage

Effacité des probiotiques en élevage larvaire : De *nauplius* à P9



Administration seule ou combinée de 2 probiotiques

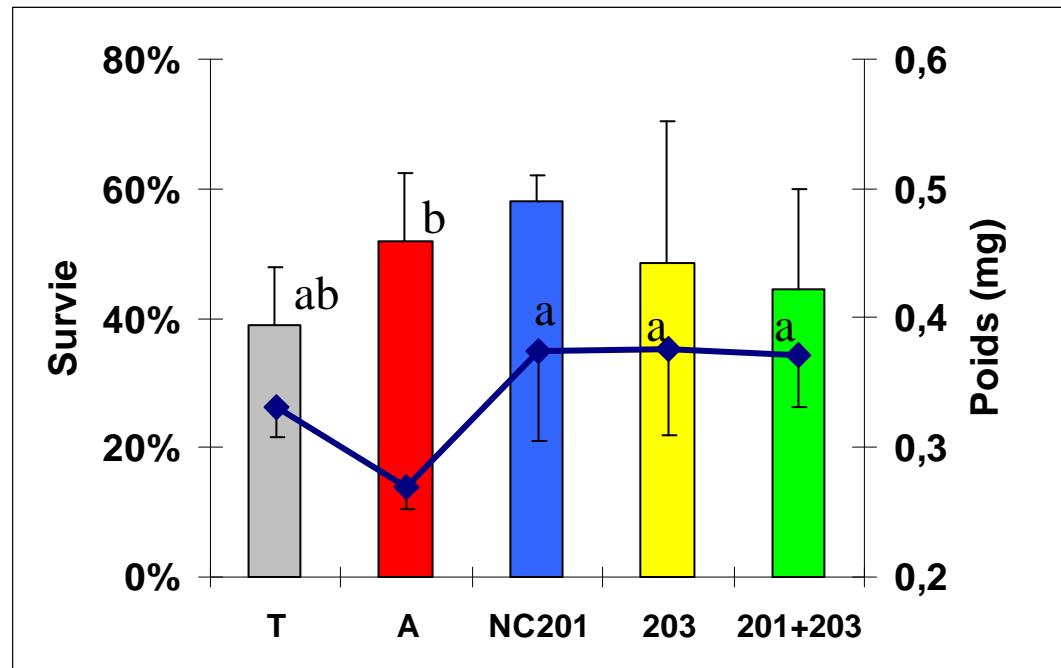


Amélioration de la survie avec NC201

Efficacité des probiotiques en élevage larvaire : *De nauplius à P9*



Administration seule ou combinée de 2 probiotiques

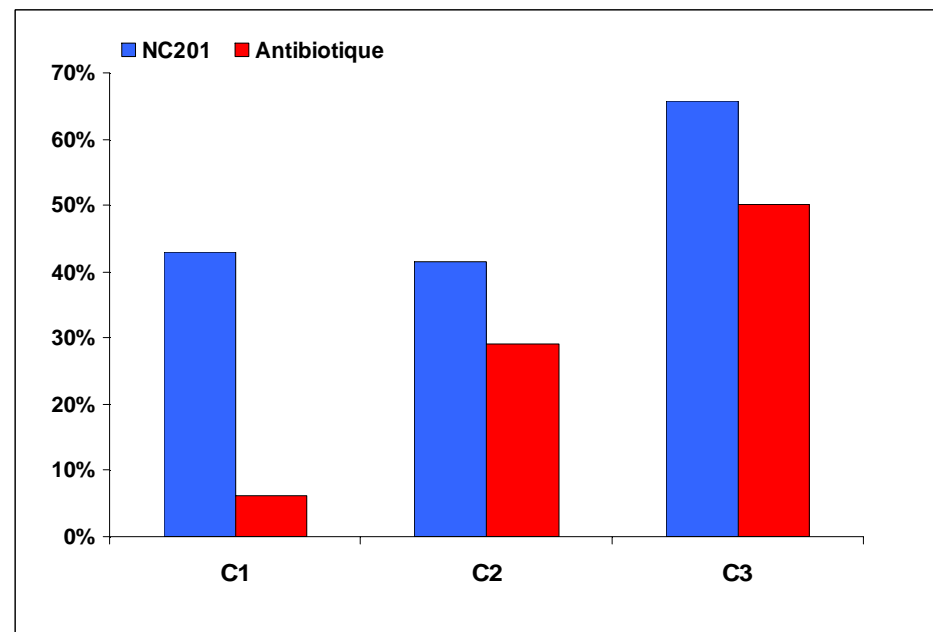


Amélioration de la croissance avec NC201

Effacité de NC201 en élevage larvaire : A l'échelle pilote



Administration du NC201 tous les 2 jours en bacs de 2m³



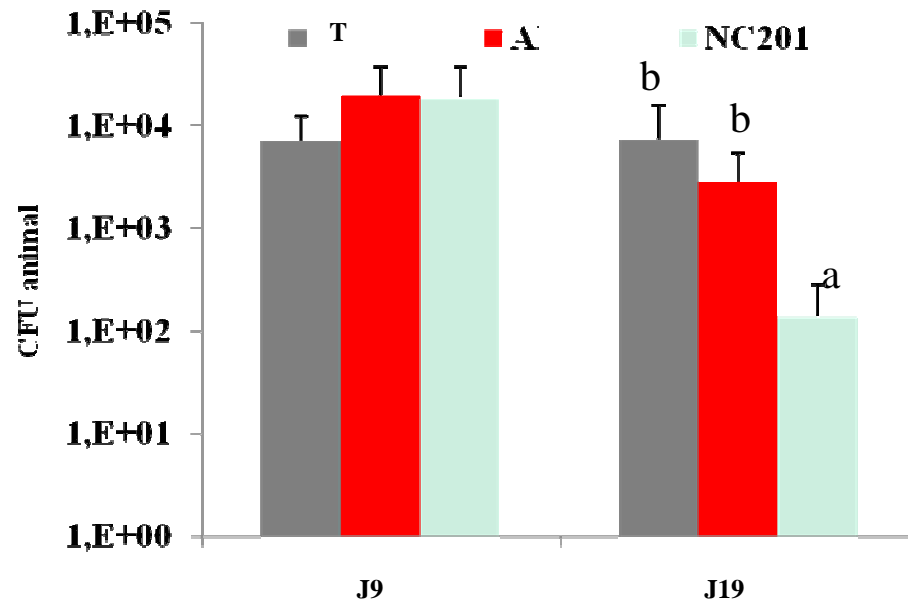
Survie de *L. stylirostris* à J19 en élevage larvaire de 2m³ (Prod 13-03).

Reproductibilité des résultats en bacs de 2m³

Impact du probiotique sur la post-larve: Charge en *Vibrio*



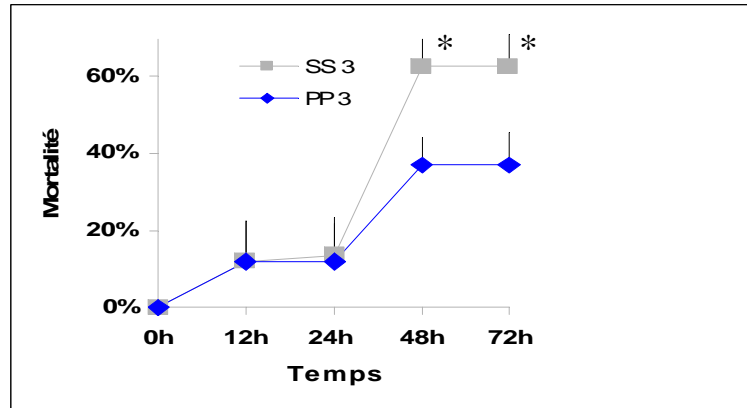
Estimation de la concentration en *Vibrio* à J9 et J19 chez l'animal sur milieu TCBS.



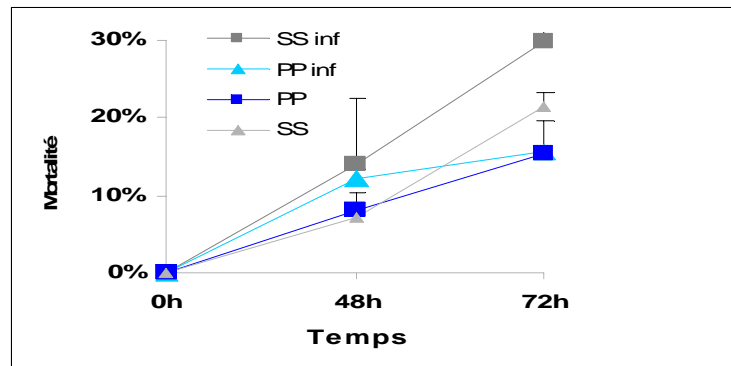
Concentration en *Vibrio* dans l'animal à J9 et J19 en fonction des traitements. T: témoin; A: antibiotique; NC201: probiotique.

Diminution de la flore vibrionacée dans l'animal avec NC201

Impact du NC201 sur la santé chez les juvéniles



Influence d'un choc osmotique sur la survie de juvéniles de 0,4g de *L. stylirostris* ayant reçu ou non du probiotique. SS 3 : animaux sans probiotique transférés directement de 35 à 3; PP 3 : animaux ayant reçu des probiotiques transférés directement de 35 à 3.



Mortalité de *L. stylirostris* de 0,4g en infection expérimentale par baignade à l'AM101. SS: témoin non infecté; PP : animaux sous probiotique non infectés; SS inf : témoin infecté; PPinf : animaux sous probiotique infectés.

Test de chocs salins :

Animaux soumis à des transferts directs de 35 ppt à 35ppt, 15 ppt, 3 ppt et 1,5ppt.

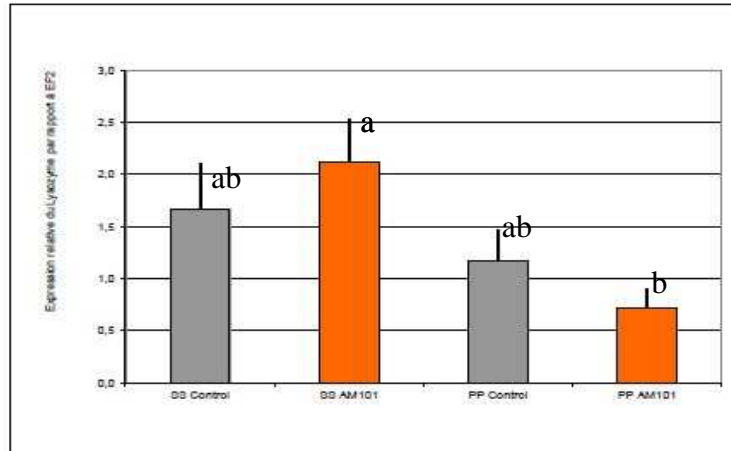
Meilleure résistance des animaux sous probiotique

Test de challenge bactérien :

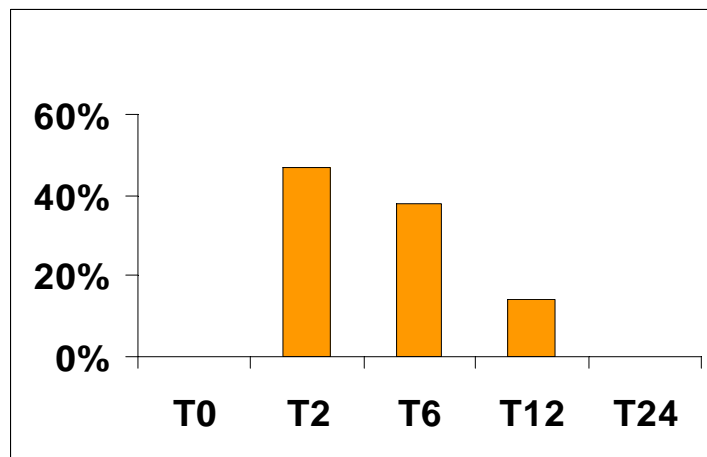
Animaux soumis à baignade de 10^5 cfu/ml pendant 2h à *V. penaeicidae*

Tendance à une meilleure résistance des animaux sous probiotique

Impact sur la physiologie des juvéniles



Niveau de transcrits du gène codant le lysozyme dans les branchies de juvéniles 24h après infection par baignade par *V. penaeicida* (AM101). . SS: témoin non infecté; PP : animaux sous probiotique non infectés; SS AM101 : témoin infecté; PPAM101 : animaux sous probiotique infectés.



Pourcentage de NC201 dans l'hémolymphe des juvéniles de *L. stylirostris* de 8g après une administration de 10^5 cfu/ml dans l'eau.

Mesure de l'expression du gène codant pour les lysozymes par Q-PCR

Modulation de l'expression du lysozyme avec NC201 en condition de stress

Mesure du pourcentage de NC201 parmi la flore hétérotrophe totale de l'hémolymphe de la crevette

Colonisation rapide mais provisoire de l'hémolymphe de la crevette par NC201

Mais qui est NC201?



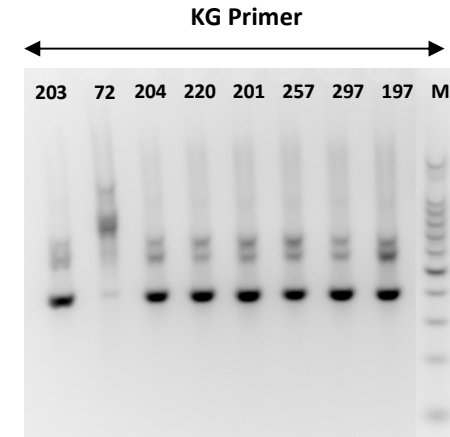
Caractérisation / identification

Approche biochimique

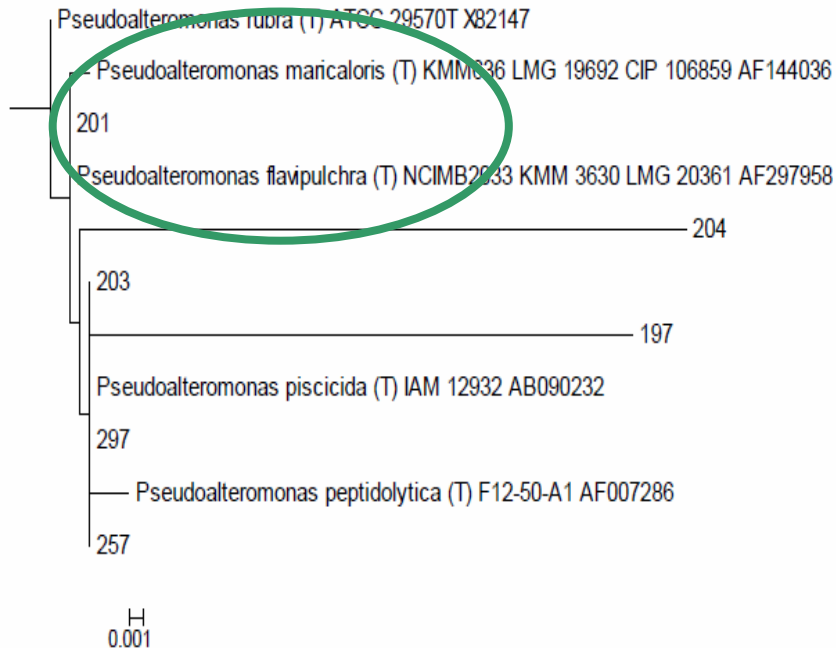


Galerie API 20E

Approche moléculaire



AP-PCR



Genre *Pseudoalteromonas* :

Plusieurs espèces avec des propriétés anti-bactériennes, antifongiques et anti-algales.

Premières conclusions

Les antibiotiques, ce n'est pas automatique



- Alternatives possible aux traitements antibiotiques dans les éclosions de NC
- NC201 est un bon candidat potentiel
- L'administration tous les deux jours permet de stabiliser les résultats en élevage larvaire
- NC201 améliore la santé globale chez la crevette *L. stylirostris* mais les résultats doivent être confirmés sur d'autres paramètres physiologiques
- Le ou les modes d'action doivent être recherchés

Perspectives



Politique de site UNC/Ifremer : Louis SORIEUL 2014 – 2017

Mode d'action et impact d'un probiotique potentiel, la souche *Pseudoalteromonas* NC201, sur l'état physiologique au cours de l'ontogenèse chez la crevette bleue, *Litopenaeus stylirostris*, en Nouvelle –Calédonie.

- Séquençage du génome complet de NC201

→ identification de l'espèce

→ Détermination des gènes d'intérêt

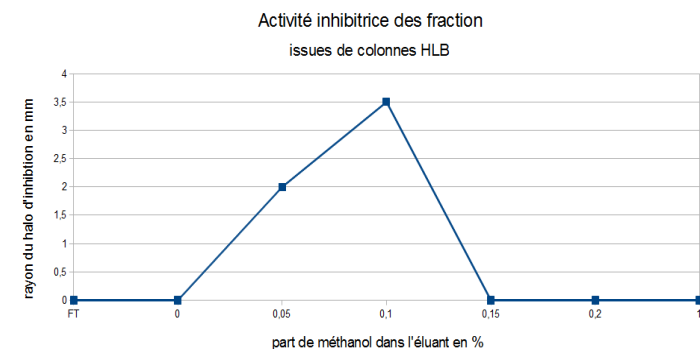
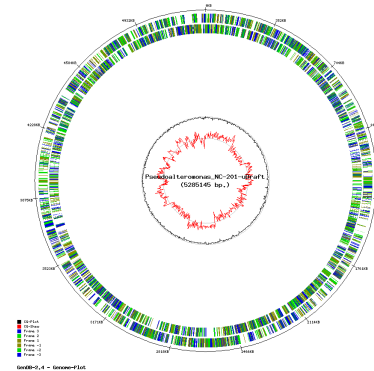
- Les modes d'action possibles de NC201

-En fonction du stade de développement de l'animal

- L'impact de NC201 :

-Sur le milieu d'élevage (modifications biotiques ou abiotiques)

-Sur l'animal (immunité, statut oxydatif, digestion...)



Montage d'un Projet Européen

Objectif :

Production à l'échelle industrielle du probiotique sous une forme commercialisable

Moyens :

- Partenariat entre Nouvelle-Calédonie, France, Allemagne, Pays-Bas, Irlande

- Budget européen compris entre 1,5 et 3 millions d'euros

Retombées :

- Probiotique calédonien en remplacement des antibiotiques en écloséries de

NC

- Application sur d'autres espèces de crevettes et aquacoles

- Développement d'une entreprise calédonienne productrice de probiotique



Merci de votre attention

**Et à tous ceux qui ont contribué de près
ou de loin à ces résultats...**

LEAD NC, UNC,CTA, GFA,

Moyens techniques : PFV, IPNC

Couvernement de NC, Province des Iles, Province Nord, Province Sud