

N° d'ordre : 3111

# THÈSE

PRESENTEE A

**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

**ECOLE DOCTORALE**

**"Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement"**

Par **Nelly WABETE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITE: Océanographie, Ecophysiologie

---

**Etude écophysiologique du métabolisme  
respiratoire et nutritionnel**

**chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*.**

**Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie**

---

Soutenue le 15 décembre 2005.

Après avis de:

M. Guy CHARMANTIER	Professeur	Univ. Montpellier	Rapporteur
M. François LALLIER	Professeur	Univ. Paris VI	Rapporteur

Devant la Commission d'examen formée de:

M. Pierre CHARDY	Professeur	Univ. Bordeaux I	Président
M. Guy CHARMANTIER	Professeur	Univ. Montpellier	Rapporteur
M. François LALLIER	Professeur	Univ. Paris VI	Rapporteur
M. Gilles BÈUF	Professeur	Univ. Paris VI	Examineur
M. Jean-Charles MASSABUAU	Dir. de Recherche	CNRS, Bordeaux 1	Examineur
M. Liet CHIM	Docteur	Ifremer, Nlle-Calédonie	Membre invité



## REMERCIEMENTS

Voilà, voilà! Nous y sommes!!! Comment n'oublier personne?

Tout d'abord, mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont à mes deux responsables scientifiques :

A mon directeur de thèse, Monsieur Jean-Charles Massabuau, pour m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette thèse, pour avoir cru en mes capacités et m'avoir accordé une si grande confiance en se lançant dans cet encadrement à distance pendant ces trois années. Merci pour cette grande disponibilité (en particulier lors de nos discussions téléphoniques tardives), pour les quelques "trucs" de bricolage et surtout pour les encouragements et l'optimisme à toute épreuve (et il y en a eu!!!!). Ce qui me restera en particulier: la rigueur scientifique et le fameux "Penser Positif" ou PP.

À Monsieur Liet Chim, mon responsable scientifique en Nouvelle-Calédonie, pour m'avoir fait partager ses connaissances en matière d'aquaculture et de nutrition crevette, pour m'avoir fait bénéficier des structures nécessaires pour cette étude, et globalement pour avoir fait le maximum pour que ces travaux aboutissent. Merci pour ses conseils avisés, sa grande disponibilité lors de la rédaction de ce manuscrit, son soutien, son sens de l'humour, sa ténacité dans les moments difficiles, et pour toutes ces discussions riches et variées pendant ces longues heures en voiture.

J'adresse également mes remerciements à M. Guy Charmantier et M. François Lallier pour le jugement qu'ils ont bien voulu porter sur cette thèse en tant que rapporteurs ainsi qu'à M. Pierre Chardy et M. Gilles Bœuf de leur participation au jury en tant qu'examineurs.

Ma reconnaissance va également à M. Yves Harrache, délégué en Nouvelle-Calédonie et responsable du Département Aquacole en Calédonie pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et donner les moyens de réaliser ces travaux.

Sans le financement de la Province Nord de Nouvelle-Calédonie, je ne me serais sans doute pas lancée dans cette thèse. Merci donc aux membres de l'Assemblée de Province et à ceux de la commission de l'enseignement qui ont soutenu ce projet de recherche et m'ont finalement accordé une Aide à la Recherche.



Ce travail n'aurait pu aboutir sans cette grande équipe qui est à Saint-Vincent !!!

Pour commencer, je voudrais remercier Pierrette, pilier du laboratoire au sens de l'humour pas toujours compris, dont le soutien fût inconditionnel et qui était toujours présente non seulement pendant les manips mais également pendant les analyses. Merci pour tous ces moments passés ensemble.

A toute l'équipe "Zootechnie Bassin", grands fournisseurs de crevettes pour ces chercheurs exigeants : Pierre, Chanel, Christian. Merci pour votre grande disponibilité, pour les coups de main tardif lors de mes manips, les grands moments de pêche sur les bords ou dans les bassins et toutes ces bonnes histoires!

A l'équipe "Ecloserie": Dominique, Jean-René et Francis qui se sont toujours débrouillés pour se rendre disponibles des semaines entières pour les pêches, les prélèvements, les analyses... Je vous en ai fait faire des choses! Merci d'avoir rendu si agréables et joyeuses toutes ces manips plus que lourdes!

Merci à toute l'équipe Logistique, Georges, Henri, Jean-Michel et Jean-Sébastien, pour leur disponibilité face à mes demandes parfois "bizarres" (surtout au moment de l'installation du laboratoire respirométrie).

Je souhaiterais également remercier tous ceux avec qui je n'ai pas forcément travaillé mais qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'aboutissement de ce travail : Alain, pour toutes les discussions scientifiques, sa gentillesse et sa disponibilité; Luc, pour son soutien et pour m'avoir fait découvrir le monde de la méïofaune; et puis Hugues, Chantal, Cyrille, Emmanuel, Dominique, Sophie, Jean-Marie, Robert, Jacky, Denis, José, Benoît, Anne-Laure, Billy et Jack. Merci pour votre accueil chaleureux, les discussions parfois mouvementées, votre disponibilité et surtout le grand soutien moral dans les moments difficiles que j'ai pu connaître! Merci également à la petite équipe administrative de Nouméa, en particulier pour leurs encouragements au moment de la rédaction de ce manuscrit : Loïc, Philippe et Evelyne.

Et je n'oublierais pas les quelques stagiaires qui m'ont donné des sacrés "coups de main" lors de leur passage à la station : Grégory, Priscilla, Frédérique, Lionel et Mathieu (qui est maintenant thésard)!

Je tiens à remercier également les aquaculteurs et les écloiseurs, en particulier les équipes de la SODACAL et de l'Ecloserie de Nord avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui ont fait preuve d'une grande disponibilité.



Je souhaitais remercier également ici les équipes d'Après Bac Service et de la Mission Formation (en Nouvelle-Calédonie et en France) qui m'ont accompagné jusqu'à la Thèse et qui, je le pense, ont contribué au parcours qui m'a mené jusque là.

Enfin je voudrais adresser toute mon affection et ma reconnaissance à toute ma Grande famille sans qui je ne serais rien! Merci pour les encouragements chaleureux avant et tout au long de ce long chemin que fût la thèse.

Un grand MERCI à mes parents dont le soutien et le réconfort furent inconditionnels. Merci pour tout!

*A ma fille, Claudia, qui m'a menée jusqu'au bout de ce travail.*



# SOMMAIRE

<b>PREAMBULE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	
<b>I.1 Le problème</b> .....	<b>5</b>
<b>I.2 Démarche expérimentale</b> .....	<b>9</b>
<b>I.3 Modèle biologique</b> .....	<b>11</b>
I.3.1 Présentation de l'espèce étudiée : <i>Litopenaeus stylirostris</i>	
I.3.2 Le cycle de mue	
I.3.3 Le cycle biologique	
I.3.4 Biologie de la reproduction	
<b>I.4 Physiologie de la nutrition</b> .....	<b>21</b>
I.4.1 Eléments d'anatomie (schéma)	
I.4.2 Prise de repas et digestion	
I.4.3 Comportement alimentaire en bassin d'élevage	
I.4.4 Alimentation en crevetticulture	
<b>I.5 Reproduction en captivité de <i>L. stylirostris</i></b> .....	<b>35</b>
I.5.1 Préparation des bassins	
I.5.2 Les différentes phases de l'élevage	
I.5.3 Reproduction	
I.5.4 Elevage larvaire	
<b>I.6 Physiologie respiratoire</b> .....	<b>47</b>
I.6.1 Les gaz respiratoires	
I.6.2 La fonction respiratoire	
I.6.3 Appareils respiratoire et circulatoire	
I.6.4 Stratégie des faibles PO <sub>2</sub>	
<b>I.7 Régulation du milieu interieur</b> .....	<b>61</b>
I.7.1 Quelques rappels	
I.7.2 Types de régulation	
I.7.3 Les mécanismes de l'osmorégulation	



**MATERIEL ET METHODES**

<b>II.1</b>	<b>La station experimentale de Saint-Vincent.....</b>	<b>73</b>
<b>II.2</b>	<b>Pêche et stabulation des animaux .....</b>	<b>75</b>
II.2.1	Pêche et transfert	
II.2.2	Bacs expérimentaux et conditions d'éclairage	
II.2.3	Marquage des animaux	
II.2.4	Conditions de stabulation	
<b>II.3</b>	<b>Analyses.....</b>	<b>81</b>
II.3.1	Détermination du stade de mue	
II.3.2	Prélèvements sanguins	
II.3.3	Oxygénation du sang	
II.3.4	Osmolarité	
<b>II.4</b>	<b>Consommation d'oxygène.....</b>	<b>87</b>
<b>II.5</b>	<b>Fréquence alimentaire et temps réfractaires entre 2 repas maximisés .....</b>	<b>91</b>
<b>II.6</b>	<b>Experimentations .....</b>	<b>93</b>
II.6.1	Etude de la croissance de <i>L. stylirostris</i> en fonction de la ration.	
II.6.2	Etude de l'effet de la pêche sur la physiologie de <i>L. stylirostris</i> .	
<b>II.7</b>	<b>Statistiques.....</b>	<b>101</b>

**CARACTERISATION DU METABOLISME AEROBIE ET DES BESOINS NUTRITIFS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE LA SAISON**

<b>Introduction .....</b>	<b>105</b>
---------------------------	------------

<b>Mesures de consommation d'oxygène pré- et post-prandial en conditions estivale (Tw = 28 °C) et hivernale (Tw = 20 °C).....</b>	<b>109</b>
---	------------

**Growth:Ration relationships in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: effect of size and rearing season on maintenance energy and scope-for-growth.**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2006) Aquaculture (Soumis) .....	113
--	-----



**Influence de la temperature sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction de la saison d'élevage.**

Liet CHIM, Robert GALOIS, Jean-Louis MARTIN, Pierrette LEMAIRE, Nelly WABETE, Jean-Charles MASSABUAU, Gérard CUZON

Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Ed. Ifremer. Actes Colloq., 38, 99-105..... 159

**Conclusion** ..... 173

**CHAPITRE IV** **179**

---

**ÉTUDE DES MECANISMES EXPLIQUANT LA FRAGILITE EXCESSIVE DES ANIMAUX EN HIVER**

**Introduction** ..... 181

**Life on the edge : physiological problems in penaeid prawns, *Litopenaeus stylirostris*, living in the low side of their thermopreferendum**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2006) Marine Biology (Soumis)..... 183

**Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*.**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU

Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Ed. Ifremer. Actes Colloq., 38, 75-84..... 219

**Conclusion** ..... 233



**DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE MANIPULATION DES GENITEURS DE *LITOPENAEUS STYLIROSTRIS*****Introduction ..... 239**

**A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress.**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Dominique PHAM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2006) Aquaculture (Accepté)..... 241

**Conclusion ..... 281****CONCLUSIONS GENERALES****1. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS ..... 287****2. AVANCEES MAJEURES EN ECOPHYSIOLOGIE ..... 295**

Implications dans le domaine de la distribution géographique de l'espèce  
Renforcement de la théorie des faibles PO<sub>2</sub> dans le sang et les tissus

**3. AVANCEES MAJEURES DANS LE DOMAINE DE L'AQUACULTURE ..... 299**

Un scénario physiologique du déclenchement du syndrome 93  
La notion de pression partielle d'oxygène en aquaculture

**4. PERSPECTIVES..... 305**

Développement en écophysiologie  
Méthode d'échantillonnage sanguin  
Avancées technologiques pour la crevetticulture

**BIBLIOGRAPHIE .....309**



## PREAMBULE

L'aquaculture est une pratique qui a connu un essor considérable ces dernières années alors que tout montre bien que la ressource naturelle est mise à mal. Dominer de façon raisonnée cette pratique est donc devenu un défi important, pour mieux maîtriser à la fois les apports et les pertes au cours du processus d'élevage.

A travers le monde, l'élevage des crevettes pénéidés est une des cultures les plus profitables et la production sur les marchés a connu une croissance mondiale de 800 % de 1975 à 1993 (Chim et al., 2002), avec 50 % issu de l'élevage (Rosenberry, 2004). Ce rapide développement a été en fait confronté à des pathologies dévastatrices apparues dans les années 1980-90, illustré par l'effondrement entre 1987 et 1996 de la production de Taiwan puis de la Chine, l'Indonésie et l'Inde. La maîtrise de cette production reste donc un défi.

En Nouvelle-Calédonie, l'espèce élevée est *Litopenaeus stylirostris*. C'est la seconde production d'élevage après la production bovine. C'est aussi un secteur à l'exportation qui emploie plus de 1000 personnes dont près de la moitié en zone rurale. Le potentiel de développement est toujours important, principalement dans la Province Nord où se situe la majorité des sites aménageables. En Nouvelle Calédonie aussi il existe des risques sanitaires et un des principaux problèmes est attribué à une pathologie bactérienne saisonnière (Mermoud et al. 1998) qui a fait son apparition à l'hiver 1993. La principale parade est encore actuellement l'abandon des élevages à cette saison. En 1998, une seconde pathologie à *Vibrio* (*V. nigripulchritudo*) a fait son apparition, mais sa distribution reste heureusement limitée.

La présence de bactéries toute l'année, et dans tous les élevages, a conforté l'idée que sa seule présence n'était pas suffisante pour expliquer des mortalités se déclenchant en saison fraîche. On a donc fait l'hypothèse que le problème pouvait être le résultat d'une interaction hôte, pathogène et/ou environnement. C'est dans ce contexte, de déclenchement hivernal, que nous avons abordé ce problème de crevetticulture en explorant ce qui caractérisait le plus l'animal, d'un point de vue métabolique et respiratoire, aux limites basses de son préférendum thermique. Un point remarquable est que physiologiquement, ce qui définit certainement le plus ces crevettes pénéidés est une croissance rapide et un métabolisme exacerbé. L'ensemble requiert une prise de nourriture importante et la gestion d'un flux d'oxygène exceptionnel par comparaison aux autres crustacés ou animaux à respiration aquatique connus. Un tel métabolisme demande dans l'absolu deux choses: (i) des conditions d'oxygénation optimum, une physico-chimie de l'eau stable et un apport trophique adapté ; (ii) au niveau cellulaire, une gestion optimisée d'un des « déchets » du métabolisme oxydatif les plus toxiques, les radicaux libres. Or chez les poïkilothermes, tout changement de température et d'apport trophique est associé à des changements métaboliques profonds. Dans ce contexte, il était donc clair qu'une meilleure connaissance de la physiologie de l'espèce était une piste qui pouvait permettre de mieux comprendre les besoins de l'animal et les raisons de sa fragilisation aux périodes hivernales d'élevage avec expression de *Vibrio*.

Le Département d'Aquaculture de Nouvelle-Calédonie (DAC, IFREMER) s'est donc associé avec le Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques de l'UMR 5805 à Bordeaux – Arcachon pour étudier, au travers de cette thèse et par l'analyse des processus physiologiques sous-jacents, les caractéristiques physiologiques remarquables de *L. stylirostris* et rechercher d'éventuelles solutions à une partie des problèmes posés par la culture de ces animaux. On verra que nous avons développé un outil de gestion d'apport de l'aliment pour optimiser consommation et gestion. Une analyse des besoins métaboliques et des mécanismes de transport d'O<sub>2</sub> aux limites du thermopréférendum de l'espèce a mis en évidence l'étape limitant ses capacités de résistance au stress à 20 °C. L'application de nos résultats, et des protocoles correctifs mis au point, a d'ores et déjà permis de faire diminuer la mortalité des géniteurs de ≈ 70 à 3-5 % dans les écloséries.



**CHAPITRE I**  
**INTRODUCTION**



<b>CHAPITRE I</b> <b>INTRODUCTION</b>
--

<b>I.1</b>	<b>Le problème.....</b>	<b>5</b>
<b>I.2</b>	<b>Démarche expérimentale.....</b>	<b>9</b>
<b>I.3</b>	<b>Modèle biologique .....</b>	<b>11</b>
I.3.1	Présentation de l'espèce étudiée : <i>Litopenaeus stylirostris</i> .....	11
I.3.2	Le cycle de mue .....	13
I.3.3	Le cycle biologique .....	17
I.3.4	Biologie de la reproduction .....	19
<b>I.4</b>	<b>Physiologie de la nutrition.....</b>	<b>21</b>
I.4.1	Eléments d'anatomie (schéma).....	21
I.4.2	Prise de repas et digestion .....	27
I.4.3	Comportement alimentaire en bassin d'élevage.....	29
I.4.4	Alimentation en crevetticulture .....	31
<b>I.5</b>	<b>Reproduction en captivité de <i>L. stylirostris</i> .....</b>	<b>37</b>
I.5.1	Préparation des bassins.....	37
I.5.2	Les différentes phases de l'élevage.....	37
I.5.3	Reproduction .....	39
I.5.4	Elevage larvaire.....	45
<b>I.6</b>	<b>Physiologie respiratoire .....</b>	<b>47</b>
I.6.1	Les gaz respiratoires.....	47
I.6.2	La fonction respiratoire .....	51
I.6.3	Appareils respiratoire et circulatoire .....	55
I.6.4	Stratégie des faibles PO <sub>2</sub> .....	57
<b>I.7</b>	<b>Régulation du milieu intérieur.....</b>	<b>63</b>
I.7.1	Quelques rappels .....	63
I.7.2	Types de régulation .....	63
I.7.3	Les mécanismes de l'osmorégulation .....	67

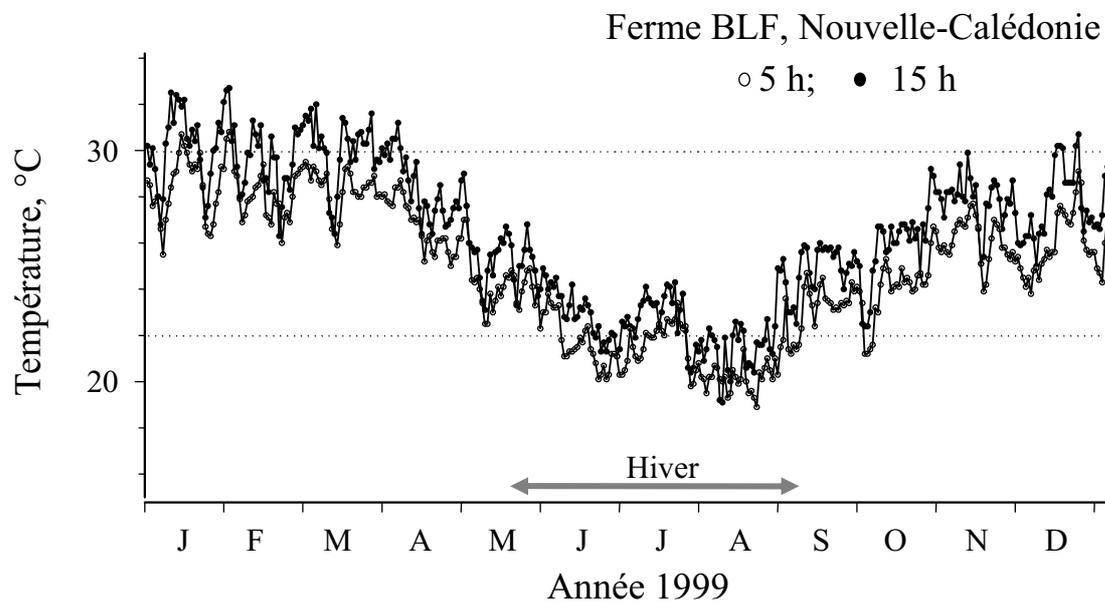


## **I.1 LE PROBLEME**

*A l'échelle mondiale*, l'élevage de la crevette est particulièrement important et dynamique. Il a connu une croissance de 400% entre 1975 et 1985 et 350% entre 1985 et 1993 (Chim *et al.*, 2002). Le tonnage produit en 2004 était de 2 millions de tonnes annuelles ce qui représente 50% de la fourniture mondiale (Rosenberry, 2004). Ce rapide développement de la crevetticulture, avec l'intensification, a été confronté à des pathologies dévastatrices apparues dans les années 1980-90. Les illustrations en sont l'effondrement de la production de Taiwan en 1987-88, puis de Chine, d'Indonésie, d'Inde dans les années 1993 à 1996 sous l'effet conjugué des virus WSSV (White Spot Syndrom Virus) et YHV (Yellow Head Virus). Les maladies bactériennes, principalement causées par des Vibrionacées, ont parfois été décrites comme responsables de phénomènes de mortalité massive, mais le recours aux antibiotiques a jusqu'alors permis d'en limiter l'impact économique au niveau mondial. Les maladies infectieuses sont donc considérées actuellement comme le plus gros frein au développement de la crevetticulture.

*En Nouvelle-Calédonie*, l'espèce élevée, *Litopenaeus stylirostris*, a été importée du Mexique en 1980. Sa zone de distribution dans le Pacifique va du nord du Pérou au nord du Mexique, où les températures minimum et maximum peuvent atteindre 20 °C et 30 °C respectivement.

La mise en place d'une production commerciale a commencé à partir des années 1980. Dès lors, le développement a été rapide et spectaculaire jusqu'à la saison fraîche 1993 où une pathologie saisonnière, à caractère épizootique, a fait son apparition. Cette maladie, qui a reçu le nom de « *Syndrome 93* » a été attribuée à une bactérie, *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998; Mermoud *et al.*, 1998). Les contraintes induites, principalement l'abandon des élevages de saison fraîche comme principale parade sanitaire, ont entraîné une baisse de la production. En 1998, une nouvelle pathologie attribuée à un autre *Vibrio* (*V. nigripulchritudo*) a fait son apparition, elle affecte à ce jour une seule zone d'élevage avec deux fermes mitoyennes. Malgré ces deux vibrioses saisonnières, la production en 2004 s'est élevée à 2211 tonnes avec une surface de 650 ha de bassins. C'est la seconde production d'élevage du pays ; elle vient immédiatement après la production bovine. La crevetticulture représente le second secteur à l'exportation (loin derrière le nickel) pour un chiffre d'affaires de 22.7 millions d'Euros en

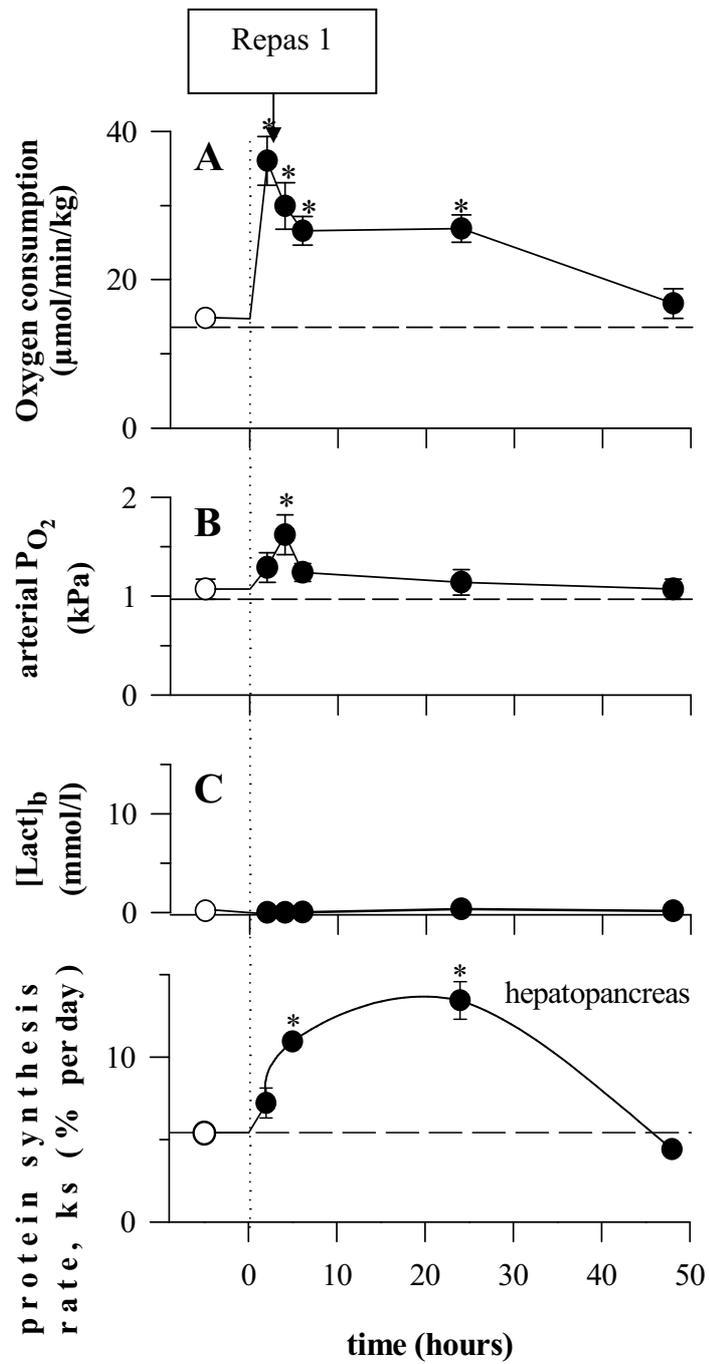


**Figure I.1** : Evolution annuelle de la température mesurée quotidiennement à 5 et 15 h dans un bassin typique de crevetticulture (Blue Lagoon Farm, Koné) en Nouvelle-Calédonie (Della Patrona, communication personnelle). Notez qu'en été, la variation à court terme peut atteindre 7 °C et 4 °C en hiver.

2003/2004. Elle compte 4 écloséries, 18 fermes (de 11 à 130 ha), 2 provendes (fabrication d'aliments) et 2 usines de conditionnement. Cette activité représente 1000 emplois dont plus de la moitié se situe en zone rurale dans les fermes de production. L'activité présente toujours un important potentiel de développement, principalement dans la Province Nord où se situe la majorité des sites aménageables.

**Le problème à résoudre.** Le «Syndrome 93» qui touche toute la filière, est le problème majeur à résoudre en terme de finalité économique et une piste centrale est l'aspect pathologie. La présence de *Vibrio penaeicida* toute l'année dans tous les élevages (Goarant *et al.*, 2004) et le synchronisme du syndrome 93 aux saisons de transition été-hiver, ont cependant conforté l'idée que la seule présence de la bactérie n'était pas suffisante. Les observations de terrain font apparaître une forte relation entre le déclenchement du syndrome et le régime thermique d'entrée et de sortie de l'hiver où la température oscille autour de 22 °C (Fig. I.1). Or nous savons que ces chutes de température entraînent des modifications de la physiologie et de l'état immunitaire de l'hôte (Lemaire *et al.*, 2002 ; Le Moullac et Haffner, 2000) et de la pathogénicité des souches bactériennes en cause (Goarant *et al.*, 2000). C'est également aux périodes hivernales que les déficits s'accumulent dans les élevages, et qu'on assiste alors à une véritable «pénurie trophique» (Della Patrona *et al.*, en préparation). Cette « pénurie trophique », pourrait être à l'origine de carences nutritionnelles des animaux qui deviendraient ainsi plus sensibles au régime thermique typique de cette période (Chim *et al.* 2001). Cependant, il est encore difficile aujourd'hui de cerner le rôle propre de chacun de ces trois compartiments, hôte, pathogène et environnement, et les interactions les reliant.

D'un point de vue physiologique, ce qui caractérise certainement le plus les crevettes pénéides sélectionnées pour l'aquaculture est une croissance rapide et un métabolisme exacerbé. L'ensemble requiert une prise de nourriture importante et la gestion d'un flux d'oxygène exceptionnel par comparaison aux autres crustacés ou animaux à respiration aquatique connus. Une telle consommation d'O<sub>2</sub> demande dans l'absolu deux choses : (i) au niveau environnemental, des conditions d'oxygénation optimum, une physico-chimie de l'eau stable (température, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, salinité) et un apport trophique adapté ; (ii) au niveau cellulaire, une gestion optimisée de ce qui apparaît aujourd'hui comme un des « déchets » du métabolisme oxydatif les plus toxiques, les radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species). Or chez les poïkilothermes, tout changement de température est associé à des changements de métabolisme, d'état acide-base du sang, des capacités de transport des gaz du



**Figure I.2 :** Evolution de la consommation d'oxygène (A), de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel (B), de la concentration de lactate dans le sang (C) et du taux de synthèses protéiques dans l'hépatopancreas de *Carcinus maenas* en normoxie à 15 °C, après une prise de nourriture (Mente *et al.* 2003).

sang et de régulation des échanges ioniques. Dans ce contexte, il était clair qu'une meilleure connaissance des particularités physiologiques de l'espèce était une piste qui devait permettre de mieux comprendre les raisons de la fragilisation de l'animal aux périodes hivernales d'élevage et *in-fine* de l'expression de *Vibrio penaeicida*.

## **I.2 DEMARCHE EXPERIMENTALE**

La démarche a consisté à d'abord caractériser les besoins métaboliques et alimentaires de l'espèce. Notre approche a été réalisée dans le contexte de la distribution des animaux par rapport à un préférendum thermique et aux problèmes de la vie aux limites basses de ce thermopréférendum. Notre analyse a également été réalisée dans le cadre de la théorie des faibles niveaux d'oxygénation (Massabuau 2001 ; 2003 ; Corbari *et al.* 2004, 2005). L'idée globale est que *Litopenaeus stylirostris*, avant et après un repas en normoxie et, sans stress thermique, devrait fonctionner avec des pressions partielles d'oxygène,  $PO_2$ , dans le sang artériel naturellement basses comme de très nombreux animaux aquatiques ( $\approx 1-2$  kPa ; pour comparaison,  $PO_2$  dans le sang artériel humain est 10-14 kPa et dans l'air ou dans une eau aérée, 21 kPa). Ce cadre conceptuel nous a également servi à aborder les problèmes de dérèglements physiologiques des animaux au cours des manipulations. Leur connaissance est certainement particulièrement importante pour tout travail chez *L. stylirostris*.

Pour développer cette approche écophysiologique, nous nous sommes largement basés sur des travaux récemment réalisés chez le crabe vert *Carcinus maenas*, qui est sans conteste le crustacé le plus étudié au monde, et le homard *Homarus gammarus*. La relation entre prise alimentaire, fonctionnement du système digestif antérieur, synthèse protéique et besoins en oxygène a été récemment ré-analysée chez ces animaux (Clemens *et al.* 1998; Legeay et Massabuau 1999, 2000a, 2000b; Mente *et al.* 2003). L'augmentation de métabolisme oxydatif après une prise de nourriture (SDA, Specific Dynamic Action), est un phénomène largement décrit (Houlihan *et al.* 1990 ; Jobling 1981 ; Legeay et Massabuau 1999 ; Mente *et al.* 2003 ; McGaw, 2005). Comme le montre la figure I.2 (Mente *et al.* 2003), chez *Carcinus maenas*, la prise de nourriture provoque une augmentation de la consommation d'oxygène qui est multipliée par un facteur 3 puis 2 durant la période de 6 à 24 h. Ce n'est qu'entre 24 et 48 h qu'elle revient à son niveau initial. Parallèlement ces animaux maintiennent leur pression partielle d'oxygène dans le sang artériel ( $PaO_2$ ) à des valeurs très faibles ( $\approx 1-2$  kPa), alors qu'il n'y a aucune limitation imposée par le milieu ambiant et que dans une eau normoxique  $PO_2 = 21$  kPa. La prise de nourriture est accompagnée d'une très faible augmentation transitoire de



PO<sub>2</sub> artériel en valeur absolue jusqu'à 1,5 kPa. L'état transitoire 1-5 h a été attribué à la reconfiguration par l'oxygène, agissant comme neuromodulateur, de la partie du système nerveux contrôlant la fonction des dents gastriques et du pylore pendant la période de mastication stomacale et de filtration pylorique (Clemens *et al.* 1998). La redistribution du sang dans l'organisme pendant cette période a été récemment analysé par McGaw (2005) chez *Cancer magister*. Un point remarquable est que malgré les faibles PO<sub>2</sub> artériels mesurées, la consommation d'oxygène n'est pas limitée et le métabolisme anaérobie n'est pas déclenché puisqu'il n'y a aucune augmentation du lactate sanguin. Cependant, un autre point remarquable est que cette régulation limite les synthèses protéiques dans la majorité des tissus, y compris dans l'hépatopancréas qui est le siège principal des synthèses (Mente *et al.* 2003).

Le problème des faibles oxygénations au niveau cellulaire, qu'on sait avoir pu exister depuis au moins 500-600 millions d'années, i.e. depuis le Cambrien (Corbari *et al.* 2004, 2005, Corbari 2004), apparaît donc aujourd'hui comme pouvant faire partie des plus vieux principes de fonctionnement du vivant. Nous verrons dans ce travail, que la force apparente de cette « règle » apparaît telle que l'animal peut mourir d'une incapacité à augmenter, même légèrement et transitoirement, l'état d'oxygénation de son sang. Nous montrerons comment une application raisonnée de cette théorie nous a permis de proposer un protocole qui a abouti à une réduction de mortalité des géniteurs de 60-70 % à 3-5 % dans une éclosion commerciale qui fournit les post-larves pour de nombreuses fermes du territoire calédonien.

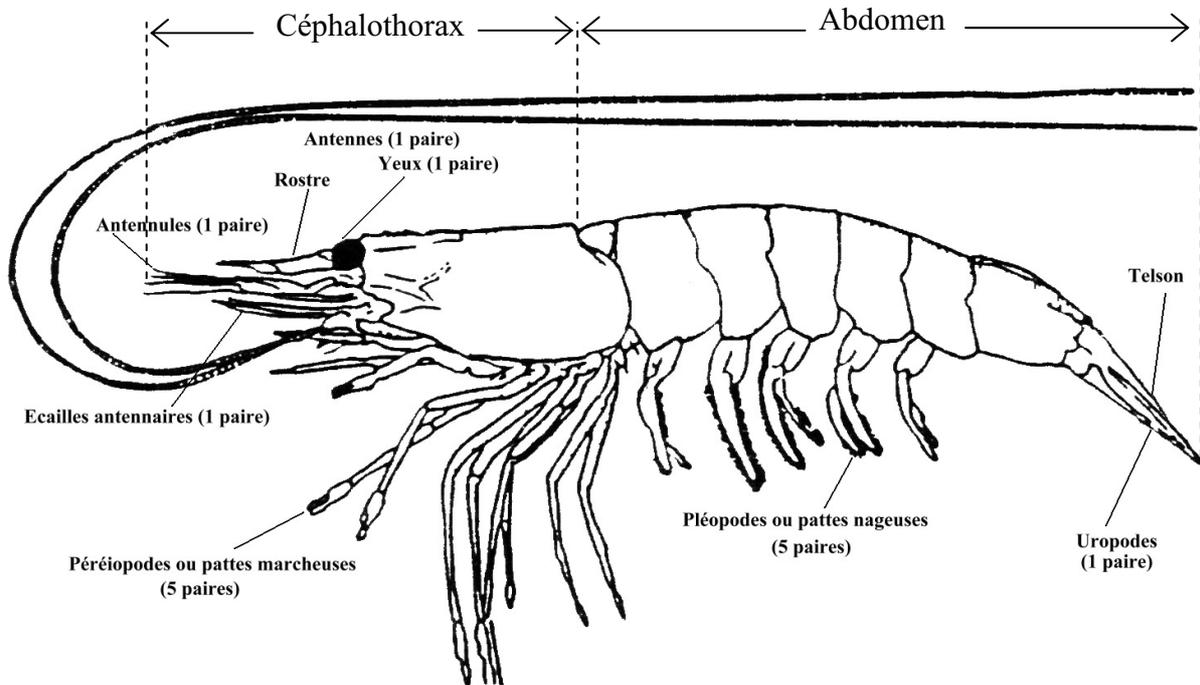
### **I.3 MODELE BIOLOGIQUE**

#### **I.3.1 Présentation de l'espèce étudiée : *Litopenaeus stylirostris***

##### a Taxonomie

L'espèce *stylirostris* se situe dans la classification comme appartenant à :

Phylum :	Arthropoda
Sous-phylum :	Crustacea
Classe:	Malacostraca
Sous-Classe :	Eumalacostraca
Super-Ordre :	Eucarida
Ordre:	Décapoda
Sous ordre:	Dendrobranchiata
Super-Famille:	Penaeoidea



**Figure I.3 :** Morphologie externe d'une crevette pénée.

Famille :	Penaeidae
Genre:	Litopenaeus (Perez Farfante, 1969)
Espèce :	<i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson, 1874)

*L. stylirostris* est communément appelée "crevette bleue" de par sa couleur.

#### b Origine et distribution

Les crevettes pénéides vivent par faibles profondeurs (0 à 25 m) et leur distribution est limitée à une zone déterminée par les isothermes de surface de 20°C en été, ce qui correspond à peu près à 40° de latitude Nord et Sud. Les températures les plus basses observées dans les élevages calédoniens atteignant cette limite basse, et la dépassant parfois, nous nous sommes particulièrement intéressés aux problèmes posés à l'animal dans ces conditions. La question posée a été en particulier : quels sont les mécanismes physiologiques sous-jacents qui limitent la répartition géographique de l'espèce ? A l'intérieur de cette vaste zone, il existe des pénéides dans toutes les mers. L'espèce *Litopenaeus stylirostris* est originaire d'Amérique centrale et du sud, son aire de répartition se situe essentiellement à la hauteur de la ceinture tropicale, plus particulièrement étendue dans le Pacifique Est au niveau du Nicaragua, du Costa-Rica, de Panama, de la Colombie, de l'Equateur et du nord du Pérou.

#### c Morphologie externe

Comme tous les crustacés, les pénéides sont caractérisées par une métamérisation du corps. Les métamères sont regroupés en trois parties : une tête (ou acron), un thorax (ou péréion) et un abdomen (ou pléon) terminé par le telson. Chez les crustacés décapodes, le segment thoracique est incorporé à la tête formant ainsi le céphalothorax (Fig. I.3). On reconnaît les pénéides à la présence de pinces aux trois premières paires de pattes thoraciques, ou péréiopodes. Ces crevettes présentent un rostre bien développé, garni d'épines dorsales et ventrales. La partie abdominale est composée de 6 métamères portant chacun une paire de pléopodes (sauf le dernier : telson). Les pléopodes sont des appendices locomoteurs.

### **I.3.2 Le cycle de mue**

Chez les crustacés, la croissance est un phénomène discontinu : elle se fait par mues successives. L'ancienne cuticule est remplacée par une nouvelle, permettant une augmentation du poids et de la taille de l'animal.



Le cycle de mues correspond à la répétition cyclique des exuviations et peut être divisé en trois grandes étapes :

	POSTMUE	INTERMUE	PREMUE
Exuviation 1	A B 1-2 C 1-2-3	C 4	D 0 D 1-2-3-4   Exuviation 2

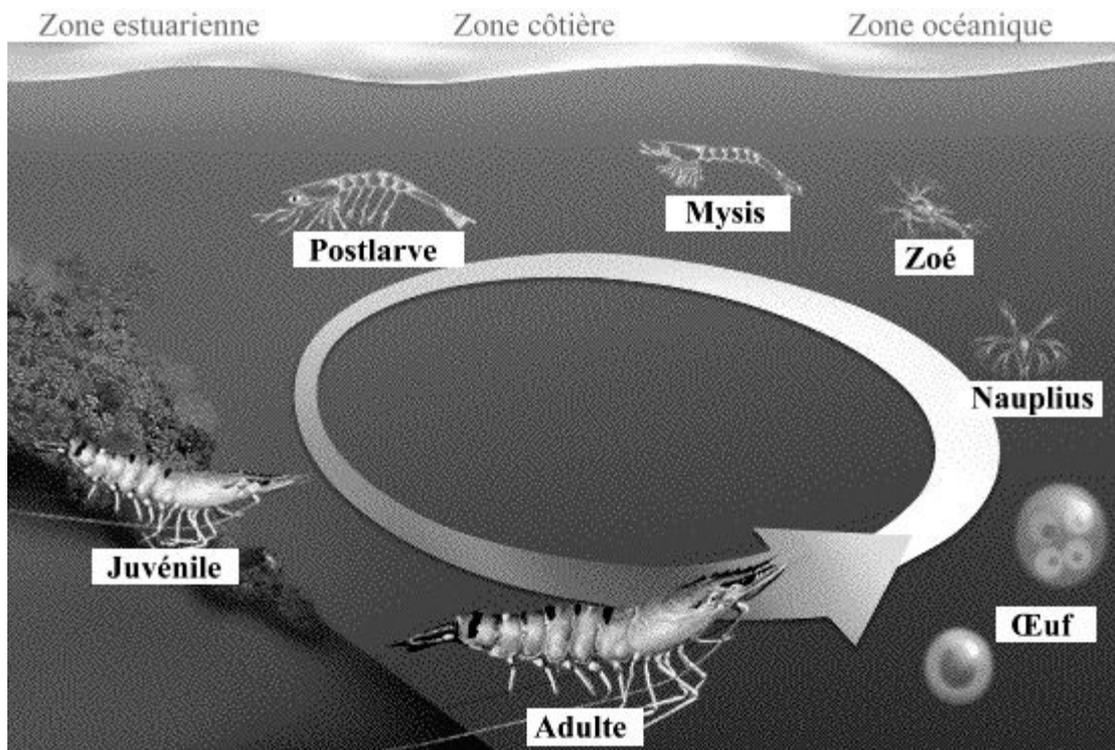
*La Prémue* est caractérisée par la mise en place sous la cuticule de 2 couches pré-exuviales puis par la dégradation progressive des anciennes strates.

- Stade D<sub>0</sub> : L'épiderme se décolle et la taille des cellules épidermiques augmente.
- Stade D<sub>1</sub> : Des enzymes (chitinases et protéases) sont sécrétées pour la dégradation de l'ancienne cuticule et l'épiderme sécrète la nouvelle épicuticule.
- Stade D<sub>2</sub> : La dégradation des anciennes couches continue, la couche pigmentaire est mise en place.
- Stade D<sub>3</sub> : La destruction des anciennes couches est achevée et la couche membraneuse est gélifiée ce qui facilitera le dégagement de l'animal de l'ancienne cuticule au moment de l'exuviation.
- Stade D<sub>4</sub> : ouverture des fentes exuviales qui sont des lignes de moindre résistance de la cuticule, situées au niveau de la liaison céphalothorax-abdomen.

*L'exuviation.* Le céphalothorax bascule vers l'avant, tous les appendices avant se dégagent par mouvements péristaltiques et l'abdomen s'extrait de l'ancienne cuticule. Clemens *et al.* (1999) ont montré qu'un état particulier de l'oxygénation du sang au moment de la mue jouait un rôle particulier dans sa réalisation. Nous n'avons pas abordé cette question dans ce mémoire mais il est certain qu'une étude sur ce problème particulier serait particulièrement intéressante chez la crevette. Après la mue, l'exuvie est parfois réabsorbée (récupération du calcium) par l'animal une fois que les pièces buccales se sont recalciifiées. A l'exuviation, la cuticule est formée par les deux couches préexuviales non durcies, l'animal est donc mou, et la croissance peut intervenir à ce moment. Celle-ci s'accompagne d'une entrée massive d'eau, au niveau des branchies et de l'intestin permettant une croissance rapide en taille et en poids. Cette eau sera par la suite remplacée par des tissus. Les transports d'eau sont passifs (phénomènes osmotiques) et sont préparés par des transports ioniques actifs (absorption de sodium) réalisés au niveau des branchies.

*La postmue.* L'eau absorbée au moment de l'exuviation est progressivement remplacée par des protéines.

- Stade A : La cuticule est minéralisée par dépôt de sels de calcium.



**Figure I.4 :** Le cycle Biologique des crevettes pénéides. (Alday de Graindorge et Flegel 1999).

- Stade B<sub>1-2</sub> : La couche principale commence à être synthétisée, l'animal devient dur et la cuticule est cassante. Les pièces buccales sont recalcifiées permettant la reprise de l'alimentation.

- Stade C<sub>1-2-3</sub> : Fin de la synthèse de la couche principale et membraneuse. L'animal est entièrement calcifié (la couche calcifiée atteint son épaisseur définitive), il y a reconstitution des organes et des muscles.

*L'intermue* (stade C<sub>4</sub>) : est défini comme l'état de stabilité physiologique. Il y a accumulation de réserves dans les cellules adipeuses de la glande digestive, dans les muscles et les tissus adipeux. La durée de ce stade est très variable : minimale chez les larves, elle augmente avec la taille de l'animal.

### **I.3.3 Le cycle biologique**

Le cycle biologique (figure I.4) de toutes les espèces de Pénéides de la zone littorale se déroule généralement de la même manière. Il peut être divisé en quatre phases qui se caractérisent par des changements morphologiques, des modifications du comportement et de l'alimentation ainsi que des changements d'habitat.

La reproduction et la ponte a lieu en mer, sur des fonds de quelques dizaines de mètres de profondeur. Les oeufs, pondus libres dans l'eau, sont fécondés au moment de leur expulsion. Ils sont pélagiques quelques temps puis deviennent benthiques (ils se déposent sur le fond). Après une courte période de développement embryonnaire (10-12 h), se produit l'éclosion libérant des nauplii (0.3-0.7 mm), 1<sup>er</sup> stade du développement larvaire qui est vitellotrophe. Cinq-six stades naupliens successifs durant chacun 4-8 h (selon la température) sont décrits.

Le dernier stade nauplius donne naissance à la larve zoé (0.9-2.6 mm) qui passe par 3 stades successifs (zoé 1, 2, 3). Chaque stade zoé dure un peu plus de 24 h en fonction de la température d'élevage. Les zoés se nourrissent d'algues phyto-planctoniques dont la taille varie de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres de diamètre.

La dernière forme zoé se métamorphose en une larve mysis (2.6-4.5 mm) qui passe également par trois stades (mysis1, 2, 3) séparés par des mues. Chaque stade mysis dure un peu plus de 24h selon les températures d'élevage. Les mysis ont un régime carnivore strict. A la suite d'une profonde métamorphose la larve mysis 3 donne naissance à une post-larve (PL) qui présente la plupart des caractéristiques morphologiques de l'animal adulte. Les plus



jeunes post-larves mènent une vie pélagique, puis, au bout de dix à vingt jours elles deviennent benthiques. Elles se concentrent alors près des côtes où on les retrouve fréquemment dans les estuaires et les lagunes d'eau saumâtre. L'acquisition de la morphologie définitive est réalisée en un mois et demi à 2 mois après la naissance, selon la température de l'eau. Après une période de croissance rapide de quelques semaines en lagune où la production biologique est élevée et la nourriture abondante, les crevettes qui mesurent alors de 8 à 12 cm de longueur, quittent les lagunes pour retrouver la bande côtière où se poursuivra leur vie adulte. Leur comportement est alors soumis à un rythme circadien plus ou moins marqué suivant l'espèce considérée. Très généralement chez les crevettes péneïdes, c'est au cours de la phase nocturne que l'animal accomplit quelques-unes des activités essentielles comme la mue et la reproduction (accouplement, ponte).

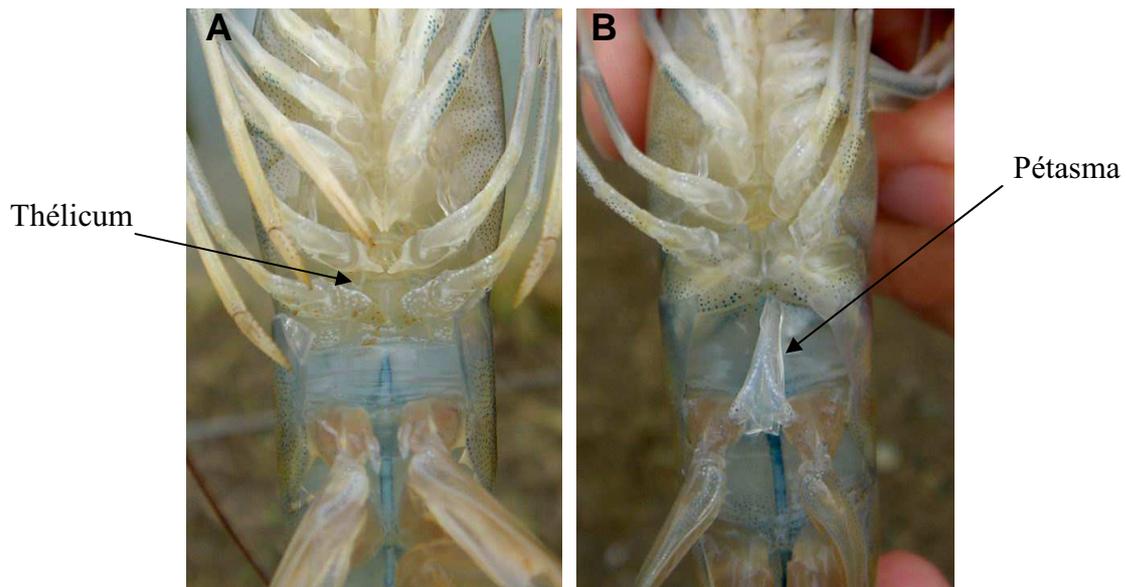
Une fois en mer les crevettes vont poursuivre leur croissance pendant encore 8 à 12 mois avant de se reproduire. À l'état sauvage, le cycle prend une quinzaine de mois environ alors qu'en élevage un géniteur est obtenu en 9-10 mois.

#### **I.3.4 Biologie de la reproduction**

Chez la crevette femelle, la paire d'ovaires est en position dorsale disposée de part et d'autre de l'axe médian de l'animal. Au niveau du céphalothorax, les ovaires sont constitués de deux lobes antérieurs et de 6 lobes latéraux. Les deux oviductes partent des lobes latéraux et débouchent sur les pores génitaux situés à la base de la 3<sup>ème</sup> paire de péréiopodes. L'ovogénèse débute avec la méiose qui se déroule dans la zone germinale de la gonade et donne les oogonies. Celles-ci sortent de la zone germinative pour donner les oocytes qui vont faire leur vitellogénèse. Deux étapes de la vitellogénèse sont décrites : la vitellogénèse primaire (V1) avec synthèse protéique endogène de l'ovocyte qui augmente de taille et la vitellogénèse secondaire (V2) ou exogène caractérisée par une accumulation de vitellus d'origine endogène et exogène (Charniaux-Cotton, H. 1985).

La vitellogénèse est inhibée par la VIH (Vitellogenesis-Inhibiting Hormone), un neuropeptide produit au niveau du pédoncule oculaire. La VIH, synthétisée dans le complexe *medulla terminalis* et organe X, est sécrétée et stockée dans la glande du sinus d'où elle est libérée dans l'hémolymphe. La régulation hormonale de la vitellogénèse ferait également intervenir un facteur stimulateur et des hormones stéroïdes.

L'organe sexuel externe femelle est constitué par le thélycum (Fig. I 5A) qui est une



**Figure I.5** : Dimorphisme sexuel chez *L. stylirostris*. A, femelle; B, mâle.

modification de la plaque sternale formant une légère dépression permettant la fixation des spermatophores

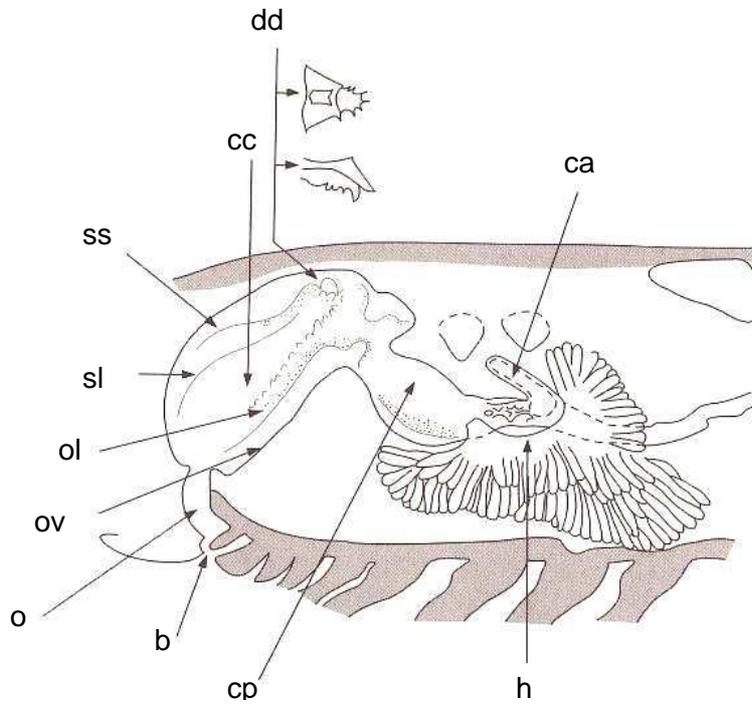
Chez le mâle, la spermatogenèse se réalise dans une paire de testicules constitués de tubules séminifères (unité fonctionnelle) organisés en lobes. Les testicules situés en dessous du coeur, reposent sur l'hépatopancréas. Les spermatozoïdes sont évacués vers les spermiductes qui débouchent sur les pores génitaux situés à la base de la 5ème paire de péréiopodes (pattes ambulatoires). Les cellules épithéliales des spermiductes sécrètent l'enveloppe du spermatophore qui vient entourer les spermatozoïdes. Comme chez les femelles la VIH participe à la régulation du développement des organes génitaux et de la spermatogenèse. Il existe également l'hormone androgène sécrétée par la glande androgène (glande endocrine fixée sur l'ampoule terminale du spermiducte). L'hormone androgène induit la différenciation mâle chez les animaux juvéniles; en son absence (ablation de la glande androgène), le jeune mâle se différencie en femelle (Charniaux cotton et Payen 1988). Chez les mâles pubères, les endopodites de la première paire de pléopodes se joignent pour former le petasma (Fig. I 5B). Cet organe intervient lors de la copulation pour le transfert des spermatophores.

La copulation de la crevette *L. stylirostris* se fait en intermue (cuticule dure) en eau de mer 35 ‰. En milieu naturel, le mâle dépose les spermatophores au niveau du thélycum de la femelle mature. La ponte se déroule dans l'heure qui suit la copulation, la femelle nage alors lentement et disperse les oeufs dans l'eau avec des mouvements rapides de ses pléopodes. Au moment de l'expulsion les œufs entrent en contact avec les spermatozoïdes, la fécondation est donc externe. Nous verrons plus loin les pratiques de base de la reproduction artificielle en élevage.

## **I.4 PHYSIOLOGIE DE LA NUTRITION**

### **I.4.1 Eléments d'anatomie (schéma)**

Le tractus digestif des décapodes peut être subdivisé en 3 parties : tube digestif antérieur, intestin moyen et intestin postérieur (Fig. I.6). Les tubes digestifs antérieur et postérieur, d'origine ectodermique, sont recouverts d'une fine cuticule qui est renouvelée à chaque mue. L'intestin moyen est d'origine endodermique.



**Figure I.6 :** Appareil digestif d'une crevette pénéide. (d'après Ceccaldi 1997).  
 b, bouche ; ca, caecum antérieur ; cc, chambre cardiale ; cp, chambre pylorique ; dd, dent dorsale ; h, hépatopancréas ; o, œsophage ; ol, ossicules latéraux ; ov, ossicules ventraux ; sl, sillon latéral ; sv, sillon ventral.

### a Tube digestif antérieur

Le tube digestif antérieur des crustacés décapodes est formé de 3 parties distinctes : la bouche, l'œsophage, et l'estomac.

*La bouche* est entourée par plusieurs paires d'appendices spécialisés dans la chémoréception et la préhension : maxilles, maxillules, mandibules et maxillipèdes.

*L'œsophage* est chez les crevettes péneïdes relativement court et musculéux constitué d'une paroi interne de nature chitino-protéique souple.

*L'estomac* est constitué d'une chambre cardiaque et d'une chambre pylorique. Chez les crevettes péneïdes, la partie antéro-ventrale de la chambre cardiaque comprend une crête garnie d'une rangée de 14 ossicules calcifiés et articulés. Ces pièces dotées d'une musculature spéciale constituent le moulin gastrique, organe de broyage qui comprend également une dent dorsale puissante. Ossicules et dent sont renouvelés à chaque mue ainsi que les parois de l'œsophage et de l'estomac. Les formations calcifiées se prolongent dans la chambre pylorique. Cette chambre est constituée de replis, d'épines calcifiées et de soies qui servent de filtre et ne laissent passer que les particules les plus fines du bol alimentaire. Les particules ayant franchi ce filtre sont dirigées vers l'intestin moyen et l'organe d'absorption, l'hépatopancréas. Chez la plupart des espèces le pH du contenu stomacal demeure neutre ou légèrement alcalin. L'organe ne comporte aucune glande ou cellule à sécrétion acide ou enzymatique.

### b Intestin moyen et hépatopancréas

L'intestin moyen qui va du pylore au rectum est rectiligne. Dans son épithélium on distingue des cellules nerveuses, des hémocytes ainsi que des cellules de type endocrine. Cet épithélium sécrète du mucus qui enrobe les déchets solides issus de l'estomac et une pellicule de chitine qui forme la membrane péritrophique des excréments. La partie distale de l'intestin moyen, riche en mitochondries pourrait jouer un rôle dans la régulation ionique.

La glande digestive ou hépatopancréas est chez les crevettes péneïdes un organe massif constitué de deux lobes symétriques enveloppés de tissu conjonctif. Elle est située dans la partie dorsale du céphalothorax immédiatement sous le cœur. Chaque lobe est constitué de centaines de tubules fermés à une extrémité et débouchant de l'autre sur deux chambres symétriques qui s'ouvrent dans la chambre pylorique. La lumière de chaque tubule est bordée



d'un épithélium unicellulaire enveloppé d'un double réseau de fibres musculaires longitudinales et circulaires assurant des mouvements péristaltiques permettant le transport des phases liquides. Des études histologiques ont montrés quatre types cellulaires constitutifs de l'épithélium de ces tubules. Ces cellules sont réparties en trois zones : (i) la zone distale où se produit la différenciation cellulaire à partir de cellules souche ; (ii) la zone intermédiaire fonctionnelle constituées de cellules stockant les produits finaux de la digestion et les cellules sécrétrices d'enzymes ; et (iii) la zone proximale où les cellules dégènèrent et sont rejetées dans la lumière du tube digestif. Le fait que la sécrétion d'enzymes et l'absorption sont assurées à l'intérieur d'un même organe, l'hépatopancréas, est un caractère distinctif des crustacés par rapport aux vertébrés.

Les enzymes digestives des crustacés produites par l'hépatopancréas n'ont pas encore été totalement inventoriées. Cependant un certain nombre d'enzymes ont été caractérisées qualitativement (peu quantitativement) (Ceccaldi 1997) :

- les enzymes protéolytiques : parmi les protéases, la trypsine est synthétisée de façon massive et peut représenter 1/3 des protéines solubles de l'hépatopancréas et la chymotrypsine est également bien représentée chez les crevettes pénéides

- les enzymes glycolytiques sont au nombre de quatre dont deux sont systématiquement retrouvées chez les crustacés: l'amylase et la chitinase. L'activité de la chitinase est réduite et ne permet qu'une digestion partielle des exuvies ingérées par les crevettes.

- les lipases des crustacés ont été très peu étudiées. De nombreuses estérases ont été mises en évidence, mais on connaît mal leur localisation et leur rôle précis.

Chez les crustacés, il n'existe pas de sels biliaries mais des composés doués de propriétés tensioactives comparables.

### c Tube digestif postérieur

C'est une formation tubulaire à replis longitudinaux comportant des muscles circulaires qui assurent la défécation par des mouvements péristaltiques et la réabsorption de l'eau en milieu marin ou hypersalé.



#### **I.4.2 Prise de repas et digestion**

La manière dont la crevette se dirige vers l'aliment et se décide à le consommer est déterminée par des chémorécepteurs externes localisés sur les appendices (Lee et Meyers 1997). Certaines substances (acides aminés, bases organiques, nucléotides et nucléosides, des hexoses) sont en effet connues comme étant des molécules attractantes et phagostimulantes.

Une fois l'aliment saisi, la crevette se nourrit lentement et le temps du repas sera d'autant plus long que la consistance de l'aliment sera plus dure et que les particules seront plus grosses.

La digestion se déroule ensuite en trois phases. La première phase de trituration et de broyage de l'aliment est assuré par les appendices péri-buccaux et parachevé par l'estomac. De cette phase mécanique va dépendre l'efficacité de la digestion de l'aliment. La nourriture est broyée par le moulin gastrique puis mélangée à des enzymes digestives qui proviennent de l'hépatopancréas dont elles ont été expulsées grâce à la contraction des tubules. La digestion est uniquement enzymatique, l'absence de sécrétion acide ne permettant pas de digestion chimique.

Les produits de cette pré-digestion mécanique et enzymatique, le chyme (aliments semi-solides partiellement digérés) sont filtrés et envoyés dans l'hépatopancréas. Les particules trop grandes pour entrer dans l'hépatopancréas (diamètre supérieur à 100 nm) passent directement dans l'intestin moyen pour être éliminées. Le reste est aspiré dans les tubules où s'effectue la fin de la digestion enzymatique et l'absorption des produits de la digestion. Dans un deuxième temps les débris cellulaires sont extrudés hors de l'épithélium des tubules de l'hépatopancréas pour être à leur tour éliminés. Enfin, dans un dernier temps l'ensemble des résidus passe dans le tube digestif postérieur pour être éliminé. L'hépatopancréas reste alors inactif jusqu'au prochain repas.

Des mesures de digestibilité ont été conduites chez les crevettes pénéides avec des aliments complets ou des ingrédients entrant couramment dans la composition de ces derniers (Lee et Lawrence 1997). Les coefficients d'utilisation digestive (CUD) des protéines sont souvent supérieurs à 90 %. Ceux des lipides sont du même ordre de grandeur et se situent autour de 80 %. Dans le cas de l'amidon, les digestibilités ont également des valeurs relativement élevées comprises entre 70 et 94 %. Les CUD des différents macronutriments peuvent varier avec la nature et le traitement technologique des matières premières.



La digestibilité peut également varier avec l'âge des animaux et l'influence des facteurs abiotiques comme la température a été très peu étudiée.

#### **I.4.3 Comportement alimentaire en bassin d'élevage.**

Le comportement des crevettes péneïdes dans la nature comme en bassin a été étudié *in situ* par Rod McNeil (2005). Il évolue avec le stade de développement de l'animal.

Dans la nature, il est rare de rencontrer des animaux de moins de 5 g sur le fond, ils sont très généralement accrochés à des supports (racines de palétuvier, herbier...) à la recherche de proies (copépodes par ex) et de déchets. Ce comportement se satisfait mal des conditions d'élevage en bassin où le fond est le seul support disponible dont la surface est 13 fois inférieure à celle d'un herbier. Dans le bassin d'élevage, les animaux juvéniles passent leur temps à errer en solitaire sur les zones les moins profondes à la recherche de nourriture (détritiques, aliments vivants et artificiel).

Les juvéniles de plus de 5 g ont un comportement distinct le jour et la nuit. Au levé du jour les groupes de taille réduite, d'une dizaine d'individus, commencent à se déplacer autour du bassin à la recherche d'aliments et se rassemblent au fur et à mesure pour former de larges troupes composés de plusieurs milliers d'individus. Le troupeau se structure en forme de goutte d'eau avec les crevettes les plus grosses en tête et les plus petites en queue. Il se déplace assez rapidement notamment pour les espèces les plus benthiques comme *Litopenaeus stylirostris* et *L. vannamei*. Lorsque le troupeau rencontre de l'aliment les animaux prennent avec eux un granulé et continue à se déplacer avec le groupe tout en grignotant une portion du granulé pour finir par le laisser tomber un peu plus loin.

A la nuit tombée les troupes se dissocient et les animaux adoptent un comportement solitaire. C'est durant la nuit principalement que la crevette fouille le sédiment à la recherche de proies vivantes.

Bien que le comportement de la crevette, notamment de *L. stylirostris* tend à devenir plus benthique chez les gros animaux, elle se nourrit également sur les substrats verticaux.



#### **I.4.4 Alimentation en crevetticulture**

##### a Aliments crevette.

Pour les filières crevetticoles semi-intensives comme en Nouvelle-Calédonie, l'utilisation d'un aliment composé est obligatoire pour obtenir des croissances et des survies satisfaisantes. Mais l'utilisation d'un aliment composé ne suffit pas pour obtenir des résultats corrects en termes de croissances et de survie : différents facteurs rentrent en jeu tels que la formulation de l'aliment et la qualité des ingrédients ; la méthode de fabrication et les caractéristiques physiques du granulé ; la méthode et le régime de distribution ; l'environnement aquatique et la production naturelle.

Les besoins nutritionnels des crevettes se caractérisent par :

- des besoins protéiques élevés (comparativement à ceux des mammifères terrestres et des volailles) qui doivent être couverts par des protéines de haute qualité en particulier des protéines d'origine animale et marine apportés par les farines de poisson, de calmar et de crustacés. Les autres protéines sont d'ordre végétal (tourteau de soja, blé),
- des besoins en lipides relativement faibles mais spécifiques en acides gras polyinsaturés à chaîne longue (qui ne peuvent être apportés que par des huiles marines – huile de poisson), en phospholipides et en cholestérol,
- des besoins en vitamines et en certains minéraux (en particulier le phosphore).

Les aliments commerciaux destinés aux élevages de crevettes sont donc composés sommairement d'un mélange de farines animales et végétales, d'huile de poisson et d'un complément en vitamines et en minéraux. La stabilité à l'eau de l'aliment est obtenu par un broyage fin des farines (< 500µm) et l'ajout de liants spécifiques. Les farines une fois mélangées subissent un traitement à la vapeur (> 80 °C) avant d'être agglomérées, le plus souvent par pressage à sec, pour former des granulés cylindriques de 2mm de diamètre servant au nourrissage des crevettes adultes. La granulométrie de l'aliment est importante car elle doit être adaptée à la taille des crevettes afin que celles-ci puissent l'ingérer facilement. Les animaux juvéniles de poids < 0.5 g sont nourris de granulés concassés (0.5 à 1 mm), ceux compris entre 0.5 et 5 g avec des granulés de 2 x 2 mm et au-delà de 5 g avec des granulés de 2x15 mm.

Ces aliments industriels sont formulés à partir de données nutritionnelles issues de recherches réalisées en laboratoire dans des bacs où les conditions sont plus ou moins



contrôlées (Tacon 1996). Ces données font le plus souvent impasse sur l'effet des variations physicochimiques du milieu d'élevage notamment des changements de température en relation avec les saisons (Wyban *et al.* 1995), des pratiques d'alimentation et de l'apport trophique endogène du bassin d'élevage (Tacon *et al.* 2002). La taille et/ou la phase de développement des crevettes, qui influent notablement sur la physiologie de leur nutrition, est de même rarement prise en considération. Malheureusement, en absence de données nutritionnelles tenant compte de l'influence des facteurs biotiques et abiotiques, les aliments commerciaux sont le plus souvent formulés par excès ce qui a une incidence certaine sur leur coût (et sur l'eutrophisation du milieu d'élevage).

#### b Alimentation en bassin

En aquaculture, l'estimation de la ration quotidienne ne consiste pas en un simple calcul mathématique, c'est un exercice difficile qui repose beaucoup sur le savoir faire empirique de l'éleveur. La ration exprimée en aliment sec est un pourcentage de la biomasse des crevettes en élevage. Elle diminue avec la taille des animaux et passe ainsi de 6 % chez les juvéniles de 2 g de poids moyen à 1.8 % chez les sub-adultes de 22 g.

Ainsi les éleveurs ont dressé des tables de rationnement avec le poids moyen des animaux qui est estimé par échantillonnage une fois par semaine, et le pourcentage correspondant à la ration à distribuer. Cependant la bonne utilisation de ces tables repose entièrement sur la précision avec laquelle la taille de la population en élevage est estimée. Or, cette information dépend de la mortalité qui ne peut être connue avec exactitude pendant l'élevage.

Pour déterminer la ration journalière, les fermiers se basent donc sur deux critères supplémentaires :

- la vitesse de croissance, qui lorsqu'elle décroît est une indication d'un rationnement trop sévère. Cependant ce paramètre doit être considéré avec précaution car sensible aux facteurs du milieu d'élevage comme la température, l'oxygène et la pollution du sédiment.

- l'utilisation de mangeoires pour estimer la consommation. Ces mangeoires sont disposées en différents points du bassin à raison de 1 à 2 par hectare. Une mangeoire est constituée d'un simple cadre en PVC ou métallique (70cm de côté) sur lequel est fixé une maille pour retenir le granulé. A l'heure du repas chaque mangeoire reçoit une dose de 150-200 g de granulé. Deux heures après le repas, les mangeoires sont examinées et suivant la



quantité de restes, la taille du repas suivant est réajusté conformément aux formules qui peuvent varier d'un fermier à l'autre.

La distribution de l'aliment est faite 2 à 3 fois par jour dans le but de fractionner la quantité journalière pour améliorer la consommation de l'aliment. En Nouvelle-Calédonie, la répartition est faite de façon la plus uniforme possible sur la surface du bassin grâce à un silo fixé sur un bateau. Une bonne répartition est importante pour éviter l'accumulation de granulés non consommés.

### c Indice de conversion

L'indice de conversion (IC ou FCR) moyen de l'aliment (masse d'aliment utilisé/masse crevettes produites) sur l'ensemble des élevages calédoniens de 2003/4 était de  $2,59 \pm 0,136$  (n = 65). La production de 2214 tonnes de crevettes cette année là avait donc nécessité 5750 tonnes d'aliment pour une valeur globale de 632 500 000 Fcp (5 315 126 €). L'indice de conversion des élevages calédonien est supérieur de 30 % à un IC de 2 généralement reconnu comme étant la norme. Les causes de cet IC élevé peuvent être multiples : environnementales (sédiment réduit, hypoxie nocturne), zootechniques (rationnement et mortalité mal estimés) et nutritionnelles (formule mal adaptée à la phase de développement de l'animal ou à la saison d'élevage, faible apport trophique endogène du bassin). Ces différentes causes peuvent conduire un sur-nourrissage des élevages alors que les croissances sont ralenties et/ou les mortalités importantes comme c'est le cas en hiver lors d'épisodes de Syndrome 93.

Pour pouvoir remédier à cet indice de conversion élevé, il est important de bien connaître en conditions réelles d'élevage le devenir du granulé distribué. C'est dans cet optique que nous avons développé, dans le cadre de cette thèse, un outil permettant d'étudier la nutrition de la crevette *L. stylirostris* en relation avec les fluctuations et les évolutions du milieu au cours des élevages. Dès lors que nous disposerons de données fiables sur la consommation, les besoins nutritionnels et énergétiques de la crevette dans son environnement, il sera possible de formuler des aliments adaptés à chaque phase de développement de l'animal et à chaque saison et de proposer aux fermiers un protocole de nourrissage adéquat. Ce protocole devrait permettre de diminuer significativement l'indice de conversion et le coût associé aux aliments et d'abaisser la production de déchets (matières organiques en suspension, azote et phosphore).



## **I.5 REPRODUCTION EN CAPTIVITE DE *L. STYLIROSTRIS***

La reproduction en captivité de *L. stylirostris* est cruciale au maintien de la production crevetticole en Nouvelle-Calédonie. Endémique aux eaux équatoriennes et mexicaines, la crevette bleue a été importée en 1980. Son élevage commercial dans le pays a été rendu possible par la maîtrise complète de son cycle de développement.

La production de géniteurs se fait en bassins de terre extérieurs de superficie comprise en moyenne entre 2000 et 3000 m<sup>2</sup> et en eau de mer 32-35 ‰.

### **I.5.1 Préparation des bassins**

Après la vidange totale du bassin et la pêche des animaux du précédent élevage, le fond du bassin généralement réduit va rapidement sécher et se minéraliser en surface sous l'action du soleil. Lorsque le fond est suffisamment dur, le sol est labouré sur une profondeur de dix centimètres pour permettre une oxydation des couches plus profondes. Une période d'assez d'au moins trois semaines est recommandée avant de remettre en eau le bassin. La mise en eau des bassins s'effectue une semaine avant l'ensemencement avec une maille de filtration à l'entrée de 700µ et une maille de 1 mm en sortie.

### **I.5.2 Les différentes phases de l'élevage**

L'élevage des géniteurs comprend deux phases :

- ✓ Une phase dite « pré géniteur » qui dure environ 120 jours depuis l'ensemencement.
- ✓ Une phase dite « géniteur » qui débute avec le transfert des « pré géniteurs » dans un autre bassin et permet de produire des animaux de 50 à 60 g en 120 jours et plus.

#### **a Phase pré géniteur**

L'ensemencement des bassins pré géniteurs se fait avec des post-larves de 20 jours, à une densité de 1-4 crevette.m<sup>-2</sup>, nourris avec du granulé émietté. Les bassins ont un renouvellement d'eau journalier de 5-20 %. Durant cette phase, un échantillonnage est réalisé toutes les semaines pour suivre la croissance des individus. Après trois à quatre mois d'élevage, les crevettes atteignent un poids moyen de 25 à 30 g (selon la saison), le bassin est



alors vidangé, les crevettes sont triées et transférées dans un nouveau bassin où commence la « phase géniteur » proprement dite.

#### b Phase géniteur

Lors du transfert vers le nouveau bassin, le sexe ratio recherché est de 2/1 (2 mâles pour une femelle). La densité d'élevage est alors diminuée à 0.5-1 crevette.m<sup>2</sup>. La faible densité en bassin de géniteurs permet de bonnes conditions d'élevage et des croissances rapides. Durant cette phase qui dure entre 3 et 4 mois le renouvellement journalier de l'eau est de 20 %. Les animaux sont nourris pendant 5 jours d'une ration de 5 % de la biomasse estimée avec du granulé « spécial crevette géniteurs » produit par un provendier local (Moulins de Saint-Vincent). En complément une ration de nourriture fraîche sous forme de calmar broyé est distribuée une fois par semaine (précédé d'un jour de jeune).

Un bassin de 3000 m<sup>2</sup> produira entre 1500 et 2000 géniteurs d'un poids moyen de 50 g pour les mâles et de 60 g pour les femelles.

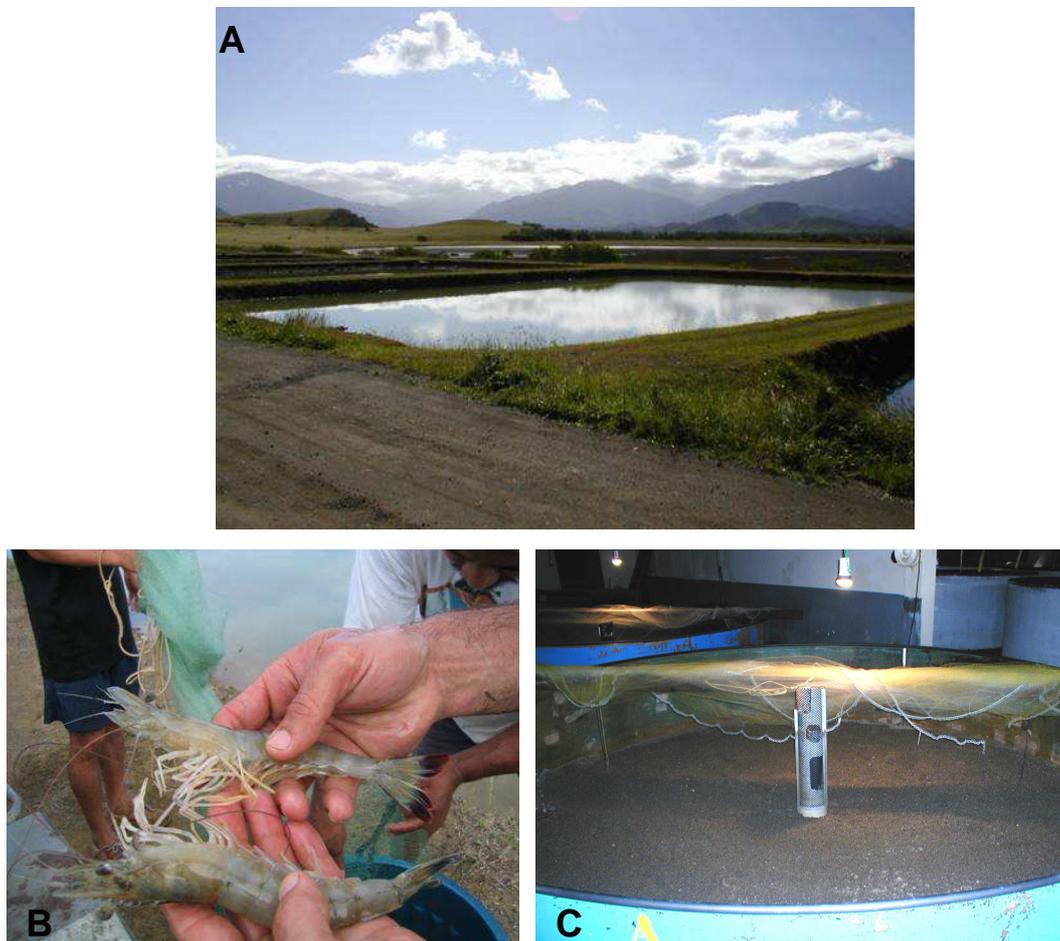
### **I.5.3 Reproduction**

Avant les résultats de nos travaux présentés dans ce mémoire le transfert et l'acclimatation des géniteurs en éclosérie se faisaient dans de l'eau de mer à 35 ‰. On verra dans la suite de ce travail (chapitres 4 et 5) le protocole que nous avons développé afin de minimiser les perturbations physiologiques des crevettes au cours de leur manipulation. Cette méthodologie est maintenant largement appliquée par les écloséries du pays. Les conditions de transfert et d'acclimatation décrites ci après sont celles pratiquées avant l'application du nouveau protocole.

#### a Transfert standard des géniteurs en éclosérie

A l'issue de l'élevage en bassins de terre (Fig. I.7A), les géniteurs aptes à la reproduction sont pêchés, triés (Fig. I.7B) et transférés dans la zone de maturation de l'éclosérie (Fig. I.7C). Deux à trois jours avant la pêche, un échantillonnage est réalisé pour contrôler le stade de mue des animaux. L'observation d'une majorité de géniteurs à carapace molle, en post mue (stade A) ou en pré-mue (stade D) retarde la pêche de quelques jours.

Femelles et mâles sont stockés à raison de 10 à 15 crevettes au m<sup>2</sup> dans des bacs séparés. Les bacs de maturation sont circulaires (femelles 6 m<sup>2</sup>; mâles 4 m<sup>2</sup>) avec un double



**Figure I.7 :** Transfert des géniteurs en éclosérie. Les géniteurs sont pêchés à l'épervier dans le bassin de terre (A), triés par sexe (B), répartis dans des bailles en plastiques pour le transport vers l'éclosérie où ils sont transférés dans les bacs de maturation (C).

fond filtrant constitué du bas vers le haut par : une couche de 10 cm de gravier, un tissu géotextile (bidime®) et une couche de 5 cm de sable.

#### b Stabulation des géniteurs

L'eau de mer (filtrée à 50 µm) est renouvelée de 50% à 100% quotidiennement et aérée par un bullage central provenant du réseau d'air surpressé. Une photopériode artificielle décalée (allumage de 19 h à 9 h) est instaurée dans la zone de maturation pour des commodités d'horaire de travail. En effet, les pontes ayant lieu normalement trois à quatre heures après la tombée de la nuit, la lumière artificielle est maintenue de 21h à 11h (éclairage à 60W) afin de décaler les pontes en début d'après midi. L'insémination artificielle est ainsi effectuée en fin de matinée.

Le mâle est utilisable immédiatement alors que la femelle nécessite un temps d'acclimatation en particulier en hiver. Seule la température de l'eau des bacs de femelles (19-20 °C en hiver) est progressivement élevée 2 jours après le transfert à raison de 1-2 °C par jour jusqu'à atteindre 29-30 °C, température optimale pour la maturation des femelles. Les mâles sont laissés à température ambiante car la chaleur tend à détériorer la qualité du sperme (Pascual *et al.* 1998).

L'alimentation des géniteurs en salle de maturation est composée essentiellement de nourriture fraîche (calmar et moules) avec un complément de granulés riches en protéines, lipides d'origine marine et vitamines. Ici aussi, nous verrons que suite à nos travaux (voir les chapitres 5 et 6), nous avons proposé de modifier la fréquence d'apport des aliments pendant certaines phases critiques.

#### c Maturation, insémination et ponte

La reproduction en captivité des animaux est plus ou moins contrôlée - au niveau de la maturation ovarienne qui est déclenchée par une épédonculation unilatérale de la femelle – et au niveau de l'insémination qui est réalisée artificiellement par l'application manuelle sur le thélycum de la femelle de la boule spermatique extrait du spermatophore du mâle.

##### - *l'épédonculation*

Après une phase d'adaptation de 4 jours, les femelles sont pêchées pour être épédonculées. L'épédonculation des femelles se fait une fois que la température de l'eau des



bacs est stabilisée à 29 – 30°C. Cette opération est réalisée à l'aide d'une ligature appliquée à la base d'un des deux pédoncules oculaires (Fig. I.8) qui entraîne la chute de l'oeil dans les 48 heures.

L'ablation oculaire déclenche une maturation synchrone des femelles. Après cette opération, les femelles sont remises dans leur bac d'origine. Quatre jours après l'épédonculation, les premières maturations sont observées : les femelles prêtes à pondre sont repérées grâce à la coloration brune-orangée de l'ovaire visible par transparence tout le long de l'abdomen (Fig. I.9).

Chez les crustacés, de nombreuses hormones peptidiques sont synthétisées dans l'organe X et stockées dans la glande du sinus avant leur libération dans l'hémolymphe. Parmi celles-ci, les CHHs (Crustacean Hyperglycemic Hormone), les VIHs (Vitellogenesis-Inhibiting Hormone) connues également sous le nom de GIHs (Gonad-Inhibiting Hormone), les MIHs (Molt-Inhibiting Hormone) et les MOIHs (Mandibular Organ-Inhibiting Hormone) sont des peptides d'environ 72 acides aminés possédant 3 ponts disulfures et constituant la famille des CHHs. Certaines de ces hormones sont également impliquées dans le contrôle de l'osmorégulation (Spanings-Pierrot *et al.* 2000; Serrano *et al.* 2003), le contrôle du métabolisme des lipides (Santos *et al.* 1997) et la sécrétion d'enzymes digestives (Keller et Seldmeier 1988).

Les effets de l'épédonculation sur la maturation ovarienne s'expliquent de la façon suivante : le pédoncule oculaire est le lieu de synthèse et de libération de la VIH qui inhibe la synthèse et le transfert de la vitellogénine vers les ovaires. Par conséquent l'épédonculation unilatérale de la femelle provoque une chute de la VIH circulante et une levée partielle d'inhibition de la vitellogénèse.

#### - *Insémination artificielle*

Une à trois heures avant le déclenchement de la ponte l'insémination des femelles se fait manuellement avec du sperme prélevé des spermatophores des mâles. Les spermatophores situés à l'extrémité des spermiductes situés à la base de la cinquième paire de péréiopodes sont expulsés par simple pression manuelle. Les spermatophores sont alors vidés de leur sperme qui se présente sous la forme d'une boule gélatineuse.

Les boules de sperme ainsi collectées sont déposées dans une coupelle d'eau de mer en attendant l'insémination. Elles varient en volume et en texture (un aspect de couleur blanc opaque et une texture collante est signe de bonne qualité). Après extraction des



**Figure I.8 :** Ablation par ligature du pédoncule oculaire d'une femelle de *L. stylirostris*.



**Figure I.9:** Maturation des femelles de *L. stylirostris*. La femelle mature (en haut) est aisément reconnaissable par la coloration brune-orangée de l'ovaire visible par transparence tout le long de l'abdomen. Pour comparaison une femelle non mature est placée en bas.

spermatophores, les mâles sont remis en bac où ils produiront une nouvelle génération de spermatophores après dix à quinze jours.

Les femelles prêtes à pondre sont pêchées dans les bacs. Elles sont inséminées en appliquant le sperme sur le thélycum qui est situé au niveau de l'avant-dernière paire de péréiopodes (Fig. I.10). C'est à la base de ces péréiopodes que se trouvent les gonopores à travers lesquels sont expulsés les ovules qui sont fécondés au contact du sperme. Deux mâles sont généralement utilisés pour l'insémination d'une femelle qui est alors transférée dans un bac de ponte

- *Ponte et récupération des nauplii*

Les femelles inséminées sont déposées individuellement dans les pondoirs où elles sont laissées au calme et à l'obscurité jusqu'à la ponte.

Quelques heures après la ponte, les femelles sont récupérées, marquées (*voir II.2.3*) puis remises dans leur bac d'origine. Le marquage permet d'assurer le suivi du nombre de pontes par femelle et du rang de ponte. Les femelles ayant déjà effectué trois pontes sont éliminées de la production. Le bullage du bac de ponte est alors remis, et la ponte est collectée le lendemain pour être mis dans un système de petits bacs pour la récolte des larves. Ce système est basé sur le phototropisme positif des nauplii qui nagent vers la lumière et qui sont récupérés par une surverse. Les œufs non éclos restent au fond des bacs. Il est ainsi possible de déterminer le taux d'éclosion pour chaque ponte.

Le nombre d'œufs obtenus à chaque ponte dépend du poids de la femelle ; il peut varier de 200 000 à 400 000 pour des femelles de 50 à 70 g. Le taux de fécondation est fonction de la qualité des géniteurs, il est aussi variable d'une ponte à l'autre et se situe aux alentours de 30 à 50 %. Le taux d'éclosion est généralement plus élevé et fluctue entre 80 et 90 %. Chaque ponte donne ainsi naissance à 50 000 à 200 000 nauplii.

#### **I.5.4 Elevage larvaire**

L'eau de mer des élevages est filtrée à 5  $\mu\text{m}$  et traitée à l'EDTA pour neutraliser les éventuels métaux lourds. Les nauplii sont mis en bacs d'élevage larvaire à une densité de 200 larves par litre. L'élevage dure 23 jours, dans une eau aérée et maintenue à 29 °C.

La durée du développement larvaire est fonction de la température et des aliments utilisés. En condition d'écloserie, il faut compter 8 à 10 jours depuis l'éclosion jusqu'à la métamorphose de la larve mysis en post-larve (PL).



**Figure I.10 :** Insémination artificiel par transfert du contenu spermatique d'un mâle sur le thélycum d'une femelle.

L'alimentation est fonction du stade larvaire :

- ✓ Les nauplii s'alimentent sur leur propre vitellus.
- ✓ De Zoé 1 à Zoé 3 s'alimentent d'aliments composés sous la forme de microparticules de tailles comprises entre 50 et 125 $\mu\text{m}$ . Ces aliments sont disponibles dans le commerce sous différentes marques.
- ✓ A partir du stade Zoé3 les animaux commencent à consommer des nauplii d'artémia vivants. On leur distribue également un complément de microparticules de tailles comprises entre 125 et 350 $\mu\text{m}$ .

Un traitement antibiotique est appliqué à partir 3ème jour d'élevage ( $J_3$ ) et le renouvellement de l'eau des bacs débute à  $J_9$ .

Dès que les post-larves ont atteint l'âge de 8 jours (soit à  $J_{17}$ ), la température est progressivement abaissée ( $2\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{jour}^{-1}$ ) afin d'acclimater les animaux aux conditions thermiques extérieures. Dès la température extérieure atteinte, les post-larves alors âgées de 10 à 13 jours selon la saison sont transférées en nurserie (raceways extérieurs). Cette phase a pour objectif d'acclimater progressivement les post-larves aux conditions de bassin d'élevage et éviter un choc trop brutal pouvant entraîner jusqu'à 70 % de mortalité. Elle dure une à deux semaines, les post-larves sont amenées au minimum à P15 en été et P20 en hiver.

## **I.6 PHYSIOLOGIE RESPIRATOIRE**

### **I.6.1 Les gaz respiratoires**

Les gaz respiratoires oxygène ( $\text{O}_2$ ) et dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) représentent respectivement 20.95 % et 0.03 % de l'air que nous respirons. Pour quantifier les gaz présents dans un liquide, on utilise à la fois les concentrations et les pressions partielles. La pression partielle d'un gaz est définie par la loi de Dalton selon laquelle la pression totale d'un mélange de gaz est égale à la somme des pressions partielles que chaque gaz exercerait s'il occupait seul le volume dans lequel le mélange est confiné. Cette notion de pression partielle est très importante car tous les transferts diffusifs des gaz (*voir I.6.2 La fonction respiratoire*) suivent des gradients de pressions partielles et non pas des gradients de concentration.

**Tableau I.1** : Coefficients de solubilité ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ ) de l'oxygène ( $\alpha_{\text{O}_2}$ ) et du  $\text{CO}_2$  ( $\alpha_{\text{CO}_2}$ ) dans l'eau distillée et dans l'eau de mer à différentes températures. (d'après Dejours 1981)

T °C	Eau distillée		Eau de mer 35 ‰	
	$\alpha_{\text{O}_2}$	$\alpha_{\text{CO}_2}$	$\alpha_{\text{O}_2}$	$\alpha_{\text{CO}_2}$
37	10.58	249.8	8.78	218.3
28	11.94	309.6	9.82	266.0
20	13.65	385.6	11.10	327.8
15	15.08	449.2	12.17	379.2
10	16.80	529.6	13.43	444.9
0	21.60	765.2	17.03	637.7

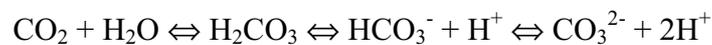
La dissolution de l'oxygène dans l'eau est régie par la loi de Henry, selon laquelle la concentration de chaque gaz dissous est directement proportionnelle à la pression partielle.

$$(1) \text{CO}_2 = \text{PO}_2 \cdot \alpha_{\text{O}_2} \quad \text{avec } \alpha_{\text{O}_2} \text{ le coefficient de solubilité de l'oxygène}$$

- Le coefficient de proportionnalité est le coefficient de solubilité ( $\alpha$ ) du gaz. Le tableau I.1 donne les valeurs des coefficients de solubilité de l'oxygène,  $\alpha_{\text{O}_2}$ , et du dioxyde de carbone,  $\alpha_{\text{CO}_2}$ , dans l'eau distillée et l'eau de mer (35 ‰). Il met en évidence deux points importants:

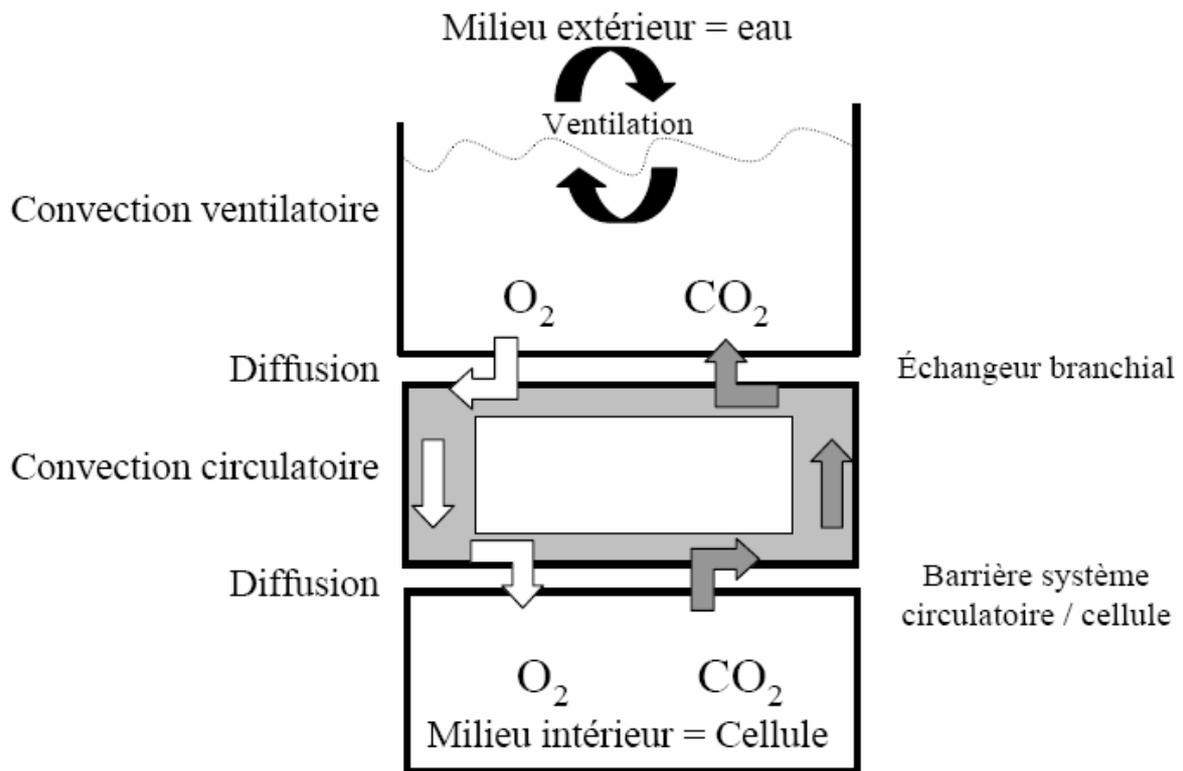
- la solubilité de  $\text{CO}_2$  dans l'eau est beaucoup plus forte que celle d' $\text{O}_2$ , une propriété qui a de nombreuses conséquences physiologiques. Les solubilités de  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  dans l'eau varient en fonction de 2 facteurs: la température et la salinité. Une augmentation de température et de salinité diminue les solubilités de ces 2 gaz.

En ce qui concerne le gaz carbonique, les phénomènes de dissolution sont plus compliqués car, en plus des lois physiques de la dissolution des gaz le  $\text{CO}_2$  réagit avec l'eau en donnant de l'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$  qui à son tour se trouve en équilibre avec des ions bicarbonates et carbonates:



Les équilibres entre les différentes formes du système dépendent de la température et de la salinité, les deux constantes de dissociation de l'acide carbonique étant fonction de ces paramètres (Millero *et al.* 2002).

En milieu naturel, les teneurs en gaz respiratoires peuvent dépendre de deux processus antagonistes: d'une part la respiration qui consomme de l'oxygène et produit du dioxyde de carbone, d'autre part la photosynthèse qui consomme du  $\text{CO}_2$  et produit  $\text{O}_2$ . Le jour, l'action de la photosynthèse dépasse celle de la respiration et une production nette d'oxygène peut apparaître. En revanche la nuit, le phénomène est inversé et les réserves d'oxygène peuvent être fortement altérées. En conséquence, des cycles journaliers de concentration et de pression de  $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$  peuvent exister, en particulier pendant les chaudes journées d'été. Ces phénomènes sont d'autant plus marqués que le milieu est confiné et la biomasse importante (voir l'étude sur les « rockpools » de Truchot et Duhamel-Jouve 1980). Dans les bassins d'élevage "profonds", et lorsqu'il n'y a pas de vent, le phénomène est différent. Le point de départ est généralement lié à une stratification saisonnière entre eaux de surface et de fond. Les eaux de fond sont à certaines périodes de l'année physiquement confinées et ne peuvent



**Figure I.11 :** Principales étapes de la fonction respiratoire chez un organisme aquatique. L'oxygène et le dioxyde de carbone traversent les différents compartiments qui séparent le milieu extérieur (eau) de la cellule en suivant des gradients de pression partielle. (Déjours 1981)

s'équilibrer avec l'oxygène atmosphérique. Leur eutrophisation entraîne une surconsommation d'oxygène qui n'est pas compensée et qui aboutit à des phénomènes d'hypoxie de durée variable selon la gestion du bassin. Pour les animaux aquatiques exploités en aquaculture cela suppose donc des facultés d'adaptation à des conditions d'oxygénation très variables qui sont naturellement dépassées lorsque la quantité d'oxygène disponible devient trop faible.

Pour résumer, en milieu aquatique les gaz respiratoires  $O_2$  et  $CO_2$  se comportent très différemment car leurs constantes de solubilité sont très différentes et ne sont pas affectées de la même façon par les variations de température et de salinité. De plus, les processus biologiques (respiration, photosynthèse) peuvent modifier fortement les concentrations et les pressions partielles de  $O_2$  et  $CO_2$  en fonction de rythmes journaliers et/ou saisonniers. Il existe également des phénomènes de confinement saisonniers. Pour réaliser une étude précise des problèmes liés au transport des gaz respiratoires il faut donc prendre en compte, en plus des traditionnelles concentrations d'oxygène mesurées en aquaculture, les pressions partielles en  $O_2$  et  $CO_2$ , ainsi que les facteurs tels que la température et parfois la salinité.

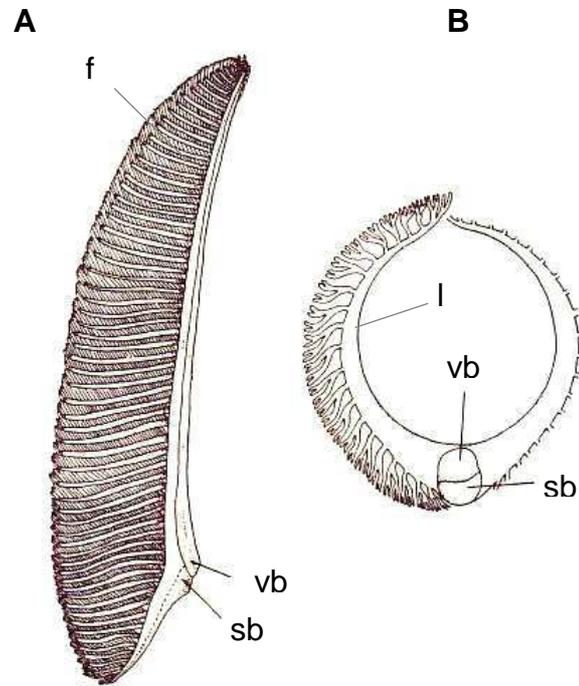
### **I.6.2 La fonction respiratoire**

L'accessibilité permanente à l'oxygène, à des pressions partielles bien définies, est une priorité pour les cellules. Du milieu ambiant jusqu'à la cellule, le flux d'oxygène dépend de gradients successifs de pression (chute de la pression du gaz d'un compartiment à l'autre) et des débits d'eau ventilés. Chez les organismes unicellulaires et les pluricellulaires de petite taille, la respiration peut s'effectuer par simple diffusion alors que chez les animaux de grande taille, elle nécessite un ensemble de structures et de mécanismes complexes. La fonction respiratoire assure le transfert d' $O_2$  et de  $CO_2$  entre le milieu ambiant et la cellule.

Ce transfert peut se résumer selon quatre étapes (Dejours 1981 ; Fig. I.11) :

1- *Une étape de convection ventilatoire* qui renouvelle l'apport en oxygène au niveau de l'épithélium branchial. Chez les crustacés décapodes, cette première étape est assurée par les battements des scaphognathites.

2- *Une étape de diffusion* des gaz à travers l'épithélium branchial vers le système circulant (hémolymph).



**Figure I.12 :** Coupes longitudinale (A) et transversale (B) de branchie de pénéides (d'après Shigueno 1975). l, lamelle ; f, filament ; vb, vaisseau branchiocardiaque ; sb, sinus branchial.

3- *Une étape de convection* circulatoire au cours de laquelle le sang permet d'amener l'oxygène jusqu'aux cellules dans tout l'organisme. L'efficacité de cette étape est liée au débit cardiaque ( $\dot{V}_b$ ) et aux caractéristiques des pigments respiratoires (les gaz étant dissous ou liés à un pigment respiratoire, l'hémocyanine chez les crustacés décapodes)

4- *Une étape diffusive*. C'est la dernière étape qui permet la diffusion de l'oxygène des capillaires sanguins vers les cellules et les mitochondries. Les étapes de diffusion sont guidées non par des gradients de concentrations mais par des gradients de pressions. En effet, en terme diffusif, le paramètre clef est la pression partielle du gaz. Le bilan du flux d'oxygène ayant traversé cette succession d'étapes correspond à la consommation d'oxygène,  $\dot{M}O_2$ , que l'on peut mesurer ou décrire par la mise en équation théorique de chaque étape :

1- étape ventilatoire

$$(2) \dot{M}O_2 = V_w \cdot \alpha_w O_2 \cdot (P_{IO_2} - P_{EO_2})$$

2- première étape de diffusion

$$(3) \dot{M}O_2 = GGO_2 \cdot (PGO_2 - Pao_2)$$

3- étape circulatoire

$$(4) \dot{M}O_2 = \dot{V}_b \cdot \beta_b O_2 \cdot (PaO_2 - PvO_2)$$

4- seconde étape de diffusion

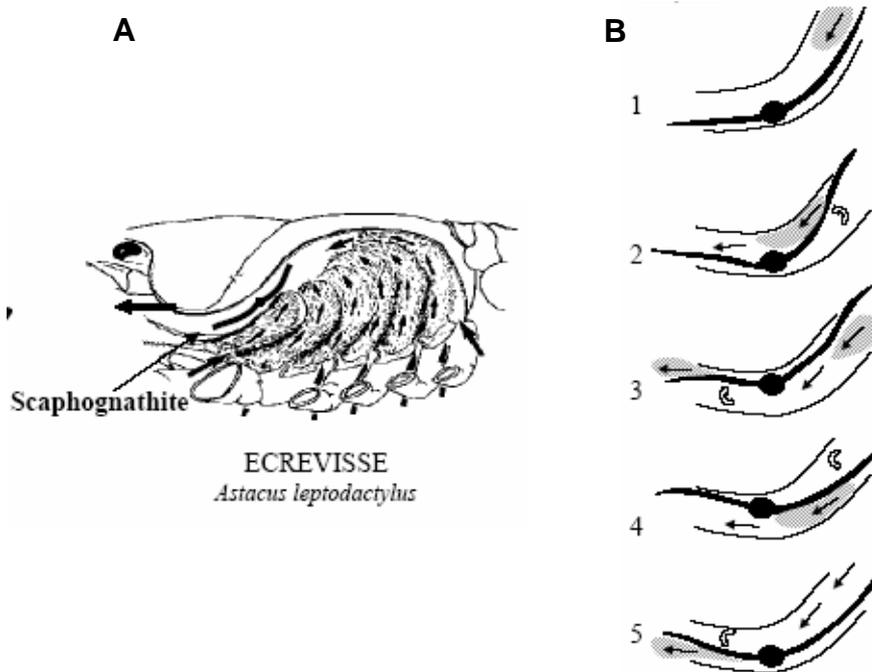
$$(5) \dot{M}O_2 = GtO_2 \cdot (Pc'o_2 - Pto_2)$$

Dans les étapes de diffusion  $GO_2$  est fonction de la nature du tissu considéré :

$$(6) GO_2 = (S \cdot KO_2) / E$$

avec S : la surface de l'échangeur ; E : l'épaisseur de l'échangeur ;  $KO_2$  : la constante de diffusion de Krogh pour l'oxygène définie empiriquement selon la nature du tissu de l'échangeur.

Ces équations montrent que la consommation d'oxygène dépend de paramètres multiples : débit d'eau ventilée (ou débit ventilatoire,  $V_w$ ),  $PO_2$  dans l'eau inspirée ( $PIO_2$ ) et expirée ( $PEO_2$ ),  $PO_2$  à la surface des branchies ( $PGO_2$ ) et autres tissus ( $Pto_2$ ),  $PO_2$  dans le sang artériel ( $PaO_2$ ) et veineux ( $PvO_2$ ), conductance diffusive de la branchie ( $GGO_2$ ), débit cardiaque ( $\dot{V}_b$ ), capacité du sang pour l'oxygène ( $\beta_b O_2$ , rend compte de la solubilité de l' $O_2$  dans le sang et des caractéristiques du pigment respiratoire) et conductance diffusive des tissus ( $GtO_2$ ).



**Figure I.13** : Ventilation de la cavité branchiale de l'écrevisse *Astacus leptodactylus*. **A**-Circulation de l'eau lors de l'étape de la ventilation chez l'écrevisse ; **B** Fonctionnement du scaphognathite : le scaphognathite est en position basse dans le canal de l'hydrostome (1), la partie postérieure s'élève créant ainsi une dépression (2), la masse d'eau isolée est ensuite expulsée vers la sortie du canal quand la partie antérieure s'élève à son tour (3), la postérieure s'abaisse recréant alors une dépression (4) isolant une nouvelle masse d'eau qui sera ensuite chassée à l'extérieur lorsque la partie antérieure s'élèvera à nouveau (5) et ainsi de suite. Les flèches blanches indiquent le mouvement du scaphognathite. Les flèches noires indiquent le sens de circulation de l'eau. D'après Massabuau (1984).

### **I.6.3 Appareils respiratoire et circulatoire**

#### a Le système respiratoire

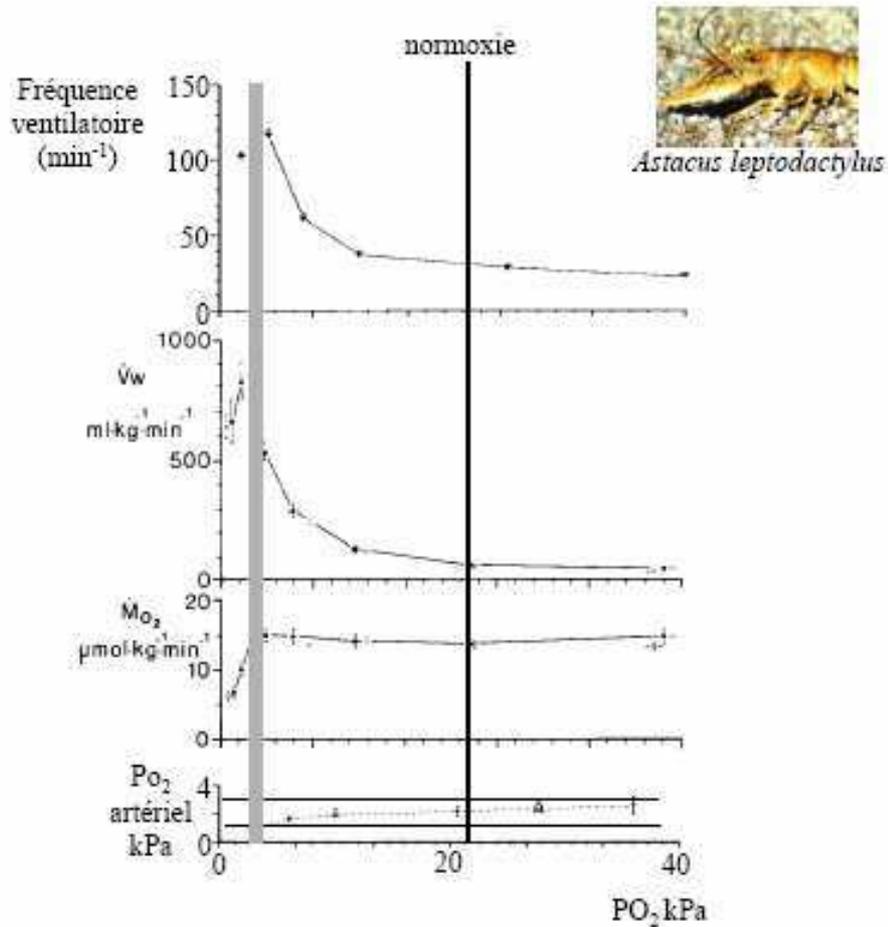
L'appareil respiratoire est bien individualisé, organisé sous forme de branchies. Il est contenu dans deux cavités branchiales qui assurent sa protection et la circulation de l'eau.

Les branchies des crustacés sont des expansions tégumentaires dont les cavités sont remplies d'hémolymphe. Elles sont de 3 types chez les crustacés décapodes: phyllobranchies (forme lamellaire), trichobranche (forme filamenteuse) et dendrobranche (forme arborescente). Les *Penaeidea* en général possèdent des dendrobranchies réparties dans deux chambres branchiales disposées de part et d'autre du céphalothorax. La dendrobranche consiste en un axe portant symétriquement des lamelles branchiales dont la surface décroît de la base vers l'apex de la branchie (Fig. I.12). Chaque lamelle porte à son tour des filaments branchiaux orientés perpendiculairement à son axe et qui présentent au moins deux bifurcations. Chaque branchie est attachée par un court pédoncule de structure tubulaire (le raphé) au segment thoracique. Ce dernier présente sur ses deux faces des pores à mucus. Sur la face ventrale de la branchie se trouvent des soies jouant un rôle dans la circulation de l'eau dans la cavité branchiale. Outre leur rôle respiratoire les branchies interviennent également dans le contrôle de la composition ionique de l'hémolymphe (Grassé 1994).

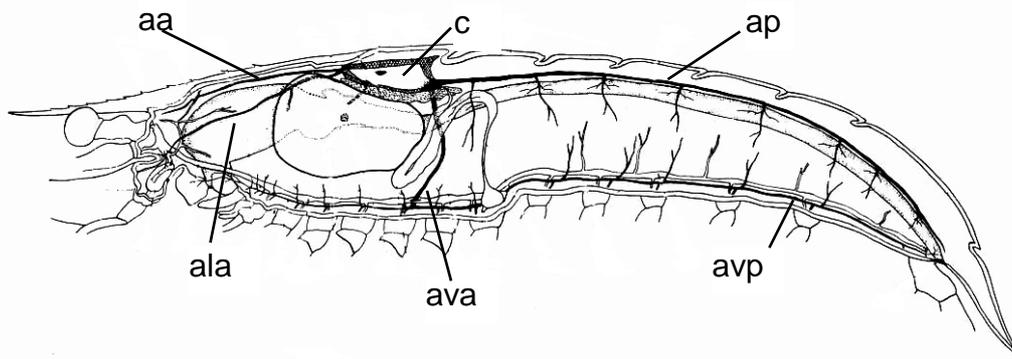
Le rythme ventilatoire est imposé par le battement des scaphognatites. Cet organe peut se voir par transparence à la base du céphalothorax de *Litopenaeus stylirostris*. Ce sont les mouvements du scaphognathite qui imposent le sens de circulation de l'eau : l'eau pénètre à la base de la cavité branchiale, passe le long des branchies et ressort à l'avant de l'animal au niveau du canal de l'hydrostome (exemple de l'écrevisse *Astacus leptodactylus*, Fig. I.13A).

Le fonctionnement des scaphognathites dans les cavités branchiales de *A. leptodactylus* est décrit sur la figure I.13B. Le sens de circulation de l'eau dans la chambre branchiale est essentiellement unidirectionnel et s'effectue d'arrière en avant (mode postéro-antérieur ou mode forward).

Les crustacés sont ainsi capables d'ajuster leur ventilation quand les conditions d'oxygénation de l'eau varient (Fig. I.14) : lors de la diminution de l'oxygène dans l'eau inspirée (hypoxie < 21 kPa), l'augmentation du débit ventilatoire, ou hyperventilation, est obtenue par l'augmentation de la fréquence des battements des scaphognathites.



**Figure I.14:** Capacités d'adaptation ventilatoire chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus* (Massabuau et Burtin, 1984). Il y a hyperventilation quand  $PO_2$  dans l'eau diminue jusqu'à un seuil critique  $< 1 \text{ kPa}$  (bande grise). Grâce à cette adaptation ventilatoire, la consommation d'oxygène ( $\dot{M}O_2$ ) reste constante ainsi que  $PO_2$  dans le sang artériel.



**Figure I.15 :** Appareil circulatoire des pénéides (d'après Shigueno, 1975). aa, aorte antérieure ; ala, artère latérale antérieure ; ava, artère ventrale antérieure ; avp, artère ventrale postérieure, ap, aorte postérieure ; c, cœur.

Le phénomène inverse, hypoventilation, se produit dans le cas d'une hyperoxie ou suroxygénation ( $> 21$  kPa) dans l'eau.

#### b Le système circulatoire

L'appareil circulatoire des crustacés décapodes est de type ouvert et l'hémolymphe, propulsée par le cœur dans des artères puis des capillaires, est finalement collectée dans des sinus veineux après avoir irrigué les tissus (Fig. I.15). Les sinus ramènent finalement le sang aux branchies où il est hématosé avant de retourner dans le péricarde et le ventricule.

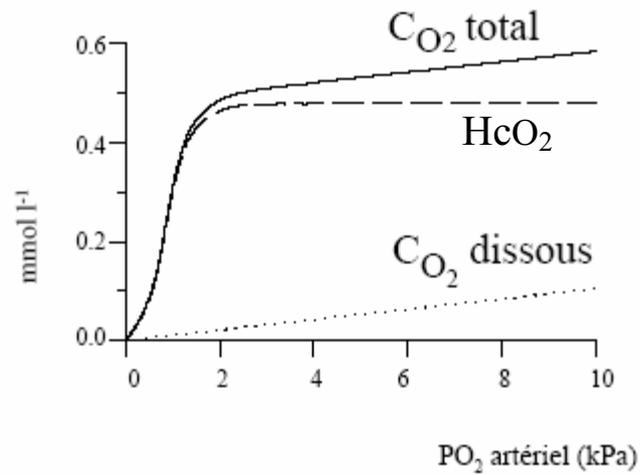
L'hémolymphe de la majorité des décapodes contient un pigment respiratoire, l'hémocyanine, qui augmente grandement la capacité de transport de l'oxygène. Cette cuproprotéine a une structure de base monomérique dont le poids moléculaire est d'environ 75 kDa. Chaque monomère comporte un site actif composé de 2 atomes de cuivre capable de fixer réversiblement une molécule d'O<sub>2</sub>. Cette fixation est décrite par une courbe de dissociation qui représente les variations de la fraction oxygénée du pigment en fonction de la pression partielle d'oxygène dans le sang. La figure I.16 montre l'importance du pigment dans le transport de l'oxygène puisque pour une pression partielle donnée il permet de transporter jusqu'à 20 fois plus d'oxygène que sous la forme dissoute.

De la quantité d'hémocyanine dans le sang et du réglage de son affinité caractérisé par la forme et la position de la courbe de dissociation, dépendent la capacité oxyphorique de l'hémolymphe, c'est à dire la quantité maximale d'oxygène pouvant être fixée par le pigment,  $C_{\text{HcO}_2}^{\text{max}}$ . La quantité d'hémocyanine circulante est liée au cycle d'intermue (Truchot 1978). Les propriétés fonctionnelles de l'hémocyanine ont été étudiées chez de nombreuses espèces (Truchot et Lallier 1992 ; Bridges 2001) ainsi Lallier et Truchot (1989) ont décrit les caractéristiques d'affinité majeurs de l'hémocyanine d'une pénéidé, *Penaeus japonicus*.

De nombreuses études ont montré que l'affinité du pigment respiratoire des décapodes dépendaient de nombreux facteurs: le pH (effet Bohr; Truchot 1971), certains ions inorganiques (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>; Truchot 1975; Mason *et al.* 1983), des cofacteurs organiques (lactate, urate; Truchot 1980, Lallier et Truchot 1989), les facteurs du milieu (température, salinité, Truchot 1973; Taylor *et al.* 1985).

#### **I.6.4 Stratégie des faibles PO<sub>2</sub>**

En physiologie de la respiration, on a démontré depuis plusieurs années qu'il existe chez les animaux aquatiques, marins ou d'eau douce, appartenant aux crustacés, poissons ou

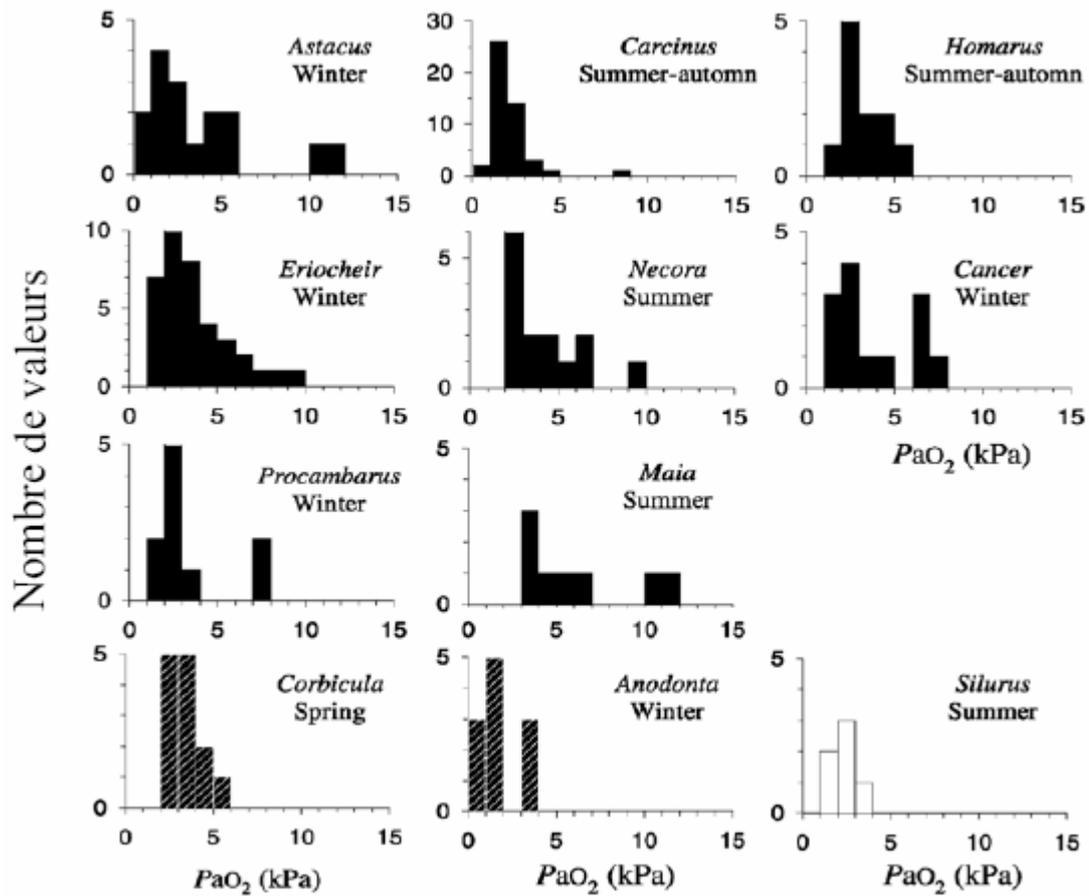


**Figure I.16 : Concentration totale de l'oxygène dans le sang.** CO<sub>2</sub> total est la somme des concentrations d'oxygène dissous (CO<sub>2</sub>dissous) et d'oxygène fixé à la molécule d'hémocyanine (HcO<sub>2</sub>). L'intérêt du pigment peut être facilement illustré à PaO<sub>2</sub> = 2 kPa. Sans pigment seulement 0,02 mmol·l<sup>-1</sup>d'oxygène peut être transporté sous forme dissous. En présence du pigment, la concentration totale d'O<sub>2</sub> dans le sang s'élève à 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> (0,48 mmol·l<sup>-1</sup> fixée à l'hémocyanine et 0,02 mmol·l<sup>-1</sup>dissous). (d'après Truchot 1971).

mollusques, une stratégie adaptative qui consiste à régler spontanément les pressions partielles d'oxygène, dans le sang artériel,  $PaO_2$ , à des valeurs faibles de l'ordre de 1 à 3 kPa (Massabuau et Burtin 1984 ; Forgue *et al.* 1989, 1992 ; Massabuau *et al.* 1991, Tran *et al.* 2000 ; Massabuau 2001, 2003). Par comparaison ces valeurs chez l'homme sont de l'ordre de 10-14 kPa (Dejours 1981) alors que dans une eau équilibrée à l'air elles sont de 21 kPa, soit 7 à 20 fois plus élevées.

Chez l'animal aquatique, ces faibles valeurs de  $PO_2$  artériel sont maintenues constantes dans une large gamme d'oxygénation de l'eau allant de l'hypoxie ( $PO_2 = 3$  kPa,  $[O_2] = 1,5$  mg/l) à l'hyperoxie ( $PO_2 = 40$  kPa,  $[O_2] = 20$  mg/l). Elles correspondent en fait à une valeur contrôle qui joue un rôle clef dans le maintien de la consommation d'oxygène et des différents aspects du métabolisme cellulaire (Vanderkooi *et al.* 1991) contribuant ainsi à l'homéostasie du milieu intérieur, face aux variations des conditions d'oxygénation de l'eau et de sa température par exemple. Dans cette adaptation, comme nous l'avons déjà vu, les ajustements ventilatoires jouent un rôle essentiel. Ainsi lorsque la pression partielle d' $O_2$  diminue dans l'environnement, l'activité ventilatoire augmente, mais au minimum, de manière à juste maintenir dans la ou les cavités branchiales un gradient d'oxygénation suffisant pour assurer un flux entrant d'oxygène constant dans l'animal. A l'opposé, dans un milieu suroxygéné, l'activité ventilatoire diminue de façon à diminuer le taux de renouvellement de l'eau dans les cavités branchiales. Le sang, en repassant plusieurs fois dans les branchies, épuise ainsi l'oxygène dans cette eau peu renouvelée en évitant la suroxygénation du milieu intérieur. Ces adaptations ventilatoires, augmentations ou diminutions, permettent d'apporter une quantité d'oxygène constante à la surface de l'échangeur gazeux, contrôlant ainsi le gradient de pression entre l'eau et le sang. En ce qui concerne les mécanismes de réglage, la ventilation des animaux aquatiques est contrôlée par un mécanisme analogue à celui des vertébrés aériens. En effet, des chémorécepteurs sensibles à l'oxygène ont été mis en évidence chez les poissons (Eclancher 1972) ainsi que chez les crustacés (Massabuau *et al.* 1980 ; Ishii *et al.* 1989). Ce n'est que lorsque l'efficacité de cette étape ventilatoire devient insuffisante que l'on observe une adaptation du système circulatoire sanguin liée aux caractéristiques de transport des pigments respiratoires (augmentation de l'affinité des pigments) mais aussi également un ajustement du débit cardiaque.

Aujourd'hui, chez les animaux aquatiques, ce concept d'homéostasie du milieu intérieur à des faibles pressions partielles d' $O_2$ , indépendant d'une large variation de l'oxygénation de l'eau, est visiblement applicable pour un très grand ensemble d'espèces (Fig. I.17), d'eau douce ou marines quels que soient la saison, la température (entre 8 à 23°C),

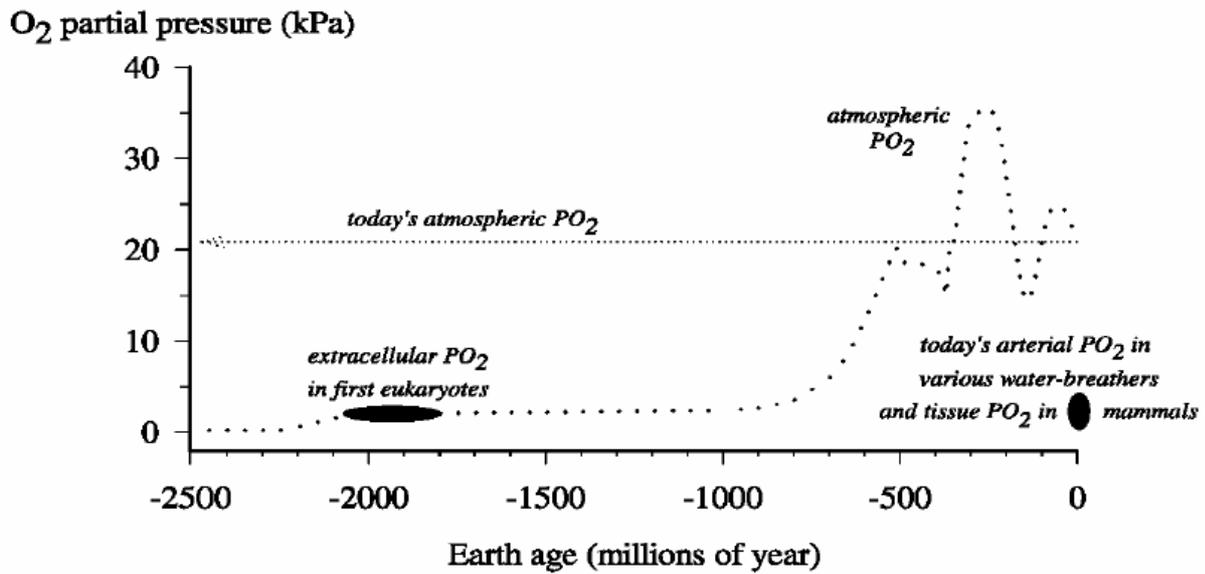


**Figure I.17 :** Distribution des fréquences de pression en oxygène artériel ( $PaO_2$ , kPa) chez différents animaux aquatiques à 21 kPa ( $PCO_{2\text{inspirée}} = 0,1$  kPa ;  $T = 13-15$  °C). Pour toutes les espèces, la distribution des fréquences mesurées est comprise entre 1 et 3 kPa. (Forgue *et al.* 1992).

le type de branchie, de pompe ventilatoire et de système circulatoire (ouvert ou fermé). L'absence ou la présence de pigment respiratoire et son niveau d'affinité n'ont pas non plus d'influence (Forgue *et al.*, 1992). Nous verrons plus loin que nous avons étendu ces observations à 28°C chez *L. stylirostris*.

Chez les animaux aquatiques (animaux à sang froid) qui présentent la stratégie des faibles oxygénations, la pression partielle d'oxygène du sang artériel ( $\approx 1-3$  kPa) est cinq à dix fois plus faible que chez l'homme ( $\approx 10-14$  kPa), mais il est remarquable de voir qu'il existe une analogie entre les valeurs d'oxygénation dans nos cellules et tissus humains. En effet, la pression partielle d'oxygène dans le milieu extracellulaire et les cellules des mammifères est toujours très faible mais surtout demeure dans la même gamme que celle du sang artériel des animaux aquatiques (Fig. I.18).

Le concept de maintien du milieu intérieur à des valeurs faibles et constantes présent chez de nombreux animaux aquatiques ou aériens peut être englobé sous le terme stratégie des faibles oxygénations du milieu intérieur (Massabuau, 2001, 2003). Pourquoi ces faibles valeurs d'oxygène ? Il est sans doute possible de lier ces valeurs avec la toxicité cellulaire de l'oxygène et la production de radicaux libres. Mais la stratégie des faibles oxygénations du milieu intérieur peut être également intégrée dans une perspective évolutive (cette stratégie a pu exister depuis au moins 500-600 millions d'années, i.e. depuis le Cambrien ; Corbari *et al.*, 2004, 2005, Corbari 2004). En effet, les premières cellules se seraient développées dans de faibles conditions d'oxygénation. L'hypothèse est, qu'en parallèle à l'augmentation de l'oxygène sur terre (Fig. I.18), les organismes se seraient complexifiés, développant ainsi des structures spécialisées dans la respiration comme les branchies ou encore de systèmes circulatoires, pour maintenir ces faibles  $PO_2$  originelles. Les faibles valeurs d'oxygénation du milieu intérieur retrouvées dans les animaux actuels tant aquatiques qu'aériens sembleraient donc être une constante héritée du passé, lors de la mise en place des premiers mécanismes cellulaires comprenant le métabolisme aérobie chez les eucaryotes. C'est dans le cadre de ce concept original et global que nous avons abordé l'étude de la physiologie respiratoire de *Litopenaeus stylirostris*.



**Figure I.18:** Relation de l'évolution de l'oxygène et de la vie animale sur Terre. Lorsque les organismes unicellulaires sont apparus, la pression partielle d'O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère était très faible. Aujourd'hui, PO<sub>2</sub> dans le sang des animaux aquatiques et le tissu des mammifères est tout aussi faible (Massabuau 2001).

## **I.7 REGULATION DU MILIEU INTERIEUR**

### **I.7.1 Quelques rappels**

Les échanges entre compartiments renfermant des solutions de concentrations différentes se font suivant 3 mécanismes: diffusion, osmose et transport actif

*La diffusion.* Lorsque les compartiments sont séparés par une membrane perméable aux solvants et aux solutés, les concentrations tendent à s'équilibrer par diffusion. Les molécules de solvant passent du compartiment le moins concentré vers le plus concentré. Le même mécanisme (passif) de diffusion tend à faire passer les molécules ou ions du soluté dans le sens inverse. Il s'agit d'un flux net résultant de l'agitation des particules qui se produit dans les deux sens.

*L'osmose.* Lorsque la membrane séparant les 2 compartiments n'est pas perméable aux solutés (membrane semi-perméable), un mécanisme passif provoque les flux net de solvant du compartiment le moins concentré vers le plus concentré jusqu'à l'égalisation des 2 concentrations. On définit la pression osmotique (PO) comme la pression qu'il faudrait exercer sur le compartiment le moins concentré pour empêcher le passage du solvant vers les compartiment le plus concentré :

$$(7) PO = R \cdot T \cdot (C/M)$$

où R, constante des gaz parfait ; T, la température ; C, la concentration du soluté ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et M, la masse moléculaire du soluté ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

La pression osmotique dépend directement du nombre de particules en solution, ce sont en particulier les ions qui interviennent dans la régulation des pressions osmotiques des liquides biologiques. Dans le milieu marin, la PO est une fonction linéaire de la salinité.

*Le transport actif.* Dans le cas d'un transport actif les ions de la solution la moins concentrée sont transportés vers la solution la plus concentrée, contre un gradient de concentrations. Le mécanisme réclame une dépense énergétique qui peut être apportée par l'Adénosine tri-phosphate.

### **I.7.2 Types de régulation**

L'eau de mer à 34 ‰ a une pression osmotique d'environ  $1000 \text{ mosM}\cdot\text{kg}^{-1}$  dont environ  $440 \text{ mosM}\cdot\text{kg}^{-1}$  proviennent des ions  $\text{Na}^+$  et  $520 \text{ mosM}\cdot\text{kg}^{-1}$  des ions  $\text{Cl}^-$ . Dans



l'hémolymphe des crustacés, les ions chlore et sodium représentent 95 % de la PO et les acides aminés 3-5 %. La pression osmotique du milieu environnant étant susceptible de varier, il est donc nécessaire pour l'animal de réguler la PO de son milieu intérieur.

Cette régulation de la concentration du milieu intérieur ou hémolymphe peut être envisagée sur le plan écophysiological (Charmantier 1979). Ainsi les crustacés marins qui vivent au large dans des eaux dont la salinité est quasi-constante n'ont que très peu de problème de régulation; leur hémolymphe est en générale iso-osmotique au milieu extérieur. Au contraire, d'autres espèces vivent dans des milieux dont la salinité est variable (estuaires, lagunes, étangs côtiers...), ou effectuent des migrations entre des milieux de salinité différentes. Ces espèces disposent en général de divers mécanismes impliquant des modifications de la perméabilité branchiale à l'eau et aux ions, du taux urinaire et du transport ionique actif pour permettre le maintien de l'équilibre hydrominéral d'un animal exposé à des variations de salinité du milieu (Thuet 1979).

Chez les crustacés (système circulatoire ouvert), l'organisme se compose essentiellement de 2 compartiments : le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire constitué essentiellement par l'hémolymphe. Le maintien du volume cellulaire donc de l'équilibre entre la pression osmotique intracellulaire et l'hémolymphe est une nécessité fondamentale pour les organismes.

Il existe deux niveaux de régulation chez les crustacés aquatiques soumis à des variations de salinité de leur environnement : extracellulaire (hémolymphe) et intracellulaire.

#### a Régulation extracellulaire

Lorsque les animaux sont capables de maintenir constante la PO de leur hémolymphe, ce sont des régulateurs. Chez les crustacés il existe 4 modes de régulation extracellulaire :

- La régulation iso-osmotique : l'osmolarité de l'hémolymphe suit les variations de salinité du milieu extérieur. Ce mode de régulation concerne les animaux osmoconformes qui sont le plus souvent des espèces strictement marines et ne subissent donc que peu ou pas de variations de salinité comme les langoustes (*Jasus sp.*), les tourteaux (*Cancer sp.*) et les Oxyrhynques (*Maia sp.*).

- La régulation hyper-isoosmotique : la pression osmotique est maintenue au dessus de celle du milieu à faible salinité et égale en milieu concentré. Les crustacés appartenant à ce



groupe se rencontrent le plus souvent près des côtes et dans les estuaires (*Carcinus maenas*, *Callinectes sapidus*, *Homarus gammarus*...).

- La régulation hyper-hypoosmotique : les animaux hyper-régulent en milieu dilué et hypo-régulent en milieu concentré. Ce mode de régulation est présent chez de nombreuses espèces côtières, estuariennes ou lagunaires. Celles-ci peuvent être sédentaires ou effectuer des migrations entre milieux de salinité différentes (caridés, grapsidés, pénéides). Elles sont considérées comme fortement régulatrices cependant l'intensité de la régulation en milieu très salé est variable selon les espèces.

- La régulation hyperosmotique quelque soit la salinité de l'eau est assez rare et parfois la différence n'est que très légère ce qui fait qualifier ces animaux de régulateurs hyper-osmoconformes. Ce sont surtout des animaux de petites tailles comme les copépodes (*Acartia*) et isopodes (*Paragnathia*).

Dans le cas des pénéides, la régulation osmotique est fonction du stade de développement. Les larves sont hyperosmoconformes et les post-larves deviennent progressivement hyper-hypoosmorégulatrices comme les adultes.

#### b Régulation iso-osmotique intracellulaire

Lorsque la PO de l'hémolymphe évolue avec celle du milieu extérieur (animaux conformeurs), la régulation doit se faire au niveau cellulaire par contrôle de l'osmolarité du liquide intracellulaire. La régulation iso-osmotique intracellulaire maintient la pression osmotique intracellulaire proche de celle de l'hémolymphe par une variation de la concentration des effecteurs osmotiques intracellulaires : acides aminés libres et ions inorganiques (sodium et potassium).

### **I.7.3 Les mécanismes de l'osmorégulation**

Les sites d'échanges d'eau et d'ions sont les branchies, les organes excréteurs et le tube digestif. Les téguments sont très peu perméables sauf pendant les quelques heures suivant la mue. Chez les crustacés, les branchies jouent un rôle fondamental dans la régulation du milieu intérieur, puisqu'elles constituent le site majeur des échanges d'eau et des transferts ioniques entre l'animal et son milieu environnant (Krogh 1939 ; Robertson 1960 ; Péqueux *et al.* 1988).



En milieu hypotonique, l'animal est menacé d'une entrée massive d'eau et par une perte d'ions. L'invasion d'eau peut être compensée au niveau branchial par une diminution de la perméabilité de diffusion et de la perméabilité ionique et donc une augmentation du transport actif des ions (en particulier  $\text{Na}^+$ ). Au niveau des organes excréteurs, l'exposition à un milieu dessalé peut entraîner une augmentation du flux urinaire (avec perte d'ions associés).

Lorsque la PO du milieu extérieur est forte et celle de l'hémolymphe faible, la tendance est une perte hydrique et un entrée d'ions. Les branchies sont alors le siège d'une excrétion active d'ions.

Un contrôle neuroendocrine de l'osmorégulation a d'autre part été mis en évidence à partir de l'étude du rôle des isoformes de l'hormone hyperglycémiant des crustacés (Crustacean Hyperglycemic Hormone, CHH) dans la régulation ionique et l'adaptation à la salinité. Il a en effet été démontré que la CHH contenue dans la glande du sinus située dans les pédoncules oculaires, stimule les processus osmorégulateurs chez un crabe et une écrevisse (Spanings-Pierrot *et al.* 2000 ; Serrano *et al.* 2003).



## **CHAPITRE II**

### **MATERIEL ET METHODES**



**CHAPITRE II**

**MATERIEL ET METHODES**

<b>II.1</b>	<b>La station expérimentale de Saint-Vincent.....</b>	<b>73</b>
<b>II.2</b>	<b>Pêche et stabulation des animaux.....</b>	<b>75</b>
II.2.1	Pêche et transfert.....	75
II.2.2	Bacs expérimentaux et conditions d'éclairage.....	75
a	Bacs expérimentaux.....	77
b	Bacs de maturation.....	77
II.2.3	Marquage des animaux.....	79
II.2.4	Conditions de stabulation.....	79
a	Renouvellement en eau de mer.....	79
b	Alimentation des animaux.....	81
c	Aliment expérimental.....	81
<b>II.3</b>	<b>Analyses.....</b>	<b>81</b>
II.3.1	Détermination du stade de mue.....	83
II.3.2	Prélèvements sanguins.....	83
II.3.3	Oxygénation du sang.....	85
a	Pressions partielles d'oxygène (PO <sub>2</sub> , kPa).....	85
b	Concentrations sanguines en oxygène (CO <sub>2</sub> , μmol L <sup>-1</sup> ).....	85
II.3.4	Osmolarité.....	87
<b>II.4</b>	<b>Consommation d'oxygène.....</b>	<b>87</b>
<b>II.5</b>	<b>Fréquence alimentaire et temps réfractaires entre 2 repas maximisés.....</b>	<b>91</b>
<b>II.6</b>	<b>Experimentations.....</b>	<b>93</b>
II.6.1	Etude de la croissance de <i>L. stylirostris</i> en fonction de la ration.....	93
II.6.2	Etude de l'effet de la pêche sur la physiologie de <i>L. stylirostris</i> .....	99
<b>II.7</b>	<b>Statistiques.....</b>	<b>101</b>



**Figure II.1** : Carte de Nouvelle-Calédonie situant les implantations du Département aquacole de Calédonie (Ifremer), les fermes aquacoles et les écloseries.

## **II.1 LA STATION EXPERIMENTALE DE SAINT-VINCENT**

L'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire a été réalisé dans les laboratoires du département IFREMER de Saint Vincent (DAC St Vincent) en Nouvelle Calédonie. La délégation IFREMER est basée à Nouméa et ses installations expérimentales (DAC/St Vincent, Département Aquacole de Calédonie) sont regroupées (figure II.1 et II.2) à 75 Km au nord de Nouméa, sur la commune de Boulouparis. En service depuis 1970 le DAC/St Vincent a contribué au développement historique de l'élevage de la crevette en Nouvelle-Calédonie, en collaboration avec le Centre Océanologique du Pacifique (IFREMER, Tahiti). Après une première étape de mise au point des techniques d'élevage, puis une étape de transfert au secteur privé, les activités ont récemment été réorientées pour offrir un soutien scientifique à la forte croissance ces dernières années de la filière crevette en Nouvelle-Calédonie. Les effectifs IFREMER ont ainsi été renforcés et les compétences en place permettent maintenant d'aborder des sujets de recherches pluridisciplinaires.

Dans ce cadre le DAC/Saint-Vincent est en cours de réhabilitation et un second laboratoire (DAC/Kone) est en fin de construction à Kone en Province Nord (fin des travaux 2<sup>ème</sup> semestre 2005). Les deux laboratoires travaillent exclusivement sur la crevetticulture selon deux axes complémentaires :

✓ Le DAC/St Vincent se consacre à la recherche-développement défini par le programme DESANS (DEfi SAnité Stylirostris), et s'intéresse aux causes et remèdes à apporter aux mortalités atypiques qui affectent les élevages en saison froide et en saison chaude.

✓ Le laboratoire de Koné (DAC/Koné) est chargé du suivi technique et sanitaire de la filière crevette et du transfert à la profession des résultats issus des recherches réalisées à St Vincent.

Parmi les infrastructures existantes au DAC/St Vincent (certaines destinées à être agrandies ou détruites pour être remplacées) on notera particulièrement :

✓ Un bâtiment de pathologie expérimentale comprenant deux salles chacune équipée de 16 bacs thermorégulés de 250 l et une salle d'aquariums climatisée ; les effluents de ces salles peuvent être traités dans des cuves de récupération avant leur rejet à la mer dans le cadre de leur utilisation en pathologie expérimentale.



Figure II.2 : Vue aérienne de la Station Ifremer de St Vincent (crédit photo, S. Dedecker). Les laboratoires sont localisés en face des deux flèches. La photo du bas a été prise depuis le point 1. Site 2, localisation du laboratoire de terrain utilisé au cours de nos expériences.

- ✓ Un laboratoire semi-humide comprenant une salle de prélèvement et de traitement d'échantillons et une salle d'analyses d'eau et de sédiment.
- ✓ Des laboratoires d'analyse comprenant : un laboratoire-container aménagé pour l'observation microscopique et des travaux de biologie moléculaire de base (PCR et gels d'agarose) ; un laboratoire-container spécialement aménagé et équipé pour les études et expérimentations sur la physiologie respiratoire de la crevette ; et un bâtiment préfabriqué de 70 m<sup>2</sup> totalement équipé comprenant un laboratoire de microbiologie, un laboratoire d'analyses chimiques et biochimiques et les salles techniques annexes.
- ✓ Des installations de zootechnie expérimentale disposant : d'une zone expérimentale extérieure sous ombrage avec 16 bacs de 1500 L et 32 bacs de 500 L ; d'une série de 15 bassins en terre de différentes superficies (500 m<sup>2</sup> à 100000 m<sup>2</sup>) pour l'élevage de géniteurs, les expérimentations et les élevages de soutien aux programmes; et d'une écloserie expérimentale (dont une salle de 32 bacs de 200 L pour l'élevage larvaire de pénéides).

La délégation et le DAC apportent également ses compétences et moyens à différentes initiatives locales pour la diversification aquacole et le développement de coopérations régionales (Australie et îles du Pacifique). L'IFREMER contribue par différents moyens à l'étude de l'environnement littoral et à l'évaluation des ressources minérales potentielles de la ZEE dans le cadre du programme ZONECO.

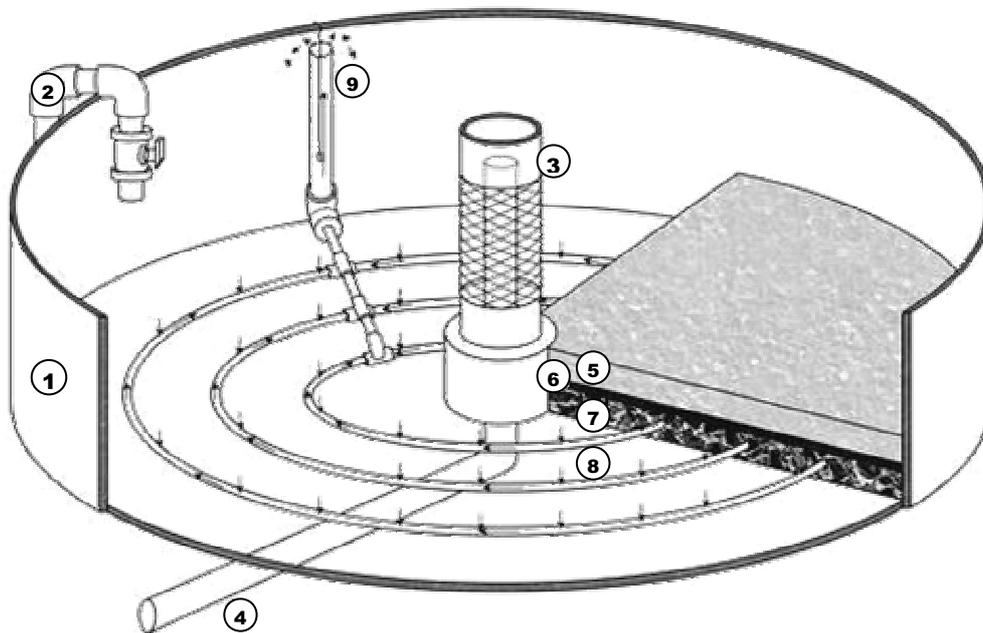
## **II.2 PECHE ET STABULATION DES ANIMAUX**

### **II.2.1 Pêche et transfert**

Les animaux sont capturés dans le bassin à l'aide d'un épervier et transférés au laboratoire dans des bailles en plastique de 50 l. La température de l'eau des bailles est maintenue aux alentours de 20 °C quelle que soit la saison d'élevage. En été ( $T_w = 28-31^{\circ}\text{C}$ ) elle est refroidie au moyen de poches plastiques remplies de glaçons et en hiver ( $T_w = 19-21^{\circ}\text{C}$ ) elle correspond à celle des bassins.

### **II.2.2 Bacs expérimentaux et conditions d'éclairage**

La destination finale des animaux était fonction des objectifs de l'expérimentation. Les animaux étaient mis soit dans des bacs expérimentaux en zone extérieure ou en salle, soit dans



**Figure II.3** : Schéma d'un bac de maturation. 1, paroi en scobalite® ; 2, arrivée d'eau ; 3, surverse fixant la hauteur d'eau ; 4, évacuation ; 5, réseau circulaire de tube PVC récupérant l'eau filtrée ; 6, air-lift ; 7, couche inférieure de gravier ; 8, géotextile (bidim®) ; 9, couche supérieure sableuse (auteur T. Pontiac).

des bacs de maturation de l'écloserie. Les bacs de maturations étaient plus particulièrement destinés aux expérimentations avec les géniteurs ou nécessitant le chauffage et/ou la modification de la salinité de l'eau. Une fois mis dans les bacs, les animaux sont maintenus en stabulation au minimum quatre jours avant les expérimentations. Ce délai permet d'éliminer les animaux clairement affaiblis par la pêche et le transfert.

#### a Bacs expérimentaux

Les bacs expérimentaux extérieurs de la station de Saint-Vincent utilisés au cours de ce travail sont de 2 types : (i) des bacs en béton (dimensions, 15 m<sup>3</sup>) ; (ii) des bacs circulaires en polyester (diamètre, 118.5 cm ; hauteur, 69 cm ; surface au fond, 92 cm<sup>2</sup> ; capacité 536 L). Ces bacs, situés en zones extérieures, sont recouverts d'un toit ou d'une toile d'ombrage et soumis à une photopériode naturelle, l'eau n'y est pas thermorégulée. La détermination du temps réfractaire a été réalisée dans les bacs en fibre de verre (250 L) situés dans les salles climatisées de pathologie expérimentale. Dans ces bacs, l'eau peut être thermorégulée par des échangeurs thermiques.

#### b Bacs de maturation

Les bacs de maturation fabriqués en scobalite® (plaque de fibre de verre de 1 mm d'épaisseur) sont de forme circulaire (Fig. II.3). Deux tailles de bacs sont utilisées : les bacs de 4 mètres de diamètre réservés aux femelles et les bacs de 3 mètres de diamètre réservés aux mâles. Tous les bacs mesurent 1.25 m de haut et ont une profondeur d'eau de 50 cm. Le fond du bac est constitué d'une couche inférieure de gravier séparée par du Bidim® (géotextile) d'une couche supérieure de sable. L'épaisseur totale du substrat est de 8-10 cm. Chaque bac est alimenté en eau de mer par un tube PVC (4 cm de diamètre) équipé d'une vanne. Le centre de chaque bac est doté d'une évacuation sur laquelle est fixé verticalement un tube PVC (9 cm de diamètre) qui fixe la hauteur de l'eau. Le renouvellement de l'eau est continu à raison de 50 % et 100 % par jour pour les femelles et les mâles respectivement. Chaque bac est également équipé d'un système d'air lift connecté à un réseau circulaire de tubes PVC enfoui dans la couche inférieure du sédiment. Avec ce système, l'eau du bac circule de haut vers le bas à travers le fond de sable qui agit ainsi comme un filtre mécanique. Une aération supplémentaire est apportée à chaque bac par deux diffuseurs d'air posés sur le fond alimentés par de l'air surpressé. Le contrôle de la température est assuré par un thermostat (RENA®, modèle DPS2A) reliée à une résistance chauffante en verre (3000 watts) disposée dans chaque bac.



**Figure II.4** : Marquage en position médio-dorsale sur le dernier segment de l'abdomen de *L. stylirostris*.

Dans la salle de maturation, la photopériode (jour/nuit : 14 h/10 h) est décalée dès le premier jour : allumage de spots lumineux au dessus des bacs à 19 h et arrêt à 9 h. En milieu naturel, les pontes ayant lieu la nuit, le décalage de photopériode permet d'observer les pontes en début d'après-midi.

### **II.2.3 Marquage des animaux**

Les animaux suivis pour leur croissance ont été marqués individuellement. Le marquage est réalisé après la pêche et le transfert des animaux en zone expérimentale au moment de leur répartition dans les bacs expérimentaux. Il se fait au niveau de l'abdomen par injection sous-cuticulaire de 5-10  $\mu\text{L}$  d'élastomère coloré (Norwest Marine Technology ; Fig. II.4). Cinq positions distinctes de l'abdomen peuvent être ainsi marquées : 1<sup>er</sup> segment position latérale à droite et à gauche, avant-dernier segment latéral droit et gauche et dernier segment en position medio-dorsale. A ces 5 positions sont associées six couleurs d'élastomère (rouge, vert, jaune, violet, rose et blanc) ce qui permet de reconnaître jusqu'à 30 individus dans un lot en expérimentation. Le grand avantage de cette technique est qu'une fois injecté l'élastomère présente une grande stabilité dans le temps et résiste en particulier aux mues successives des crevettes en élevage (Godin *et al.* 1995). Dans le cadre du programme génétique du DAC, les populations de crevettes marquées au stade juvéniles de poids moyen 1-2 g restent identifiables jusqu'au stade géniteurs (après 8 mois d'élevage).

### **II.2.4 Conditions de stabulation**

#### **a Renouvellement en eau de mer**

Dans les bacs de maturation, dès lors qu'une eau dessalée devait être maintenue, elle n'était pas renouvelée et sa qualité était assurée par une simple filtration mécanique à travers le double fond en sable. Autrement, quelque soit le système de bac considéré, le renouvellement d'eau était effectué en circuit ouvert. L'eau de mer est pompée dans le lagon (bassin de Saint Vincent), stockée dans une réserve située à 8 m en hauteur d'où elle est ensuite distribuée par gravité dans les bacs après passage dans un filtre à sable. Selon les conditions expérimentales, le renouvellement en eau des bacs était compris entre 50 et 200 % par jour. L'eau était oxygénée en continue par injection d'air surpressé. ( $\text{PO}_2 = 20\text{-}21$  kPa,  $\text{PCO}_2 = 0.1$  kPa;  $\text{pH} \approx 7.76 \pm 0.05$ ).

**Tableau II.1** : Composition de l'aliment expérimental fabriqué au laboratoire de Saint-Vincent, Nouvelle-Calédonie.

Ingrédients	%
Farine de poisson basse température <sup>(a)</sup>	30
Farine de soja <sup>(b)</sup>	20
Farine de blé <sup>(c)</sup>	37
Gluten	7
Huile de poisson	2
Huile de soja	2
Lécithine de soja <sup>(d)</sup>	2
Prémix de vitamine pour crevette <sup>(e)</sup>	0.05
Prémix de minéraux pour crevette <sup>(e)</sup>	0.1
Vitamine C (330mg C/kg)	0.04

<sup>(a)</sup> Provenance Chili à base d'anchois et/ou maquereaux

<sup>(b)</sup> Tourteau de grains de soja décortiqué et déhuilé par solvant

<sup>(c)</sup> obtenu par broyage de blé entier pour alimentation animal.

<sup>(d)</sup> Ultralec® ADM lecithin, Decatur, IL, USA.

<sup>(e)</sup> prémix fourni par la société SICA (Goodman Fielder)

### b Alimentation des animaux

Le régime alimentaire appliqué en phase de stabulation dépendait des expérimentations. Pour les expérimentations réalisées avec les crevettes juvéniles et sub-adultes (poids frais = 5 à 20 g), les animaux ont été nourris d'aliment expérimental fabriqué au laboratoire ou commercial (société SICA). La ration journalière déterminée en fonction des restes observés et de la saison variait de 3 à 5 % de la biomasse en élevage et était divisée en 2 repas égaux distribués à 9 et 15 h.

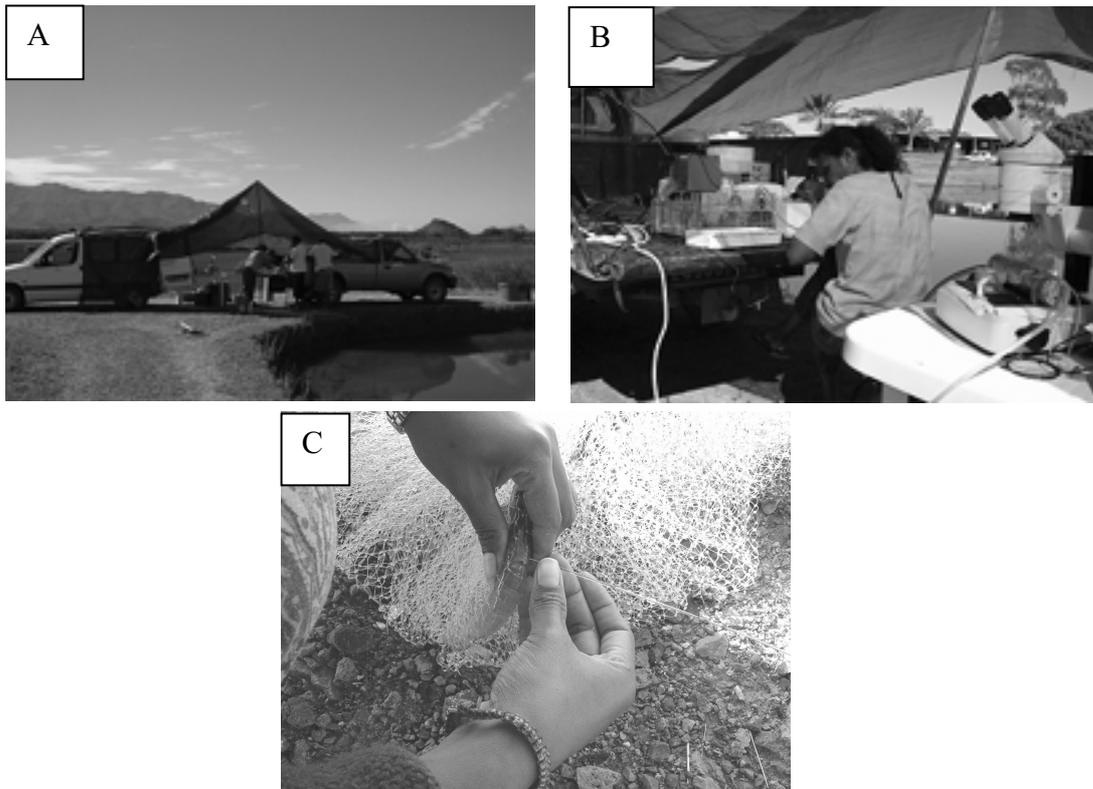
Pour les expérimentations en relation avec la reproduction, les géniteurs étaient nourris à raison de trois rations par jour (8h, 13h et 16h) dès leur entrée en salle de maturation. Le taux de nourrissage quotidien est fonction des restes observés et correspond en moyenne à 3% de la biomasse d'un aliment commercial spécial géniteur et 9 % de la biomasse d'aliments frais (moule, calamar haché).

### c Aliment expérimental.

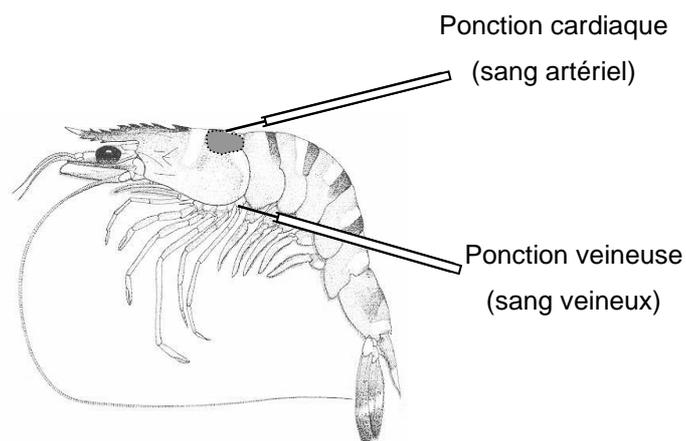
Un aliment expérimental (Tableau II.1) de référence pour le laboratoire est produit dans l'atelier du DAC/St Vincent. Les ingrédients sont broyés à l'aide d'un broyeur de laboratoire (Retsch®) avec une grille de 1 mm. Les farines obtenues sont mélangées à l'huile et l'eau (30 %) dans un mélangeur horizontal (Mainca®) jusqu'à atteindre une consistance permettant le pressage. Le mélange est alors extrudé dans un hachoir à viande à travers une filière de 3 mm. Après séchage dans une étuve ventilée (Venticell® 222) jusqu'à atteindre une humidité résiduelle inférieure à 10 %, l'aliment est cassé afin d'obtenir des granulés de 4-5 mm de long. La quantité fabriquée en une fois est calculée pour couvrir tout le besoin de l'expérience, l'aliment est alors conservé à -20°C au congélateur.

## II.3 ANALYSES

Les analyses ont été réalisées en conditions de laboratoire et/ou en conditions de terrain. Dans ce dernier cas un laboratoire était installé dans deux véhicules au bord du bassin comme l'illustre les figures II.5 A et B. Le sang des pénéidés coagulant souvent en quelques dizaines de secondes, le travail sur le terrain nécessitait la présence d'un minimum de 4-5 personnes : un pêcheur, un aide et deux à trois personnes chargées des analyses. Ainsi, il était possible de déterminer *in-situ* : le poids, le stade de mue, l'osmolarité, la pression partielle d'oxygène et le contenu en oxygène de l'hémolymphe. Tous les appareils le nécessitant étaient



**Figure II.5** : Laboratoire de terrain mis en place sur les bassins du laboratoire de St Vincent. La technique permet la détermination *in-situ* de l'état d'oxygénation sanguin sur des échantillons prélevés en 30-60 sec après le coup d'épervier. **A** : vue générale du laboratoire de campagne. **B** : détails : 1<sup>er</sup> plan, mesure de la pression partielle d'O<sub>2</sub> ; 2<sup>ème</sup> plan, mesure de la concentration totale d'O<sub>2</sub> et mesure de l'osmolarité. **C**; ponction cardiaque in-situ.



**Figure II.6** : Prélèvement artériel et veineux sur la crevette pénéidé *Litopenaeus stylirostris*. L'échantillon veineux est prélevé dans le sinus infra-branchial ventral et le sang artériel est ponctionné directement dans le cœur.

thermostatés à la température de l'eau du bassin. Après prélèvements du sang artériel et veineux, immédiatement à la capture sur l'animal encore dans l'épervier, les analyses étaient effectuées dans les 1 à 3 minutes ; au delà de ce temps le sang des *L. stylirostris* est très systématiquement coagulé.

### **II.3.1 Détermination du stade de mue**

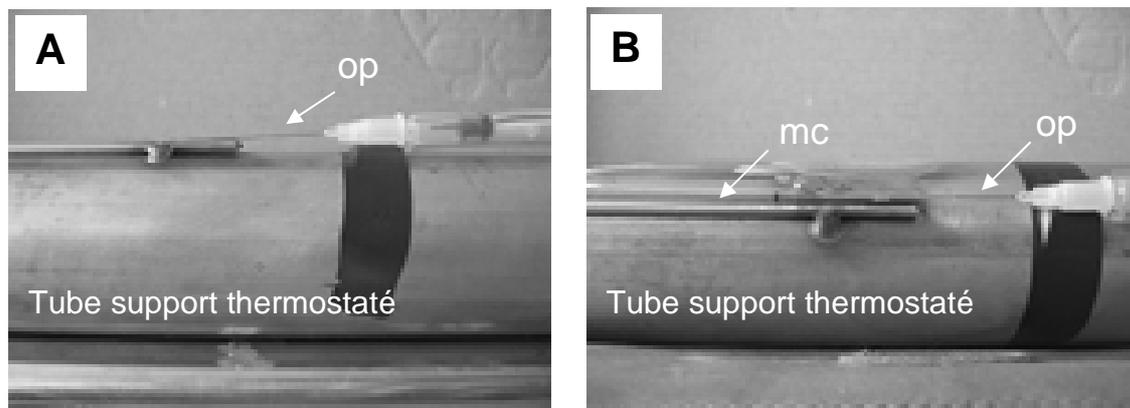
La détermination du stade de mue est basée sur les travaux de Drach et Tchernigovtzeff (1967). Elle consiste en l'observation, sous loupe binoculaire, de la base des soies des écailles antennaires de la crevette. Seules les données des animaux en intermue sont retenues dans l'analyse statistique finale.

### **II.3.2 Prélèvements sanguins.**

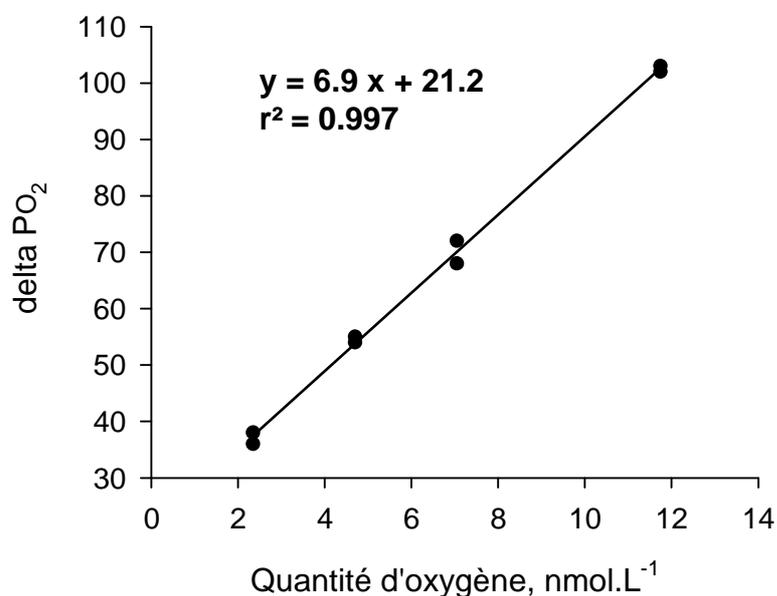
Le prélèvement de sang artériel (100 à 150  $\mu\text{L}$ ) était réalisé à l'aide d'un capillaire en verre équipé d'une aiguille hypodermique qui était introduite dans la cavité cardiaque directement à travers la cuticule (Figs II.5C et II.6). Le sang artériel vient alors spontanément et par à-coups dans le capillaire et l'observation de ces battements permet de vérifier l'origine artérielle du sang ponctionné. La fiabilité de cette technique a été discutée par Forgue *et al.* (1992) et Massabuau et Forgue (1996).

Le sang veineux (100 à 250  $\mu\text{L}$ ) est ponctionné au niveau du sinus infrabranhial (sang prébranchial) à l'aide d'un cathéter en verre équipé d'une aiguille que l'on introduit ventralement en arrière du céphalothorax au niveau de la première paire de pléopodes.

Les animaux dans les bacs d'expériences étaient capturés individuellement à tour de rôle à l'aide d'une épuisette en évitant de perturber et de stresser les autres individus. Les prélèvements étaient effectués sur l'animal dès sa sortie de l'eau : le sang artériel était obtenu dans les 20-30 s suivant l'émersion et le sang veineux dans la première minute. Le prélèvement terminé, le capillaire était bouché et déposé sur la glace pour ralentir le métabolisme et, autant que possible, les phénomènes de coagulation. Le début des analyses était effectué dans la minute qui suivait.



**Figure II.7 :** Système de mesure de la pression partielle d'oxygène de l'hémolymphe contenu dans des micro-capillaires (mc) en verre au moyen d'optodes Presens (op). **A**, vue latérale ; **B**, vue  $\frac{3}{4}$  supérieure.



**Figure II.8 :** Exemple de courbe d'étalonnage réalisée avec une chambre de Tucker pour la mesure de la concentration d'oxygène dans le sang de pénéidés.

### II.3.3 Oxygénation du sang

#### a Pressions partielles d'oxygène ( $PO_2$ , kPa)

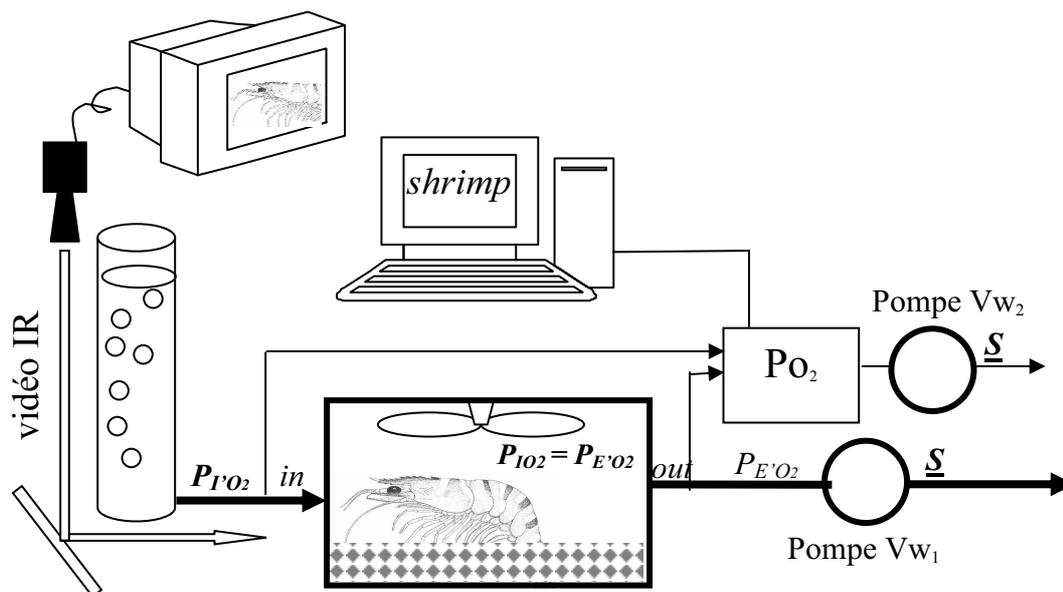
$PO_2$  artériel ( $P_aO_2$ ) et veineux ( $P_vO_2$ ) sont déterminés dans les 3 minutes qui suivent le prélèvement sur 100  $\mu$ L d'échantillon. Deux techniques ont été utilisées. On a travaillé d'une part avec des électrodes polarographiques à oxygène (Radiometer E5046) thermostatées à la température des bacs d'expérimentation et équipées d'un fin capuchon permettant de réduire le volume de mesure. L'électrode était préalablement étalonnée avec (i) une solution  $PO_2 = 0$  kPa obtenue avec un bullage d'azote à saturation et (ii) une solution équilibrée à l'air à  $PO_2 = 20.6-21.3$  kPa selon la pression barométrique mesurée le jour des analyses. Comme Massabuau et Forgue l'ont démontré (1996), cet étalonnage qui renforce la qualité d'analyse dans la gamme des basses  $PO_2$ , n'exclut absolument pas l'obtention de fortes valeurs pour les pressions sanguines.

La deuxième technique était basée sur l'utilisation d'optodes Presens. Le principe est basé sur l'utilisation d'une fibre optique en silicium, de 140  $\mu$ m de diamètre, et dont la pointe en verre est recouverte d'un luminophore (un complexe du Ruthenium) dont les propriétés changent en fonction des conditions d'oxygénation. Le principe des mesures repose sur l'extinction de la luminescence en présence d'oxygène. Dans un milieu contenant de l' $O_2$  le signal diminue, le transfert d'énergie s'effectue par collision, et aucune lumière n'est émise. L'extrémité de la fibre optique est protégée dans une seringue munie d'une aiguille dont le diamètre extérieur est de 400  $\mu$ m. Le dispositif est relié à un ordinateur, et un logiciel spécifique permet le traitement du signal.

Dans le cas de prélèvements réalisés dans des capillaires en verre, les optodes sont insérées à l'intérieur du capillaire alors que celui est maintenu à la température du bassin d'où provient l'animal au moyen d'un dispositif thermostaté fabriqué au LEESA Arcachon (figure II.7). Le résultat de la mesure est obtenu en 10-20 sec.

#### b Concentrations sanguines en oxygène ( $CO_2$ , $\mu$ mol $L^{-1}$ )

Les concentrations artérielle ( $C_aO_2$ ) et veineuse ( $C_vO_2$ ) en oxygène sont déterminées en utilisant une chambre modifiée de Tucker (Tucker 1967) thermostatée à 30°C reliée à une électrode polarographique à oxygène (Radiometer E5046). Pour calibrer l'électrode, nous injectons des volumes variables (10 à 50  $\mu$ L) d'eau distillée équilibrée à l'air qui servent de standards. Pour chaque volume injecté on calcule la quantité d'oxygène, exprimée en nmoles,



**Figure II.9 :** Respiromètre à débit continu : Schéma de principe.

L'eau dans la chambre de mesure ( $V = 850$  ml) est homogénéisée de telle sorte que les caractéristiques physico-chimiques dans l'eau sortant du respiromètre soient les mêmes que dans l'eau inspirée par la crevette.  $P_{I'O_2}$ , pression partielle d'oxygène entrant dans le respiromètre ;  $P_{E'O_2}$ ,  $P_{O_2}$  dans l'eau sortant du respiromètre (correspond à  $P_{I'O_2}$  dans l'eau inspirée par l'animal) ;  $V_{w1}$ , débit de l'eau à travers le respiromètre ;  $V_{w2}$  débit de l'eau à travers l'oxymètre. L'électrode était reliée à un système informatique d'enregistrement en continu de la valeur de  $P_{O_2}$ .

introduite dans la chambre de mesure. Une droite de calibration, ou droite étalon, est ainsi réalisée. Comme le montre la figure II.8, le coefficient de corrélation est généralement supérieur à 0.99. Les échantillons standards et les échantillons d'hémolymphe sont injectés dans la chambre de mesure préalablement remplie de cyanure de potassium ( $6 \text{ g l}^{-1}$ ) dont le rôle est de permettre le relargage de l'oxygène lié à la molécule d'hémocyanine (Bridges 1983). L'électrode à oxygène enregistre la différence de concentration consécutive à l'introduction de l'échantillon.

A la fin de chaque série de mesure, l'ensemble électrode polarographique et chambre de mesure est soigneusement vidé et rincé de façon à éliminer toute trace de cyanure de potassium du système. En effet le cyanure de potassium diffuse au travers des membranes des électrodes et vient dénaturer cette dernière en la rendant difficilement utilisable par la suite.

### **II.3.4 Osmolarité**

L'osmolarité des échantillons a été déterminée au moyen d'un osmomètre Wescor 5520 à tension de vapeur. Elle est basée sur la détermination de l'abaissement de la tension de vapeur d'une solution par rapport à celle du solvant.

L'échantillon de  $10 \mu\text{L}$  déposé sur un filtre en papier (diamètre :  $6.35 \text{ mm}$ ) est placé dans une chambre étanche de l'appareil dont le plafond contient un microthermocouple. La chambre est équilibrée à la température de référence : ambiante +  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le thermocouple est ensuite refroidi pendant quelques secondes par effet Peltier en dessous du point de rosée. Des gouttelettes de condensation se forment et réchauffent la chambre jusqu'à équilibre à température du point de rosée. La différence entre la température de référence et la température d'équilibre est proportionnelle à la tension de vapeur de l'échantillon. L'appareil convertit cette mesure en mosM/kg qui est lue directement.

La capacité osmorégulatrice (CO) correspond à la différence entre la pression osmotique de l'hémolymphe et celle du milieu d'élevage (Charmantier *et al.* 1989).

## **II.4 CONSOMMATION D'OXYGENE.**

Le schéma de principe du dispositif est présenté sur la figure II.9. La consommation d'oxygène,  $\dot{M}\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), était mesurée dans un respiromètre en circuit ouvert de  $850 \text{ mL}$  de volume. La chambre et l'électrode étaient maintenues à la température étudiée ( $28$  ou  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La chambre est alimentée en continue par une eau de mer saturée en oxygène par



**Figure II.10** : Montage de la table anti-vibratoire sur laquelle repose le respiromètre. Des trous ont été percés dans le plancher du laboratoire-containeur pour que l'ensemble du dispositif repose sur le sol sableux et soit isolé des vibrations engendrés par les déplacements de l'expérimentateur dans la laboratoire.

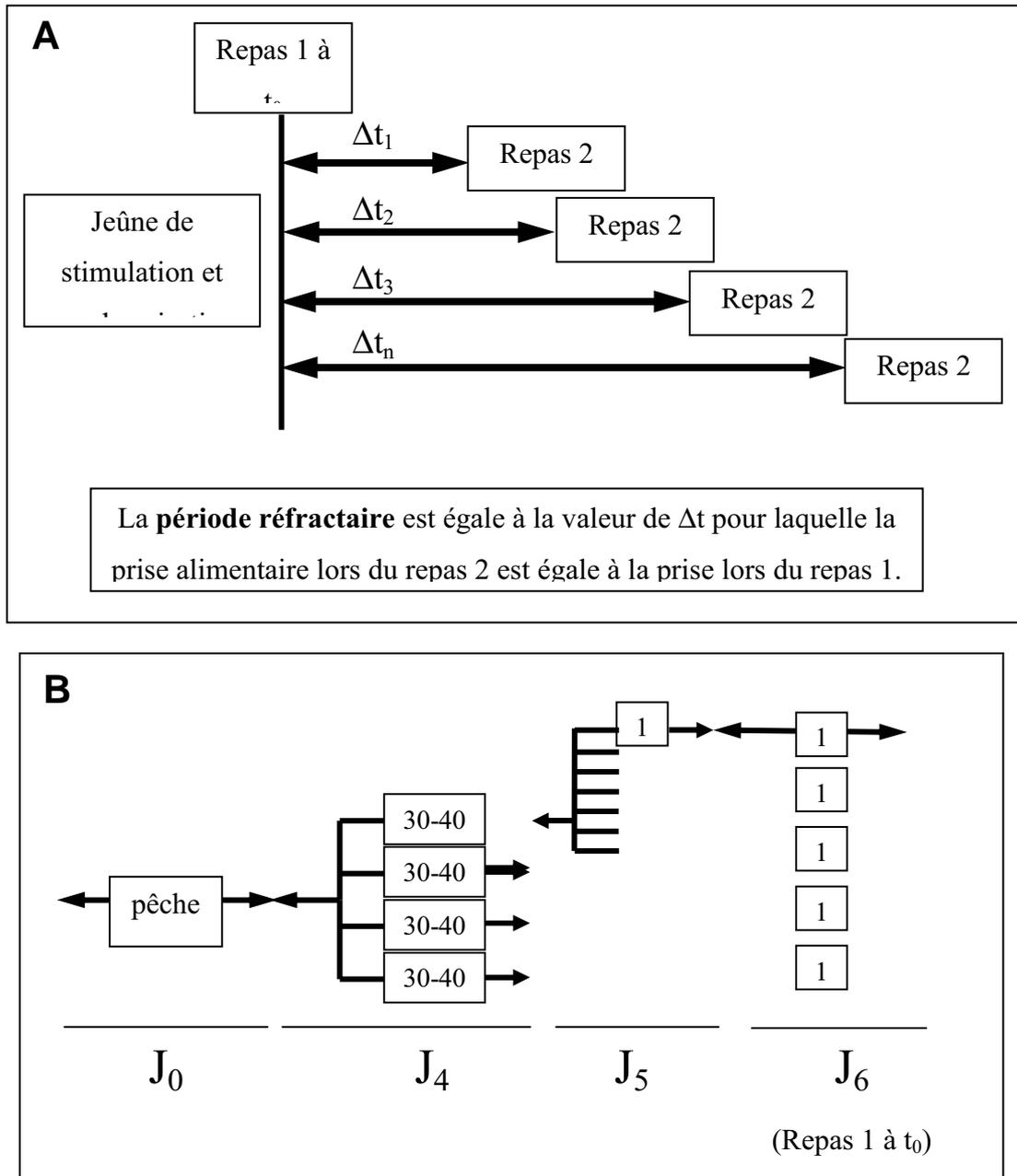
bullage d'air ( $P_{O_2} = 21$  kPa). Un système de vannes commandées à distance permettait de mesurer successivement la valeur de  $P_{O_2}$  de l'eau entrant ou sortant de la chambre du respiromètre et ainsi d'effectuer un étalonnage journalier de l'électrode. Une hélice ( $\varnothing$  55 mm, vitesse de rotation 1 tour. $\text{sec}^{-1}$ ) assurait une homogénéisation au sein du respiromètre de telle sorte que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau sortant de la chambre soient les mêmes que celles de l'eau ventilée par l'animal. En particulier, la valeur de  $P_{O_2}$  de l'eau sortante,  $P_{E_{O_2}}$  est identique à la valeur inspirée par l'animal,  $P_{I_{O_2}}$ . Ces valeurs étaient mesurées en continu par une électrode polarographique à oxygène placée en série entre la chambre et la pompe assurant le renouvellement de l'eau dans la chambre. Cette électrode était reliée à un système informatique permettant l'enregistrement en continu de la valeur de  $P_{O_2}$  par le logiciel SHRIMP (développé par Gaël Guillou et Hervé Chartois du CREMA l'Houmeau). La valeur de  $P_{O_2}$  inspirée était maintenue dans une gamme 15-18 kPa indépendamment des changements de  $\dot{M}_{O_2}$  induit par les conditions expérimentales.

La consommation d'oxygène était calculée en appliquant le principe de Fick à l'état stationnaire :

$$(8) \dot{M}_{O_2} = (V_{W_1} + V_{W_2}) \cdot \alpha_{O_2} \cdot (P_{I_{O_2}} - P_{E_{O_2}})$$

où  $\dot{M}_{O_2}$  est la consommation d' $O_2$  exprimé en  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  ;  $V_{W_1}$ , le débit de renouvellement de l'eau au travers de la chambre à métabolisme ;  $V_{W_2}$ , le débit de pompage de l'eau, prélevée dans la chambre à métabolisme, et destinée à la mesure en continu de la pression partielle d'oxygène dans la chambre, inspirée par l'animal (exprimé en  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) ;  $\alpha_{O_2}$ , la solubilité d'oxygène dans l'eau, exprimée en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$  ;  $P_{I_{O_2}}$ , la pression partielle d'oxygène dans l'eau entrant dans la chambre à métabolisme ;  $P_{E_{O_2}}$ , la pression partielle d'oxygène dans l'eau quittant dans la chambre à métabolisme

Le bac contenant le respiromètre était placé sur une table anti-vibratoire afin de minimiser les stimulations occasionnées par l'expérimentateur (Figure II.10). Pour optimiser le dispositif, quatre trous avaient été percés dans le plancher du laboratoire-container. Le but était que l'ensemble du dispositif repose sur le sol sableux et que les vibrations provoquées par les déplacements dans le conteneur ne soient pas perçues par les animaux en expérience. Pour observer le comportement des animaux sans les perturber par une présence visible directe deux miroirs étaient disposés à 45 °C au niveau des 2 parois latérales opposées au respiromètre en plexiglas. Un cache noir, disposé entre l'animal et l'expérimentateur, isolait



**Figure II.11** : Principe de détermination du temps réfractaire entre 2 repas maximisés.

A, Principe général ; B, Protocole mis en œuvre pour *L. stylirostris*.

l'animal des perturbations visuelles. L'ensemble de ce montage expérimental permet de maintenir les animaux isolés au sein même du laboratoire et ainsi obtenir des enregistrements de  $\dot{M}O_2$  représentatifs.

Pour la détermination du métabolisme post-prandial, un orifice sur le couvercle, fermé à l'aide d'un bouchon en caoutchouc Prolabo, permet l'introduction du granulé expérimental dans la boîte à métabolisme sans interrompre l'enregistrement et sans manipuler l'animal. Après installation dans le respiromètre, le suivi est d'abord réalisé sur une période de 24 h au minimum afin de déterminer le métabolisme de repos pré-prandial. Le granulé expérimental de poids connu est alors introduit et l'analyse est ainsi poursuivie sans interruption jusqu'au retour à la consommation de référence. Le temps  $t_0$  est défini comme étant le moment où l'animal débute sa prise alimentaire. Il était déterminé par observation visuelle, animal par animal.

## **II.5 FREQUENCE ALIMENTAIRE ET TEMPS REFRACTAIRES ENTRE 2 REPAS MAXIMISES**

Afin de mieux caractériser les fréquences de prise alimentaire nous avons imaginé la notion de temps réfractaire entre 2 repas après une période de stimulation par un jeûne modéré. C'est un index que nous avons mis au point pour les crustacés au LEESA à Arcachon à la suite des travaux de Legeay et Massabuau (1999), Clemens *et al.* (1998) et Mente *et al.* (2003), lors de mon stage de DES en 2002. Nous avons défini le temps réfractaire comme étant le temps nécessaire à un animal aquatique, qui vient de terminer un repas complet (le 1<sup>er</sup> suivant une période de jeûne), pour récupérer son appétit maximum.

L'expérience consistait à comparer la quantité de nourriture prise par des animaux au cours de 2 repas séparés par des périodes variables : 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48 et 72 h. Dans le cas de *L. stylirostris*, une période de jeûne de 3 jours précédait systématiquement le premier repas (Fig. II.11A). L'analyse consistait à déterminer, dans ces conditions expérimentales, au bout de quelle période (appelée période réfractaire), l'animal reprend un second repas identique au premier.

Les animaux (poids moyen =  $13.3 \pm 0.2$  g) étaient pêchés à l'épervier et transférés au laboratoire six jours avant le début d'une expérimentation à  $J_0$  (Fig. II.11B). Au laboratoire,



les crevettes étaient mises en stabulation dans un bassin en béton de 15 m<sup>3</sup> pendant un minimum de 3 jours avant le transfert des animaux en salle expérimentale (J<sub>4</sub>), ce délai permet d'éliminer les animaux clairement affaiblis par la pêche et le transfert. Après la phase de stabulation, les crevettes étaient transférées et réparties dans les bacs expérimentaux de 250 L à raison de 30 animaux par bac (350-400g de crevette suivant leur taille). Les bacs étaient alimentés par de l'eau pompée dans la baie de St Vincent et filtrée à l'aide d'un filtre à sable. Un bullage permanent homogénéisait le milieu et le maintenait en normoxie (21kPa). La thermorégulation de l'eau des bacs était assurée par des échangeurs thermiques. Deux lots d'animaux ont ainsi été constitués, l'un maintenu à 20 °C et l'autre à 28 °C.

Après un jour de jeûne (J<sub>5</sub>), 12 crevettes en stade C/D<sub>0</sub> de chaque traitement étaient sélectionnées et transférées dans des bacs compartimentés maintenus à la même température que le bac d'origine, chaque animal étant isolé dans un panier (Ø = 20 cm, H = 50 cm) et chaque bac recevait 6 paniers. Les crevettes étaient maintenues ainsi isolées pour leur troisième jour de jeûne.

Un jour après le transfert en panier, une quantité standard d'aliment (4 à 5 % du poids moyen des crevettes) était distribuée à chaque animal en deux temps, t<sub>0</sub> et t<sub>0</sub>+30 min. Cette partition de la ration permet d'éviter une diminution de la prise alimentaire simplement causée par une perte de l'appétence des granulés suite à une immersion de 30 minutes. L'aliment non consommé était récupéré 1 h 30 après le début de chaque repas, séché 24 h à 65 °C et finalement pesé pour déterminer la quantité ingérée. Le deuxième repas était ensuite distribué de la même façon 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48 et 72 h après le premier repas. L'évolution du rapport quantité ingérée au deuxième repas sur à celle ingérée au premier repas (en %) en fonction du temps espaçant les deux repas permet de déterminer le temps réfractaire.

En fin d'expérience, le stade de mue était vérifié et les poids frais et secs des crevettes déterminés après étuvage pendant 24 h à 85 °C.

## **II.6 EXPERIMENTATIONS**

### **II.6.1 Etude de la croissance de *L. stylirostris* en fonction de la ration.**

Dans la perspective d'une optimisation de la consommation et de l'utilisation de l'aliment en élevage, un réel besoin existe de disposer d'un outil de gestion d'apport de l'aliment pour étudier l'effet des facteurs de l'environnement sur la croissance de la crevette. C'est cet outil de gestion que nous avons cherché à développer dans cette étude, en appliquant



à *L. stylirostris*, la méthodologie mise au point chez les poissons qui étudie la croissance de l'animal à différentes rations (Brett 1979).

Les crevettes provenant du bassin sont réparties dans les bacs expérimentaux (500 L) à raison de 15 ou 30 individus par bac ( $209.0 \pm 4.5 \text{ g.m}^{-2}$ ) selon la classe de taille (juvéniles ou sub-adultes). Au moment de la répartition, chaque crevette a été sexée, pesée et marquée individuellement (cf. I.2.2). En fin d'expérience, soit en moyenne après 3 semaines d'élevage, le poids final des animaux a été déterminé. Des travaux préliminaires (non publiés) réalisés avec des animaux de 5 à 20 g, en saison froide et en saison chaude, avaient montré que 20 jours d'élevage permettait un minimum de 7 % et un maximum de 60 % de gain de poids.

Suivant l'expérience, de trois à cinq rations calculées sur la base d'un aliment sec, ont été étudiées. En plus de ces rations, un lot témoin était constitué d'animaux maintenus à jeun. La ration distribuée ( $R_d$ ) exprimée en pourcentage du poids initial par jour ( $\%BW_{i,j}^{-1}$ ) est définie de la façon suivante :

$$(9) R_d = (FW/BW_i) \times 100$$

où  $FW$  = poids sec de l'aliment (g) ;  $BW_i$  = poids frais initial moyen des crevettes (g).

La ration journalière était distribuée en deux repas identiques à 9 et 15 h. Le suivi de la mortalité permettait de réajuster quotidiennement la quantité.

Le taux journalier d'exuviation (de mues) a pu être suivi uniquement chez les crevettes sub-adultes. Les exuvies, notamment la partie du céphalothorax, étaient alors suffisamment épaisses pour ne pas être totalement consommées par les crevettes.

### ***Définition des rations.***

La relation qui lie la croissance spécifique (SGR, %) de la crevette à la ration ( $R_d$ , %) est représentée par la courbe croissance-ration à partir de laquelle il est possible de déterminer trois rations caractéristiques (Brett 1979): (i) la ration d'entretien ( $R_{dm}$ ) pour laquelle la croissance est nulle; (ii) la ration maximale ( $R_{dmax}$ ) donnant une croissance maximale et (iii) la ration optimale ( $R_{dopt}$ ) correspondant au meilleur rapport de la croissance sur ration distribuée.



**La Ration ingérée,  $RS_e$** , est la fraction de la ration distribuée qui est réellement ingérée par l'animal. Elle est définie de la façon suivante :

$$(10) RS_e = RS_d - (Tm \times L)$$

où  $RS_d$  = poids de la ration distribuée (g) ;  $Tm$  = durée du repas (mn) ;  $L$  = taux de lessivage de l'aliment ( $g.mn^{-1}$ ).

La durée du repas est calculée de la façon suivante :

$$(11) Tm = FR \times RS_d$$

où  $FR$  représente la vitesse de consommation de l'aliment ( $g.mn^{-1}$ ).

La vitesse de consommation ( $FR$ ) et le Leaching ( $L$ ) ont été déterminés à différentes températures dans une étude préalable non publiée. Ces deux paramètres évoluent dans le temps suivant une fonction de type hyperbolique. Au cours de nos études, les vitesses de consommation ont été estimées : (i) en été, à 0.3 et 0.9  $g.min^{-1}$  pour des rations ingérées de 0.5 et 1 % $BW_i$  respectivement et (ii) en hiver, à 0.1 et 0.5  $g.min^{-1}$  pour des rations de 0.2 et 0.7 % $BW_i$ .

Le lessivage du granulé a été estimé à 5 % et 12 % respectivement après 10 et 30 min d'immersion. La température a peu d'influence sur le lessivage de l'aliment pour les durées d'immersion considérées.

**La croissance spécifique,  $SGr$** , est définie comme le ratio de la vitesse de croissance (Growth rate,  $Gr$ ) sur le poids initial de l'animal

$$(12) Gr = (BW_f - BW_i)/d$$

$$(13) SGr = (Gr/BW_i) \times 100$$

où  $BW_f$  = poids frais final de l'animal ;  $BW_i$  = poids frais initial de l'animal ;  $d$  = nombre de jour d'élevage.

**Rétention énergétique et Energie d'entretien.** Le bilan énergétique de la crevette pour une période donnée est décrit par l'équation suivante (Cuzon et Guillaume 1997 ; Sumule *et al.* 2003) :

$$(14) GE_e = F + M + U + Ev + G$$

où :  $GE_e$ , l'énergie brute ingérée ;  $F$ , l'énergie perdue par les fèces ;  $M$ , l'énergie utilisée pour le métabolisme ;  $U$ , l'énergie perdue par l'excrétion ;  $Ev$ , l'énergie utilisée à la mue et  $G$ , l'énergie retenue pour la croissance ou rétention énergétique.

**Tableau II.2** : Composition chimique, énergie brute (GE) et digestible (DE) de l'aliment commercial (SICA Cie) et expérimental (Laboratoire Saint-Vincent).

	Aliment			Commercial		
	n	Mean	Std.Err.	n	Mean	Std.Err.
Protéine <sup>(a)</sup> (%)	5	43.8	0.2	36	43.2	0.2
Matière grasse <sup>(b)</sup> (%)	5	10.0	0.3	25	7.1	0.2
Fibre <sup>(c)</sup> (%)	5	2.0	0.3	35	3.8	0.1
Cendre <sup>(d)</sup> (%)	5	6.9	0.1	36	12.6	0.2
GE <sup>(e)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> )		4502			4172	
DE <sup>(f)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> )		3364			3047	

<sup>(a)</sup> dosage selon norme ISO5983

<sup>(b)</sup> dosage selon norme NF V18-117/B

<sup>(c)</sup> dosage selon norme NF V03-040

<sup>(d)</sup> dosage selon norme NF V18-101

<sup>(e)</sup> correspond à la somme des énergies brutes de chaque ingrédient

<sup>(f)</sup> correspond à la somme des énergies digestibles de chaque ingrédient

M comprend l'énergie du métabolisme de l'animal au repos, du métabolisme postprandial et du métabolisme de l'animal en activité.

L'énergie brute (GE) d'un aliment est calculée sur la base des valeurs de combustion des ingrédients (INRA, 1989 ; Tab. II.2). Une partie de l'aliment ingéré est éliminée dans les fèces, l'énergie assimilée par l'animal correspond à l'énergie digestible,  $DE$  :

$$(15) DE_e = M + U + Ev + G$$

L'énergie digestible (DE) de l'aliment (Tab. II.2) est la somme des énergies digestibles de chaque ingrédient. L'énergie digestible de l'ingrédient est calculée en appliquant le coefficient de digestibilité apparente pour l'énergie (AED) déterminé pour *Penaeus setiferus* (Brunson *et al.* 1997). Pour les huiles nous avons appliqué un coefficient moyen de digestibilité de 80 % issue de la littérature (*P. monodon*, Catacutan 1991 ; Glencross *et al.* 2002 ; *L. vannamei*, Lin *et al.* 2004)

Au cours de nos études, nous déterminons exclusivement :

✓ **L'énergie digestible d'entretien**,  $DE_{em}$ , correspondant à l'énergie digestible de la ration d'entretien ingérée ( $R_{em}$ )

$$(16) DE_{em} = M + U + Ev$$

✓ **La rétention énergétique** qui correspond à l'énergie digestible de la ration ingérée destinée à la croissance (G):

$$(17) SFG_x = G_x = DE_{ex} - DE_{em}$$

où  $DE_{ex}$ , représente l'énergie digestible de l'aliment ingéré.

### **II.6.2 Etude de l'effet de la pêche sur la physiologie de *L. stylirostris*.**

Nous nous sommes attachés dans cette étude à suivre dans le temps les dérèglements physiologiques et les réponses adaptatives de la crevette au stress de manipulation au cours et après sa capture et de son transfert au laboratoire. Ce protocole a été choisi sur la base de travaux réalisés avec *C. maenas* dans le bassin d'Arcachon (Massabuau et Forgue, 1996) et *L. stylirostris* à Tahiti (Lignot, 1995).



**Figure II.12** : Etude du stress de manipulation au cours de la pêche et du transfert des crevettes *L. stylirostris*. Les crevettes sont pêchées dans un bassin d'élevage (A) proche du laboratoire (étoile) à l'aide d'un épervier (B), ramenées sur les berges du bassin (C) puis transférées dans des baidles préalablement remplies d'eau de mer du bassin (D). Elles sont ensuite transportées, en quelques minutes, vers les bassins expérimentaux situés à 150-200 m dans la salle expérimentale (étoile).

L'expérience a consisté à pêcher, en saison hivernale ( $T = 20-22^{\circ}\text{C}$ ) et estivale ( $T = 28^{\circ}\text{C}$ ), des crevettes en bassin d'élevage au moyen d'un épervier (durée de la pêche, 5 min) et à les transporter dans des bailles de 40 l d'eau de mer (température du bassin) jusqu'aux bacs de la zone expérimentale (durée du transfert, 5 min) (Fig. II.12). Les animaux (poids frais moyen,  $38.5 \pm 0,6$  g) ont été ainsi transférés dans un bassin en béton sans thermorégulation et alimenté en circuit ouvert avec de l'eau de mer (35 ‰) puisée dans la baie de St Vincent. L'oxygénation (en normoxie, 21 kPa) et l'homogénéisation étaient assurées par un bullage permanent.

L'état physiologique des animaux a été suivi pendant 2 jours (été) et 7 jours (hiver) après le transfert. La caractérisation de l'état des animaux dans le bassin à  $t_0$  a été réalisée par des mesures faites directement sur les animaux à l'arrivée de l'épervier sur la berge du bassin ce qui est représentatif de l'état physiologique de la crevette dans le bassin d'élevage. La caractérisation de l'état physiologique repose sur le stade de mue de l'animal, la pression osmotique de l'hémolymphe, la concentration et la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel et veineux.

## **II.7 STATISTIQUES.**

Les données sont présentées sous forme de valeurs individuelles dans des histogrammes de fréquence et/ou valeurs moyennes  $\pm 1$  erreur standard (SE). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview® V5 (SAS Institute Inc.). Les survies selon le traitement ont été comparées par le test du  $\chi^2$ . L'effet des facteurs et traitements expérimentaux a été évalué en utilisant l'analyse de variance (ANOVA), le test PLSD de Fisher et le test de Student (simple ou apparié). Avant analyse, les données en pourcentage ont été transformées par les fonctions racine carrée et ArcSin. Une différence significative est admise pour  $p < 0.05$ . Les déterminations graphiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Sigmaplot® V8 (SPSS Inc.).



## **CHAPITRE III**

**CARACTERISATION DU METABOLISME AEROBIE  
ET DES BESOINS NUTRITIFS EN FONCTION DE LA  
TEMPERATURE ET DE LA SAISON.**



### CHAPITRE III

## CARACTERISATION DU METABOLISME AEROBIE ET DES BESOINS NUTRITIFS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE LA SAISON

<b>Introduction</b> .....	<b>105</b>
<b>Mesures de consommation d'oxygène pré- et post-prandial en conditions estivale (Tw = 28 °C) et hivernale (Tw = 20 °C)</b> .....	<b>109</b>
<b>Growth:Ration relationships in the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i>: effect of size and rearing season on maintenance energy and scope-for-growth.</b> Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2006) Aquaculture (Soumis) .....	<b>113</b>
<b>Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de <i>Litopenaeus stylirostris</i>. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction de la saison d'élevage.</b> Liet CHIM, Robert GALOIS, Jean-Louis MARTIN, Pierrette LEMAIRE, Nelly WABETE, Jean-Charles MASSABUAU, Gérard CUZON (2004). In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (Ed. Ifremer), p99-105. Actes Colloq., 38. ....	<b>159</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>173</b>



## INTRODUCTION

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, les crevettes pénéidés ont été sélectionnées pour être cultivées dans des élevages intensifs du fait de leur croissance rapide. En fait, la crevette *Litopenaeus stylirostris*, espèce élevée en Nouvelle Calédonie, fait partie des 3-4 espèces les plus performantes en terme de croissance. Un problème, qui est peut être un corollaire, est qu'à certaines périodes de l'année, ce sont aussi des animaux qui se révèlent excessivement fragiles. Dans les élevages calédoniens, en saison froide se développe un syndrome de mortalité spécifique nommé « Syndrome 93 ». C'est dans le but de mieux caractériser les changements physiologiques qui caractérisent les animaux à cette époque, et pour mieux comprendre les mécanismes qui pourraient faciliter le développement de ces mortalités, que nous avons développé les travaux présentés dans ce chapitre.

En fait, comme nous l'avons vu, peu de choses sont connues dans la littérature en ce qui concerne leur niveau métabolique et leurs besoins nutritifs en conditions réelles d'élevage. Les données de niveau métabolique correspondent principalement à des mesures sur des post-larves et des petits juvéniles à l'exception de celle de Spanopoulos-Hernandez *et al.* (2005).

De la même manière, en ce qui concerne les apports nutritifs, les recherches omettent le plus souvent l'effet des conditions d'élevage et de l'âge de l'animal sur sa consommation et ses besoins nutritionnels et énergétiques.

Pour mieux définir les besoins de l'animal nous avons abordé une étude fondamentale en deux étapes. D'une part nous avons estimé son métabolisme basal et postprandial par la détermination directe de sa consommation d'oxygène à deux températures, 20 et 28°C. D'autre part nous avons évalué indirectement ce besoin métabolique et l'énergie nécessaire pour la croissance par une analyse de la prise alimentaire à différentes rations en hiver (20-22 °C) et en été (28 °C)<sup>1</sup>.

Une autre question abordée est celle de la fréquence des prises alimentaires en fonction de la température d'élevage et de l'importance des lipides (en particulier des acides gras poly-insaturés) dans l'aliment. Pour rappel, nous avons défini dans les Matériels et

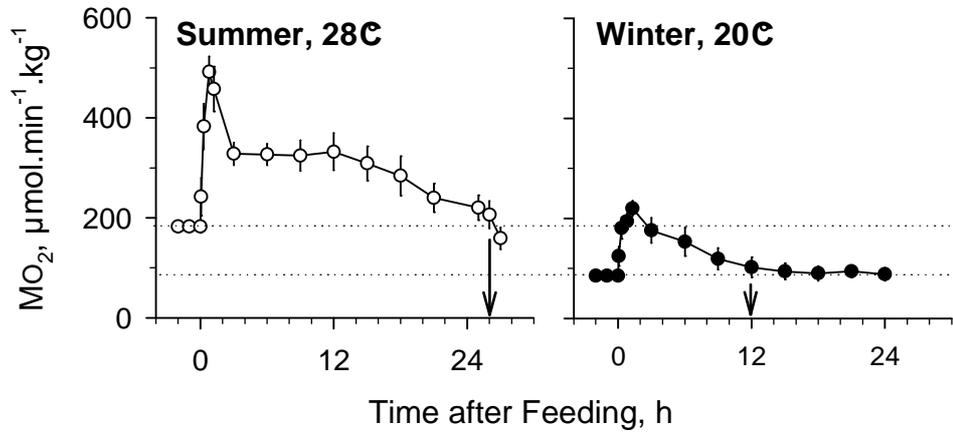
---

<sup>1</sup> Il faut noter que notre angle d'approche n'a pas seulement consisté à travailler à deux températures différentes à un moment donné de l'année, comme c'est souvent le cas dans la littérature. Au contraire, nous avons choisi de travailler en été et en hiver, pour respecter le rythme biologique circannuel des animaux et pouvoir les étudier dans des conditions écologiquement réalistes. Cette précision est fondamentale pour la comparaison avec un certain nombre de travaux publiés dans la littérature spécialisée.



Méthodes, la période réfractaire comme étant le temps minimum nécessaire à un animal qui vient de terminer un repas complet, pour reprendre un second repas identique au premier.

Toutes ces études ont été réalisées chez des animaux de taille comprise entre 8 g et 16 g en bacs expérimentaux c'est à dire dans des conditions simplifiées mais contrôlées.



**Figure III.1** : Evolution de la consommation d'oxygène de *Litopenaeus stylirostris* après prise de nourriture équivalente à 20 et 28°C. Les flèches indiquent le moment où la valeur de consommation d'O<sub>2</sub> post-prandial n'est plus significativement différente de la référence.

	MO <sub>2</sub> pré-prandiale	Pic post-prandiale	Plateau post-prandiale
<b>20°C</b>			
MO <sub>2</sub> (µmol.min <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	85.2 ± 3.1	220 ± 15.5	164.6 ± 18.2
MO <sub>2</sub> (kJ.kg <sup>-1</sup> .24h <sup>-1</sup> )	54.3 ± 2.0	140.4 ± 9.9	105.0 ± 11.6
<b>28°C</b>			
MO <sub>2</sub> (µmol.min <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	182.1 ± 12.1	491.5 ± 15.5	327.9 ± 18.2
MO <sub>2</sub> (kJ.kg <sup>-1</sup> .24h <sup>-1</sup> )	116.1 ± 7.7	313.5 ± 19.9	209.1 ± 8.5

**Tableau III.1** : Principales valeurs de consommation d'oxygène exprimées en µmol.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> et en kJ.kg<sup>-1</sup>.24h<sup>-1</sup> avant et après prise de nourriture.

## Mesures de consommation d'oxygène pré- et post-prandial en conditions estivale ( $T_w = 28\text{ °C}$ ) et hivernale ( $T_w = 20\text{ °C}$ ).

Le but de ces mesures était d'obtenir un premier niveau d'analyse pour comparer les besoins énergétiques des crevettes en été et en hiver. Nous voulions également pouvoir comparer les efficacités d'assimilation pour des quantités équivalentes d'aliment ingéré.

Pour faciliter ces comparaisons, les mesures ont donc été réalisées d'une part chez des animaux d'un poids homogène pesant  $11.1 \pm 1.2\text{ g}$  (animaux d'été,  $10.6 \pm 0.7\text{ g}$ ,  $n = 9$ ; animaux d'hiver,  $11.9 \pm 1.5\text{ g}$ ,  $n = 8$ ; non significativement différent,  $p = 0.38$ ) et d'autre part, en leur donnant des rations comparables. En été et en hiver, nous leur avons donné le même aliment expérimental dont la composition est décrite dans le chapitre 2. Un granulé était donné par animal directement dans la chambre à métabolisme à raison d'un poids de  $0.16 \pm 0.02\text{ g}$  en hiver et  $0.19 \pm 0.02\text{ g}$  en été (non significativement différent,  $p = 0.19$ ).

Il faut tout d'abord noter que le comportement alimentaire des crevettes était totalement différent devant le granulé entre les deux saisons. En été l'animal saisissait immédiatement le granulé pour l'ingérer avec avidité ( $t_0$  pour nos enregistrements). Dès qu'il l'avait senti dans le respiromètre, il se précipitait dessus avant de redevenir calme une fois l'ingestion terminée. Au contraire, en hiver la prise du granulé était beaucoup plus lente. La crevette pouvait même parfois attendre plusieurs heures (maximum 3 h) avant d'ingurgiter l'aliment.

Les résultats des mesures sont présentés sur la figure III.1 et dans le tableau III.1 (avec leur équivalence en joules). Il faut tout d'abord remarquer la différence de niveau métabolique de repos en condition pré-prandiale. A  $20\text{ °C}$  en hiver, la valeur de la consommation d' $O_2$  est de  $85.2 \pm 3.1\text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  alors qu'à  $28\text{ °C}$  en été, elle double pour atteindre  $182 \pm 12.1\text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  (significativement différent,  $p < 0.001$ ). L'évolution du métabolisme après la prise alimentaire est également particulièrement différent. A  $28\text{ °C}$ , on observe un pic métabolique (premier pic d'extra chaleur, ou SDA pour Specific Dynamic Action) atteignant pratiquement  $500\text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$  alors qu'en hiver la stimulation du métabolisme, pour la même quantité d'aliment ingéré, dépasse à peine  $200\text{ }\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kg}$ . Finalement, tout aussi frappant est la durée de l'ensemble du pic d'extra chaleur puisqu'à  $28\text{ °C}$  il se prolonge pendant 26 h alors qu'à  $20\text{ °C}$ , la consommation d'oxygène retrouve sa valeur de référence après 12 h. Il faut noter également qu'à  $28\text{ °C}$ , on retrouve le plateau qui



avait été décrit dans le cas d'une prise alimentaire chez le crabe vert *Carcinus maenas* à 15 °C (Mente *et al.* 2003).

Cette première série de mesure montre donc la différence d'efficacité du même aliment, donné en même quantité, d'une part aux alentours de l'optimum thermique de l'espèce et d'autre part à sa limite basse. Cette différence peut être clairement qualifiée d'extrême.

Pour compléter cette analyse nous avons ensuite étudié les rapports croissance – ration également en conditions expérimentales simplifiées mais contrôlées.



**Growth:Ration relationships in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: effect of size and rearing season on maintenance energy and scope-for-growth.**

By

Nelly WABETE<sup>(1)(2)</sup>, Liet CHIM<sup>(1)</sup>, Pierrette LEMAIRE<sup>(1)</sup>, Jean-Charles MASSABUAU<sup>(2)</sup>.

(2006) Aquaculture, *Soumis*

<sup>(1)</sup> IFREMER, Département d'Aquaculture de Nouvelle-Calédonie, B.P. 2059, 98846 Nouméa Cedex. Nouvelle Calédonie.

<sup>(2)</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, UMR 5805. Université Bordeaux I and CNRS, Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France.

*Running title:* Growth-ration relationship in shrimps

Key words : shrimp, ration, feed, growth, scope-for-growth, temperature.



### ***Abstract***

The effect of ration on individual growth in *Litopenaeus stylirostris* was studied for different animal sizes and in different rearing seasons. The growth and rations relation and its derivative the relationship between Gross growth efficiency (K) and rations are described by the Growth-Ration (GR) and K-Ration (KR) curves respectively. Based on these curves, the maintenance, optimum and maximum rations as well as the maximum value of K (Kmax) were determined graphically. From these rations were deduced the digestible energy requirement for maintenance ( $DE_{em}$ ) and for optimum growth or “scope-for-growth” ( $G_{opt}$ ) giving the equation:  $DE_{eopt} = DE_{em} + G_{opt}$ , where  $DE_{ex}$  is dietary digestible energy intake at the optimum ration.

$DE_{em}$  accounts for between 23 and 34% and  $G_{opt}$  between 38 and 52% of dietary gross energy (GE) intake. This energy distribution depends on the life stage of the animals and the rearing season.

Digestible Energy channelled to growth is  $173 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  in sub-adult shrimps ( $BW = 16.93 \pm 0.36 \text{g}$ ) and  $234 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  in juveniles shrimp ( $BW = 7.95 \pm 0.44 \text{g}$ ). Meanwhile specific growth rate ( $\text{SGR}, \% \text{ initial body weight} \cdot \text{day}^{-1}$ ) is 2 times lower in sub-adult animals. Digestible energy requirement per unit weight gain (g) is  $23 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1}$  for sub-adults and  $14.9 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1}$  for juveniles. This lower energy yield for the sub-adult shrimp led to a smaller Kmax ( $20.3 \pm 0.8\%$ ) compared with juveniles ( $43.5 \pm 3.1\%$ ).  $DE_{em}$  does not appear to be affected by the size of the shrimp.

Rearing season has a considerable effect on shrimp growth and appetite. In summer ( $27.2 \pm 0.62^\circ\text{C}$ ), growth and food intake increase by 57% and 50% respectively compared with winter ( $22.19 \pm 0.13^\circ\text{C}$ ). Similarly, scope for growth is 61% higher in the warm season ( $199.6 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) than in winter ( $122 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Maximum gross growth efficiency is not much affected by season ( $K_{max} \approx 26\%$ ) mainly due to a parallel evolution in growth rate and food intake.  $DE_{em}$ , on the other hand, is 2.5 times higher in summer ( $133.5 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) than in winter ( $53.5 \text{kJ} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

The growth-ration relationship applied to shrimp individually tagged *L. stylirostris* appears to be very suitable for shrimp nutrition studies under practical rearing conditions. This methodological tool is particularly accurate since the metabolic requirements estimated indirectly from food intake and growth in this study is similar to its estimation from oxygen consumption.

**Table 1:** Ingredient composition of shrimp feed produced in IFREMER/Saint-Vincent laboratory.

<b>Ingredients</b>	<b>%</b>
LT fish meal <sup>(a)</sup>	30
Soybean meal <sup>(b)</sup>	20
Wheat meal <sup>(c)</sup>	37
Wheat gluten	7
Fish oil	2
Soy oil	2
Soy lecithin <sup>(d)</sup>	2
Shrimp vitamin premix <sup>(e)</sup>	0.05
Shrimp trace mineral premix <sup>(f)</sup>	0.1
Stay C (330mg C/kg)	0.04

<sup>(a)</sup>Chilean low temperature fishmeal from anchovy or Jack mackerel

<sup>(b)</sup>Dehulled soybean meal solvent extracted

<sup>(c)</sup>Whole wheat grain for animal feed

<sup>(d)</sup>Ultralec® lecithin from ADM lecithin, Decatur, IL, USA.

<sup>(e)</sup>Vitamin Premix from SICA Cie (Goodman Fielder)

<sup>(f)</sup>Mineral premix from SICA Cie (Goodman Fielder)

## 1. Introduction

According to Rosenberry (2004), shrimp aquaculture production totalled 2 millions metric tons (mt) in 2004 and equalled the total world shrimp fishery landings. Shrimp farming requires a considerable input of fertilisers and feed. In 1993, Chamberlain estimated that 75 to 80% of shrimps were fed with dry feed with a feed conversion ratio of between 1.7 and 1.8. If we apply these figures to current world production, the volume of dry feed consumed would be between 2.5 and 3 mt.

Despite this economic importance, little or no information exists concerning shrimp dietary nutrient requirements under practical earthen-ponds farming conditions. Indeed, virtually all published information on crustaceans' nutrition derives from fairly well controlled, indoor, laboratory conditions (Tacon, 1996). More often these data ignore the action of environmental factors, such as seasonal temperature variations (Wyban et al., 1995), feeding practices and the nutrients supplied by pond endogenously produced natural food organisms (Tacon, 2002). For instance, in New Caledonia, shrimps were fed the same commercial feed, which has been developed under laboratory conditions at 26 and 28°C, indiscriminately in summer (28°C) and in winter (20°C). No account was taken of the changes in feeding behaviour and nutritional requirements of the animal according to season (Chim et al., 2004).

Finally, studies rarely take into account the life stage of the shrimps which can considerably influence their nutrition (Lee et al., 1984; Nunez and Parsons, 2000; Kureshy and Davis, 2002; Gamboa-Delgado et al., 2003).

By using food that is not properly adapted to the rearing conditions and/or to the animals's life stage, may prevent shrimp maximum growth and increase waste production in the pond. Indeed, the food is the main source of waste matter either directly in the form of leached pellets, faeces and excretion or indirectly through eutrophication of the pond water (Funge-Smith and Briggs, 1998; Tacon and Forster, 2003).

Therefore, there is a real need for a suitable methodological tool to study the action of environmental factors on shrimp nutrition and growth in order to optimise food consumption and efficiency under practical rearing conditions. It is such a tool that we have sought to develop in this study. We applied to *L. stylirostris* a methodology perfected on fish which examines the effect of ration size on growth (Brett, 1979). The accuracy of the method for shrimp was assessed by comparing juvenile and sub-adult animals, males and females and two rearing seasons.

**Table 2:** Experimental design of the two trials: total number of tanks, shrimps and corresponding biomass ( $(\text{number of shrimps} \times \text{mean weight}) / \text{tanks area (m}^2)$ ) for each ration studied.

TRIAL1							
Sub-adults				Juveniles			
$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Number of tanks	Total shrimp number	Shrimps Biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ )	$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Number of tanks	Total shrimp number	Shrimps Biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ )
0.00	2	30	221	-	-	-	-
0.45	3	45	227	0.45	1	30	200
0.90	3	45	228	0.90	1	30	169
1.80	3	45	225	1.80	1	30	225
3.60	3	45	219	3.60	1	30	190
7.20	3	45	225	7.20	1	30	227

TRIAL2							
Summer				Winter			
$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Number of tanks	Total shrimp number	Shrimps Biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ )	$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Number of tanks	Total shrimp number	Shrimps Biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ )
0.00	2	30	227	0.00	1	15	194
1.00	2	30	218	1.40	4	60	175
2.00	2	30	221	2.80	3	45	177
4.00	2	30	213	5.60	3	45	183
8.00	2	30	216	-	-	-	-

(a) Ration distributed as % of initial body weight (feed on a dry weight basis)

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental system

All the experiments presented here were carried out in a system comprising 32 circular polyester tanks (diameter, 118.5 cm; height, 69 cm; surface area at the bottom, 92 cm<sup>2</sup>; capacity 536 l) supplied continuously with seawater from the lagoon. The seawater was stored in a reservoir built on high ground at 8 m and distributed by gravity, after passing through a sand filter, into the tanks. The water renewal rate in the tanks was 400% per day. Aeration was delivered by high pressure air. The temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset)

### 2.2. Feeds tested

Two feeds were used in this study

- A commercial feed supplied by SICA Cie (Goodman Fielder);
- A feed processed in the laboratory (Tab.1): The ingredients were ground up in a laboratory grinder (Retsch®) with a 1 mm screen. The meal obtained was mixed with oil and water (30%) in a horizontal mixer (Mainca®) until the consistency was such that it could be pelleted. Next, the mixture was extruded in a meat grinder through a 3 mm die. It was then dried in a drying oven (Venticell® 222) until the residual humidity was less than 10%, and then broken up into pellets of 4-5 mm in length.

### 2.3. Shrimps

The shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) used in our experiments were reared semi-intensively (without aeration) in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) at the Saint-Vincent station (IFREMER) in New Caledonia. The ponds were stocked with 20-day post-larvae (P20), 20 animals per m<sup>2</sup>. It takes 3 to 4 weeks for them to grow to 1 g, after which the shrimps gain about 1 to 1.4 g per week. The experiments in this study were carried out on juveniles ( $BW \leq 10g$ ) and sub-adults ( $BW > 10g$ ).

### 2.4. Experimental protocols

The animals were caught from the ponds using a cast net and transferred to the tanks in plastic containers (50 l) filled with seawater. The shrimps were then divided into the tanks

**Table 3 :** Chemical composition, gross (GE) and digestible (DE) energies of commercial (SICA Cie) and experimental (IFREMER:Saint-Vincent Laboratory) feeds.

	Experimental diet			Commercial diet		
	n	Mean	Std.Err.	n	Mean	Std.Err.
Protein <sup>(a)</sup> (%)	5	43.8	0.2	36	43.2	0.2
Fat <sup>(b)</sup> (%)	5	10.0	0.3	25	7.1	0.2
Fiber <sup>(c)</sup> (%)	5	2.0	0.3	35	3.8	0.1
Ash <sup>(d)</sup> (%)	5	6.9	0.1	36	12.6	0.2
GE <sup>(e)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> )		4502			4172	
DE <sup>(f)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> )		3364			3047	

<sup>(a)</sup> ISO5983 standard

<sup>(b)</sup> NF V18-117/B standard

<sup>(c)</sup> NF V03-040 standard

<sup>(d)</sup> NF V18-101 standard

<sup>(e)</sup> Gross Energy, sum of individual ingredient energy content

<sup>(f)</sup> Digestible Energy, sum of individual ingredient digestible energy.

with 15 or 30 individuals per tank ( $209.0 \pm 4.5 \text{ g.m}^{-2}$ ), depending on size category (juvenile or sub-adult). At this time, each shrimp was sexed, weighed and individually tagged. Tagging was done on the abdomen by sub-cuticle injection of a coloured elastomer (Norwest Marine Technology). At the end of the experiment, after 3 weeks on average, the animals' final weight was determined. Preliminary studies (unpublished) carried out on animals of 5 to 20 g, in the cold season and the warm season, showed that 3 weeks rearing gave a minimum weight gain of 7% and a maximum of 60%.

#### 2.4.1. *Effect of size on Growth-Ration relationship (Trial 1).*

This experiment was carried out simultaneously with sub-adults ( $n = 255$ ) and juveniles ( $n = 150$ ) with mean weights of  $16.9 \pm 0.4 \text{ g}$  and  $7.9 \pm 0.4 \text{ g}$  respectively. The shrimps were fed on commercial feed produced by the company SICA. Five rations, calculated on the dry feed basis were studied: 0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2% of shrimp's biomass. The ration that was distributed ( $R_d$ ) expressed as  $\%BW_i.d^{-1}$  is defined as follows:

$$(1) R_d = (FW/BW_i) \times 100$$

where  $FW$  = feed dry weight (g);  $BW_i$  = average initial shrimps fresh weight (g).

The daily ration was divided into 2 equal meals distributed at 9.00am and 3.00pm. Mortality was monitored and ration adjusted accordingly on a daily basis. Thirty sub-adults shrimps were unfed throughout the entire experiment (21 days).

The daily exuviation rate could be monitored only on the sub-adult shrimps. At this stage the shell, in particular part of the cephalothorax, was sufficiently thick to avoid being eaten entirely by the shrimps.

The number of tanks used, the total number of animals in the experiment and the average biomass per surface unit ( $\text{m}^2$ ) for the two categories of animal on each ration are presented in table 2.

#### 2.4.2. *Effect of rearing season on Growth-Ration relationship (Trial 2).*

Two experiments were carried out: (i) the first in summer from 8 to 30 March 2004 with an average weight shrimp of  $14.6 \pm 0.3 \text{ g}$  ( $n = 150$ ); (ii) the second in winter from 18 May to 15 June 2004 with animals of  $11.9 \pm 0.3 \text{ g}$  ( $n = 165$ ). The shrimps were fed on the laboratory-processed feed (Tab. 1). Four rations (1, 2, 4 and 8% of the biomass) were studied in summer and 3 in winter (1.4, 2.8 and 5.6%). Thirty animals were starved throughout each experiment in summer (22 days), and fifteen in winter (28 d). As described above, the daily ration,



adjusted according to mortality, was divided into two meals, given at 9.00am and 3.00pm. Table 2 shows the number of tanks used, the number of animals in the experiment and the average biomass per surface unit ( $m^2$ ) for each season, and for each ration.

## 2.5. Analyses and Calculations

### 2.5.1 Rations.

In this study, three specific rations were defined (Brett, 1979): (i) maintenance ration ( $R_{dm}$ ) where shrimp's growth is nil; (ii) maximum ration ( $R_{dmax}$ ) giving maximal growth, and (iii) optimum ration ( $R_{dopt}$ ) which represents the best conversion of feed *i.e.* the best ratio of weight gain to distributed ration.

**Ingested Ration**,  $RS_e$ , is the fraction of distributed ration which is actually ingested by the animal. This is defined as follows:

$$(2) RS_e = RS_d - (Tm \times L)$$

where  $RS_d$  = ration size distributed (g);  $Tm$  = Meal duration (mn);  $L$  = leaching rate of the diet ( $g.mn^{-1}$ ).

Meal duration is calculated as follows:

$$(3) Tm = FR \times RS_d$$

where  $FR$  (Feeding rate) represents the speed at which feed is consumed ( $g.mn^{-1}$ ) and  $RS_d$  the size of the ration distributed (g).

Feeding rate ( $FR$ ) and leaching ( $L$ ) were determined at different temperatures in an earlier unpublished study. These two parameters evolved over time following a hyperbolic function. Feeding rates were estimated: (i) in summer, at 0.3 and 0.9  $g.min^{-1}$  for ingested rations of 0.5 and 1% $BW_i$  respectively and (ii) in winter, at 0.1 and 0.5  $g.min^{-1}$  for rations of 0.2 and 0.7% $BW_i$ .

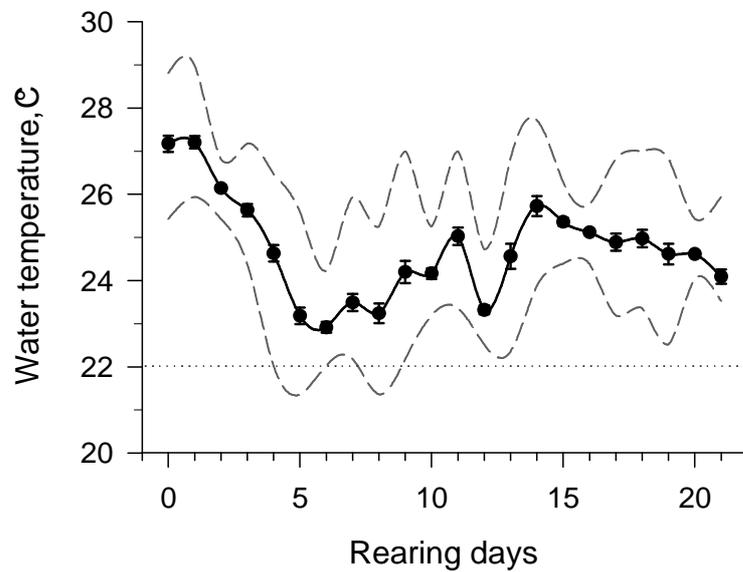
Leaching was estimated at 5% and 12% respectively 10 and 30 min after feed immersion. Temperature had little influence on leaching rate for the immersion durations considered here.

### 2.5.2. Specific growth (SGr)

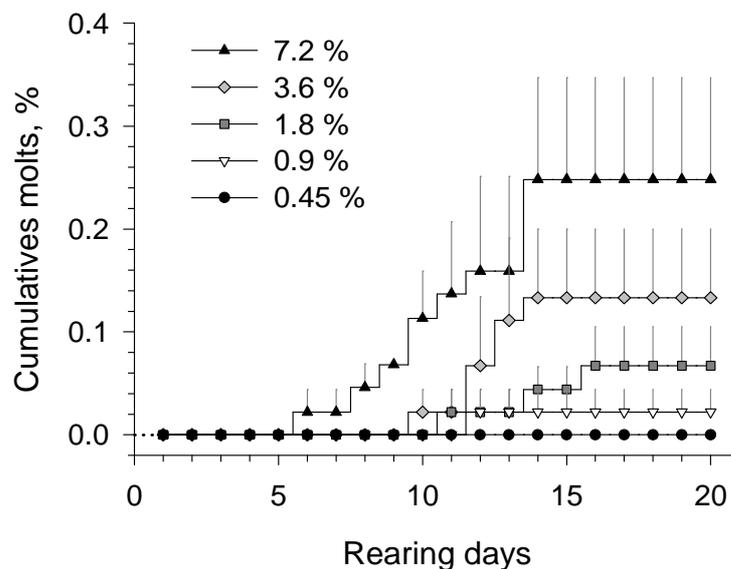
$SGr$  is defined as the ratio of Growth rate ( $Gr$ ) to the animal's initial weight

$$(4) Gr = (BW_f - BW_i) / d$$

$$(5) SGr = (Gr / BW_i) \times 100$$



**Figure 1:** Temperature change (mean  $\pm$  1 SE) in the outdoor experimental tank during rearing period of experiment on shrimp size (Trial 1). Closed symbols are daily mean values ( $\pm$  1 SE); dashed lines represent minimum and maximum daily temperatures.



**Figure 2:** Cumulative molts of sub-adult shrimps (means  $\pm$  1 SE) monitored for each rations as a function of rearing days.

where  $BW_f$  = shrimp final fresh weight;  $BW_i$  = shrimp initial fresh weight;  $d$  = number of rearing days.

### 2.5.3. Digestible Energy for maintenance and growth.

The energy budget for the shrimp for a given period is represented in the following equation (Cuzon and Guillaume, 1997; Sumule et al, 2003):

$$(6) GE_e = F + M + U + Ev + G$$

where  $GE_e$ , gross energy intake;  $F$ , energy loss for faeces;  $M$ , energy used for metabolism,  $U$  energy loss for ammonia;  $Ev$ , energy loss for exuvia and  $G$ , energy used for growth.

$M$  includes energy for routine metabolism, heat increment by feeding and activity.

The gross energy ( $GE$ ) of diet is calculated from individual calorific values of the feedstuffs (INRA, 1989) (Tab. 3). Part of the gross energy intake is eliminated in the faeces; remaining energy is the digestible energy ( $DE$ ):

$$(7) DE_e = M + U + Ev + G$$

$DE$  level of the diet (Tab. 3) is the sum of the individual dietary  $DE$  of each ingredient. The dietary  $DE$  of each ingredient is calculated by applying the coefficient of Apparent Energy Digestibility ( $AED$ ) determined for *Penaeus setiferus* (Brunson et al. 1997). For the oils, we applied a mean apparent digestibility coefficient of 80% derived from the literature (Catacutan, 1991; Glencross et al., 2002; Lin et al., 2004).

In our study, from the above energy budget we just determined the dietary  $DE$  for maintenance and for growth :

**Dietary  $DE$  for maintenance**,  $DE_{em}$ , corresponds to the  $DE$  level of the maintenance ration intake ( $R_{em}$ ) that just maintains the shrimp without any change in its body weight.

$$(8) DE_{em} = M + U + Ev$$

**Dietary  $DE$  for growth or Scope-for-growth**,  $SFG$ , is the energy required for growth (G):

$$(9) SFG_x = G_x = DE_{ex} - DE_{em}$$

**Table 4:** Three-week growth response of sub-adults and juveniles *L. stylirostris* fed commercial diet. Mean  $\pm$  1 SE.

$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Survival rate (%)	n	Growth rate (g.day $^{-1}$ )	$SE^{(c)}$
<b>Sub-adults</b>				
0.00	37	11	-0.086	0.012
0.45	82	37	-0.061	0.005
0.90	96	43	-0.034	0.004
1.80	87	39	0.044	0.004
3.60	78	35	0.134	0.006
7.20	87	39	0.130	0.006
<b>Juveniles</b>				
0.45	0	30	—	—
0.90 <sup>(b)</sup>	27	8	0.050	0.015
1.80	87	26	0.028	0.005
3.60	83	25	0.109	0.006
7.20	37	11	0.138	0.012

<sup>(a)</sup> Ration distributed on a dry weight basis of the feed

<sup>(b)</sup> Data of this treatment are excluded of the final analysis

<sup>(c)</sup> Standard error

where  $DE_{ex}$ , is the dietary ED intake (ration x ).

#### **2.5.4. Food conversion ratio (FCR)**

FCR expresses the quantity of food required per unit weight gain. It is calculated according to the following formula:

$$(10) FCR = RS_{ex}/Grx$$

where Grx is the growth rate and  $RS_{ex}$  the amount of feed intake (ration x).

### **2.6. Statistics**

The data are presented in the form of individual and/or mean data  $\pm$  1 standard error (SE). Statistical analysis was carried out using Statview® V5 software (SAS Institute Inc.). One-way variance analysis (ANOVA) and the *post hoc* test PLSD Fisher were used to compare growth averages and molt rates (after square root arcsin transformation of the data). The chi2 test was used to compare mortality rates.

Weight gain in relation to food ration was studied using a polynomial regression. From the curve adjusted to the experimental data, the values of the  $R_{dm}$ ,  $R_{dopt}$  and  $R_{dmax}$  rations were determined graphically with Sigmaplot® V8 software (SPSS Inc.).

## **3. Results**

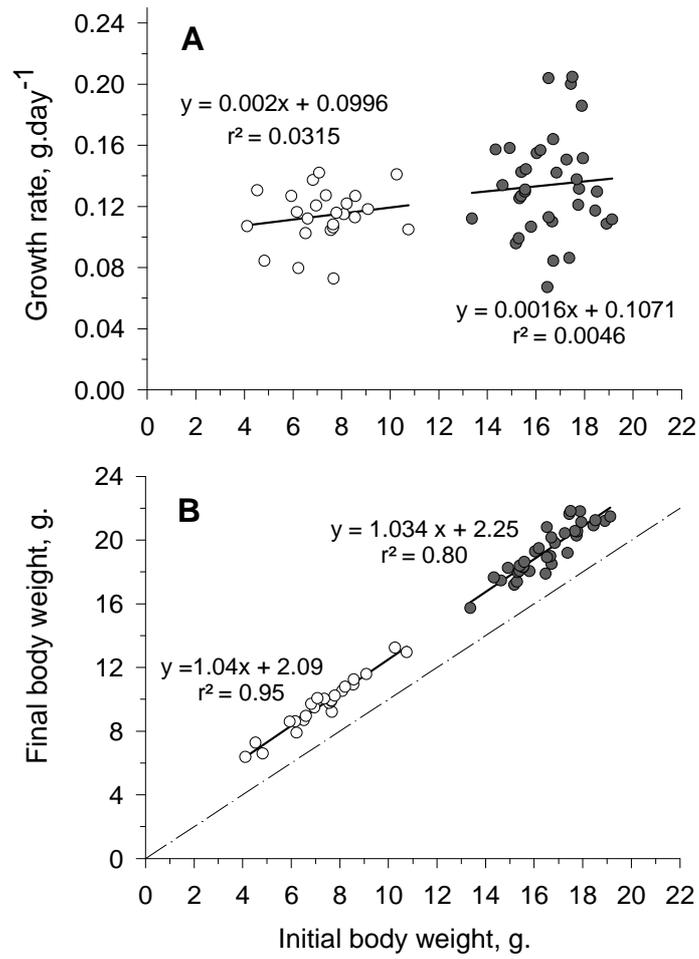
### **3.1. Effect of ration on the growth of juvenile and sub-adult *L. stylirostris* (Trial 1)**

The average temperature of the water in the rearing tanks was  $24.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  ( $n = 829$ ) (Fig. 1). At the beginning of the experiment it was  $27^{\circ}\text{C}$ , it then decreased to stabilise at around  $24^{\circ}\text{C}$  on day 5.

#### *3.1.1 Effect of ration on survival rates and exuvia.*

Survival rates and growth rates (Gr) according rations are presented in table 4. In the sub-adult animals, survival rates were similar for all rations ( $p = 0.37$ ). However, they were significantly lower in unfed animals ( $p < 0.0001$ ). In this treatment, high mortality rates were observed after day 18.

In the juvenile shrimps, survival rates varied considerably, according to the treatments applied: greater than 80 % for 1.8 and 3.6 % rations and less than 40 % for 0.9 and 7.2 %



**Figure 3:** Growth rate (A) and final body weight (B) of sub-adults (closed symbols) and juveniles (open symbols) according to initial body weight for the ration 3.6 %.

rations. Cannibalism associated with high mortality rates could have contributed significantly to the nutrition and growth of the animals fed a reduced ration of 0.9%. It is for this reason that we have excluded data of this treatment in the following analysis. With the 7.2% ration, on the other hand, the animals were fed to excess and cannibalism had little effect. Finally, all the animals on the 0.45% ration died in the course of the experiment.

With the 3.6% ration the animals seemed to be closest to satiety since uneaten food was rarely found in these tanks. Less than this ration, there was never any food left over, and in contrast, the 7.2% ration was clearly in excess and never totally consumed.

The first exuvia (monitored only in the sub-adults) were observed from day 6 in animals fed a ration of 7.2% (Fig. 2). Next in order were the 3.6, 1.8 and 0.9% rations, with the first molts observed on the 9<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days respectively. No molt was observed for the 0.45% treatment. On day 20, cumulated molting rates were 0,  $2.2 \pm 2.2$ ,  $6.7 \pm 3.8$ ,  $13.3 \pm 6.7$  and  $24.8 \pm 9.9\%$  respectively for rations 0.45, 0.9, 1.8, 3.6 and 7.2%. The molting rate for the 7.2% ration was significantly higher than for the 1.8% ( $p = 0.048$ ), 0.9% ( $p = 0.019$ ) and 0.45% ( $p = 0.012$ ) rations. As mortality was more than 60% in the unfed shrimps, we excluded this treatment from our analysis.

### *3.1.2. Individual growth as a function of shrimp size.*

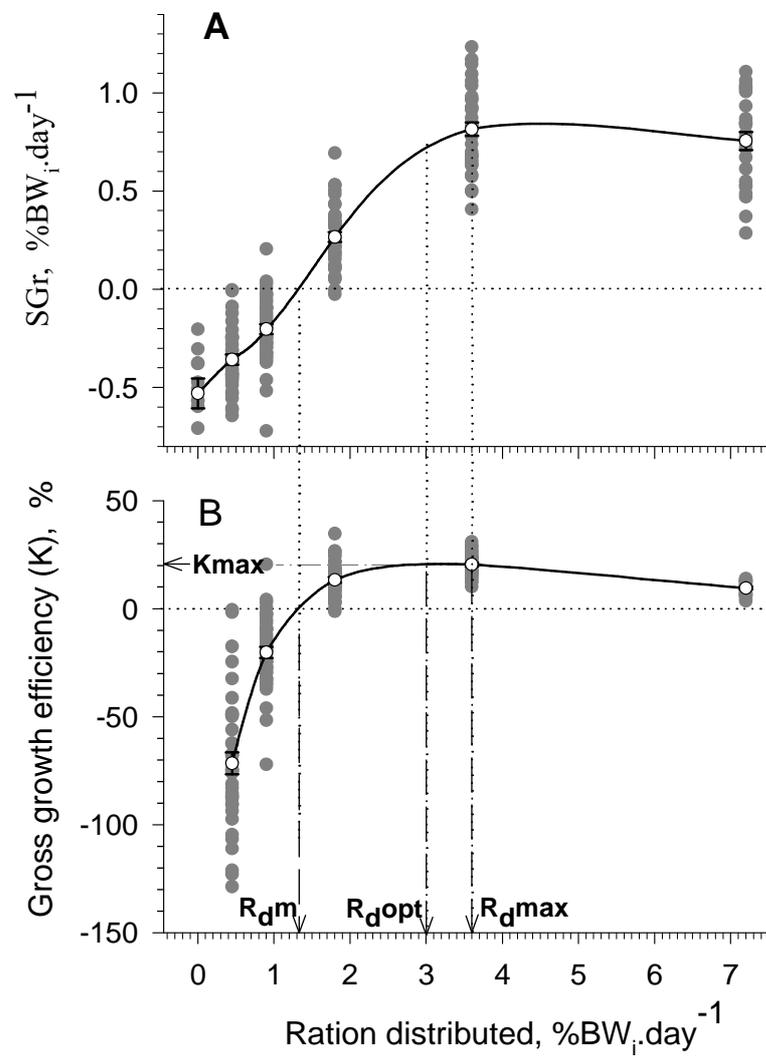
Growth rates (Gr) for a daily ration of 3.6% were significantly higher ( $p = 0.008$ ) for the sub-adult shrimps ( $0.134 \pm 0.006 \text{ g.day}^{-1}$ ) than for the juveniles ( $0.109 \pm 0.006 \text{ g.day}^{-1}$ ), (Tab. 4). However, within the same size class, the animals' weight did not significantly influence Gr, with  $r^2 = 0.0315$  for the juveniles and  $r^2=0.0046$  for the sub-adults (Fig. 3A).

Final weight evolved in a linear fashion with initial weight (Fig. 3B). The regression line slopes were similar for both size classes, whereas the Y-axis intercept point was higher for the sub-adults ( $b = 2.25\text{g}$ ) compared with juveniles ( $b = 2.09\text{g}$ ).

### *3.1.3. Growth rate according to rations size.*

Gr increased significantly with rations ( $p < 0.0001$ ) for both sub-adult and juvenile animals (Tab. 4). Sub-adult Gr reached a maximum with the 3.6% ration ( $\text{Gr}_{3.6\%} - \text{Gr}_{7.2\%}$ :  $p = 0.59$ ) whereas juveniles Gr continued to increase significantly between 3.6 and 7.2% rations ( $p = 0.0099$ ).

The overall relation of Specific Growth Rate (SGr) to daily distributed ration ( $R_d$ ) gives a sigmoidal Growth-Ration (GR) curve (Fig. 4A). The sub-adults that were starved or underfed rations of 0.45% and 0.9% lost weight. Unfed animals lost  $5.3 \pm 0.76 \text{ g}$  per day and



**Figure 4:** (A) Specific growth rate of sub-adult *L. stylirostris* (mean weight,  $16.9 \pm 0.4$  g,  $n = 204$ ) in relation to ration (on a dry weight basis) at  $24.9 \pm 0.1$  °C. (B) Gross growth efficiency (mean  $\pm$  SE) curve (KR) for the same data. These two relations are use for the determination of maintenance ( $R_{dm}$ ), optimum ( $R_{dopt}$ ) and maximum rations ( $R_{dmax}$ ). Closed symbols correspond to individual data and open symbols to mean  $\pm$  1 SE.

per kilo of shrimp which is the equivalent of  $27.53 \pm 0.37 \text{ kJ}\cdot\text{day}^{-1}$ , given that the mean calorific content of one gram of fresh shrimp is 5,196 kJ (Cuzon, personal com; Wu and Dong, 2002). From the GR curve, different characteristic rations were determined graphically (Brett, 1979). The point at which the curve reached a plateau gives the maximum ration ( $R_{d\max}$ ). The tangent to the curve, from the origin, gives the optimum ration ( $R_{d\text{opt}}$ ) which corresponds to the best conversion of feed. The point where the curve and the abscissa intersect gives the maintenance ration ( $R_{d\text{m}}$ ).

Rations  $R_{d\text{opt}}$  and  $R_{d\text{m}}$  could also be determined graphically from the K-Ration (KR) curve, derived from the GR curve (Fig. 4B). The KR curve represents the relationship between the gross growth efficiency (K), and the ration, where  $K = 100 \times (SGr / R_d)$ .  $R_{d\text{opt}}$  is the ration where K is maximum (Kmax) and  $R_{d\text{m}}$  is the ration where K equals zero. The difference between  $R_{d\text{opt}}$  and  $R_{d\text{m}}$  provides a simple measurement of the feed intake used for growth (Brett, 1979). Indeed, only the feed in excess of maintenance requirements is available for growth.

The GR curve (Fig. 5A) for the sub-adults is shifted slightly to the left by virtue of smaller rations  $R_{d\text{m}}$  and  $R_{d\text{opt}}$  – and reaches a plateau at a lower level ( $\approx 0.8\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$ ) than for the juveniles ( $\approx 1.6\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$ ). The KR curves (Fig. 5B) follows the same trends, with, in particular, a Kmax of 21% for the sub-adults compared with 44% for the juveniles.

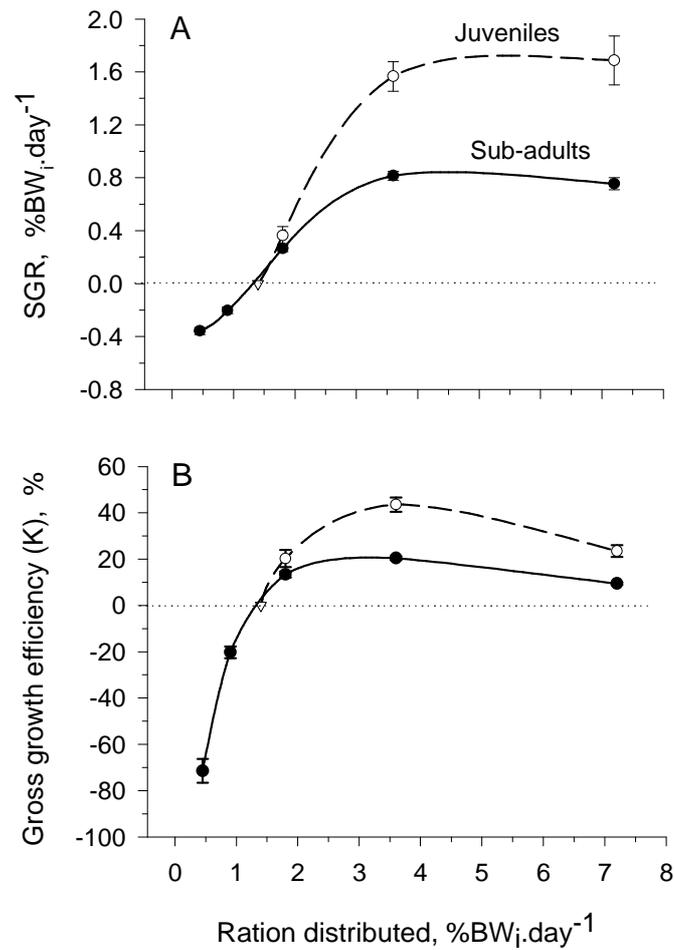
From figures 4 and 5, for the sub-adult animals we obtained :  $R_{d\text{m}}$  equals 1.35% without growth,  $R_{d\text{opt}}$  equals 3% for optimal specific growth ( $SG_{\text{opt}}$ ) of  $0.75\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$  and  $R_{d\text{max}}$  equals 3.6% for maximum growth ( $SG_{\text{max}}$ ) of  $0.815\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$ .

For the juvenile shrimps :  $R_{d\text{m}}$  equals 1.4%,  $R_{d\text{opt}}$  equals 3.6% with  $SG_{\text{opt}}$  of  $1.567\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$  and  $R_{d\text{max}}$  estimated at 7.2% for  $SG_{\text{max}}$  of  $1.687\% \text{ BW}_i \cdot \text{day}^{-1}$ .

On the basis of a biomass of 1 kg of shrimp and over a period of 24h, table 5 presents, for the optimum ration, the energie intake, the weight gain and the Food Conversion Ratio (FCR<sub>opt</sub>).

For the sub-adults, the distribution of digestible energy intake ( $DE_e = DE_{em} + SFG_{\text{opt}}$ ) was:  $80.3 = 39 + 41.3$  and for the juveniles:  $96.5 = 40.5 + 56$ . Lower requirement for growth of larger animals led to a smaller ED intake.

The fraction of gross energy intake ( $GE_{e\text{opt}}$ ) channeled to maintenance is given by the ratio  $DE_{em}/GE_{e\text{opt}}$  and to growth by the ratio  $SFG_{\text{opt}}/GE_{e\text{opt}}$ . Thus, GE intake is channelled in equal measure for maintenance (35.4%) and growth (37.6%) in sub-adults



**Figure 5:** (A) Specific growth rate of sub-adult (closed circle) and juvenile (open circles) *L. stylirostris* in relation to ration (on a dry weight basis) at  $24.9 \pm 0.1$  °C. (B) Gross growth efficiency (mean  $\pm$  SE) curve (KR) for the same data. For juveniles triangular symbol derived from the extension of the curves.

shrimps whereas in juveniles the proportion is smaller for maintenance (30.6%) than for growth (42.4%).

The  $FCR_{opt}$  is obtained from the  $R_{e, opt}/Gropt$  ratio. Although food consumption is relatively lower (-20%) in the large animals, the FCR (3.52) is higher than for the juveniles (2.02). This difference is explained by a growth rate two times slower in sub-adult compared to juveniles shrimps.

The  $SFG_{opt}/Gropt$  ratio gives us the requirement per unit weight gain (g) of *L. stylirostris*. It is 53% higher in the sub-adult shrimps which require  $23.05 \text{ kJ.g}^{-1}$  compared with only  $14.94 \text{ kJ.g}^{-1}$  for the younger animals.

#### 3.1.4. Influence of sex on growth.

Growth rates for males and females according to rations are given in figure 6. In the sub-adult shrimps, the females that were starved or underfed (ration of 0.45%) lost more weight than the males ( $p = 0.052$ ). For the 3.6 and 7.2% rations, the females had a higher growth rate than the males ( $p = 0.0052$ ). No significant difference emerged for the intermediate rations of 0.9% ( $p = 0.7$ ) and 1.8% ( $p = 0.18$ ).

In the juveniles, whatever the ration, no effect of sex on growth was observed ( $p > 0.2$ ).

### 3.2. Effect of the rearing season (Trial 2)

The average water temperature in the tanks was  $27.2 \pm 0.6^\circ\text{C}$  in summer and  $22.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$  in winter (Fig. 7). During the first 18 days of summer, the temperature was  $27.5^\circ\text{C}$ , dropping slightly to  $26^\circ\text{C}$  over the last few days. During the winter, the temperature dropped twice to below  $22^\circ\text{C}$  (critical lower limit for *L. stylirostris*), on the 8<sup>th</sup> and the 15<sup>th</sup> days of the trial.

Table 6 shows the survival rates and growth rates (Gr) according to rations. Survival rates were between 70% and 90% with the exception of the unfed animals in winter.

#### 3.2.1. Effect of the ration on growth.

The growth rate (Gr) is significantly influenced by rations ( $p < 0.0001$ ) whatever the season (Tab. 6). Growth reached a maximum with rations of 4% and 2.8% in summer and in winter respectively.

In summer, GR curve (Fig. 8A) shifted to the right in virtue of higher weight loss in unfed shrimp and of larger maintenance ration ( $R_{dm}$ ). In summer, the unfed animals lost

**Table 5:** Feed and equivalent energy intake, weight gain and feed conversion ratio of 1kg sub-adult and juvenile shrimps fed with commercial diet.

		Intake/day/ kg of shrimp			Gr <sub>opt</sub> <sup>(c)</sup> (g.d <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	FCR <sub>opt</sub> <sup>(d)</sup>
		Feed (g)	GE <sup>(a)</sup> (kJ)	DE <sup>(b)</sup> (kJ)		
<b>Sub-adults</b>	Optimal ration eated (RS <sub>eopt</sub> ) <sup>(*)</sup>	26.4	460.7	366,4	7.50	3.52
	Maintenance ration eated (RS <sub>em</sub> ) <sup>(*)</sup>	12.82	223.8	163.2		
	DE <sub>em</sub> /GE <sub>eopt</sub>			35.4%		
	SFG (DE <sub>eopt</sub> -DE <sub>em</sub> )			172.8		
	SFG/GE <sub>eopt</sub> intake			37.6%		
<b>Juveniles</b>	Optimal ration eated (RS <sub>eopt</sub> ) <sup>(*)</sup>	31.7	552.3	403,8	15.67	2.02
	Maintenance ration eated (RS <sub>em</sub> ) <sup>(*)</sup>	13.3	230.1	221,3		
	DE <sub>em</sub> /GE <sub>eopt</sub>			30.6%		
	SFG (DE <sub>eopt</sub> -DE <sub>em</sub> )			234.3		
	SFG/GE <sub>eopt</sub> intake			42.4%		

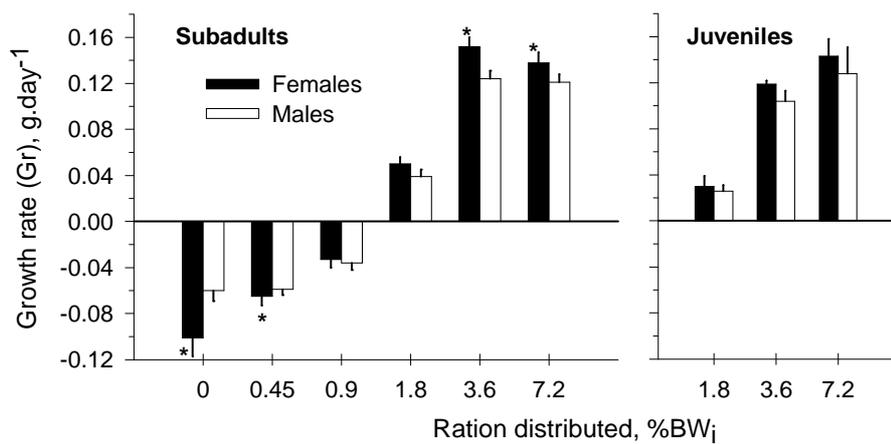
(\*)12% and 5% feed leaching included for R<sub>opt</sub> and R<sub>m</sub> respectively

(a)Gross energy of the diet = 17.45 kJ.g<sup>-1</sup> of commercial food (SICA)

(b)Digestible energy

(c)Optimal growth rate

(d)Optimal feed conversion ratio (Feed/Gr<sub>opt</sub>)

**Figure 6:** Three-week growth response of sub-adults and juveniles *L. stylirostris* fed commercial diet according to sex of animal.

daily  $5.25 \pm 0.047\text{g}$ , and in winter  $1.95 \pm 0.079$  g per kg of shrimp biomass ( $p = 0.0006$ ). In energy terms, these weight losses are equivalent to  $27.28 \pm 0.24 \text{kJ}\cdot\text{day}^{-1}$  and  $10.12 \pm 0.41 \text{kJ}\cdot\text{day}^{-1}$ .

Above the  $R_{dm}$  ration, SGr increased before reaching a plateau corresponding to maximum growth, which was higher in summer than in winter.

The KR curves followed the same trend with a shift to the right in summer (Fig. 8B).  $K_{max}$  values were nearly the same (26%) for the two rearing seasons. However, above the optimum ration, K decreased slower in summer than in winter.

From figures 8 A&B, we obtained in summer :  $R_{dm}$  equals 1% for no growth, a  $R_{dopt}$  equals 2.65% for  $SG_{ropt}$  of  $0.9\% \text{BW}_i\cdot\text{day}^{-1}$  and a  $R_{dmax}$  equals 4% for  $SG_{rmax}$  of  $1.05\% \text{BW}_i\cdot\text{day}^{-1}$ .

In winter,  $R_{dm}$  equals 0.4%,  $R_{dopt}$  equals 1.4% for  $SG_{ropt}$  of  $0.55\% \text{BW}_i\cdot\text{day}^{-1}$  and  $R_{dmax}$  estimated at 2.8% for  $SG_{rmax}$  of  $0.6\% \text{BW}_i\cdot\text{day}^{-1}$ .

On the basis of 1 kg of shrimp and over a period of 24h, table 7 shows, for the optimum ration, the energy intake, the weight gain and the Food Conversion Ratio ( $FCR_{opt}$ ).

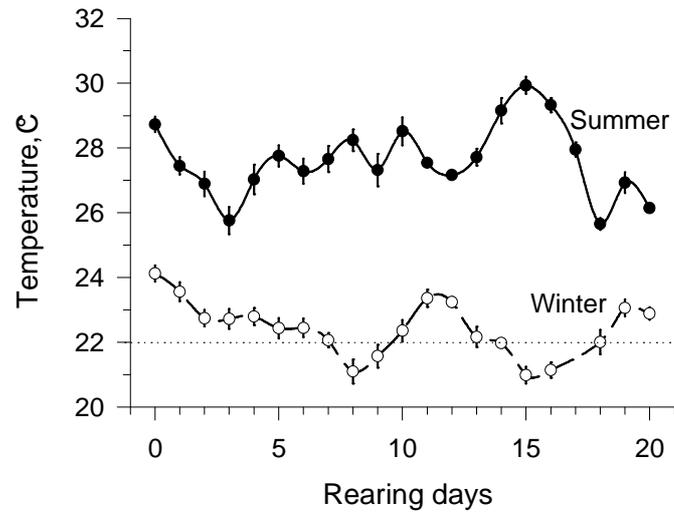
Distribution of digestible energy intake ( $DE_e = DE_{em} + SFG_{opt}$ ) according to season gives, in summer:  $79.7 = 31.9 + 47.8$  and in winter:  $42 = 12.8 + 29.2$ . The digestible energy required for maintenance and the  $SFG_{opt}$  are respectively 2.5 and 1.6 times higher in shrimp reared in the summer.

Whatever the rearing season, the fraction of gross energy intake ( $GE_{eopt}$ ) channelled to maintenance ( $DE_{em}$ ) is smaller than that recovered for growth ( $SFG_{opt}$ ). However  $DE_{em}$  is higher in summer (29.9%) than in winter (22.7%) and conversely, SFG is lower in summer (44.8%) compared with winter (52.0%).

Although feed consumption is higher in summer (+ 89%), the FCR (2.26) is very similar to that for winter (2.08). The reason for this is the 75% higher growth rate in summer.

The rearing season has little effect on the energy requirement per unit weight gain (g), it is of  $19 \text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$  and of  $20.37 \text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$  in summer and winter respectively.

In the course of this trial, sex was not observed to have any effect on growth, either in summer ( $p = 0.99$ ) or in winter ( $p = 0.42$ ).



**Figure 7:** Temperature change (mean  $\pm$  1 SE) in the outdoor experimental tank during rearing period in summer (closed symbols) and winter (open symbols).

**Table 6:** Three-week growth response of sub-adults *L. stylirostris* fed experimental feed reared in summer and in winter.

$R_d^{(a)}$ (% $BW_i$ )	Survival rate (%)	n	Growth rate (g.day $^{-1}$ )	$SE^{(b)}$
<b>Summer</b>				
0.0	77	23	-0.079	0.007
1.0	93	28	-0.004	0.010
2.0	90	27	0.077	0.007
4.0	93	28	0.145	0.012
8.0	93	28	0.133	0.008
<b>Winter</b>				
0	60	9	-0.024	0.009
1.4	92	55	0.059	0.005
2.8	84	38	0.069	0.004
5.6	84	38	0.077	0.004

<sup>(a)</sup> Ration distributed on a dry weight basis of the feed

<sup>(b)</sup> Standard error

#### 4. Discussion and conclusion

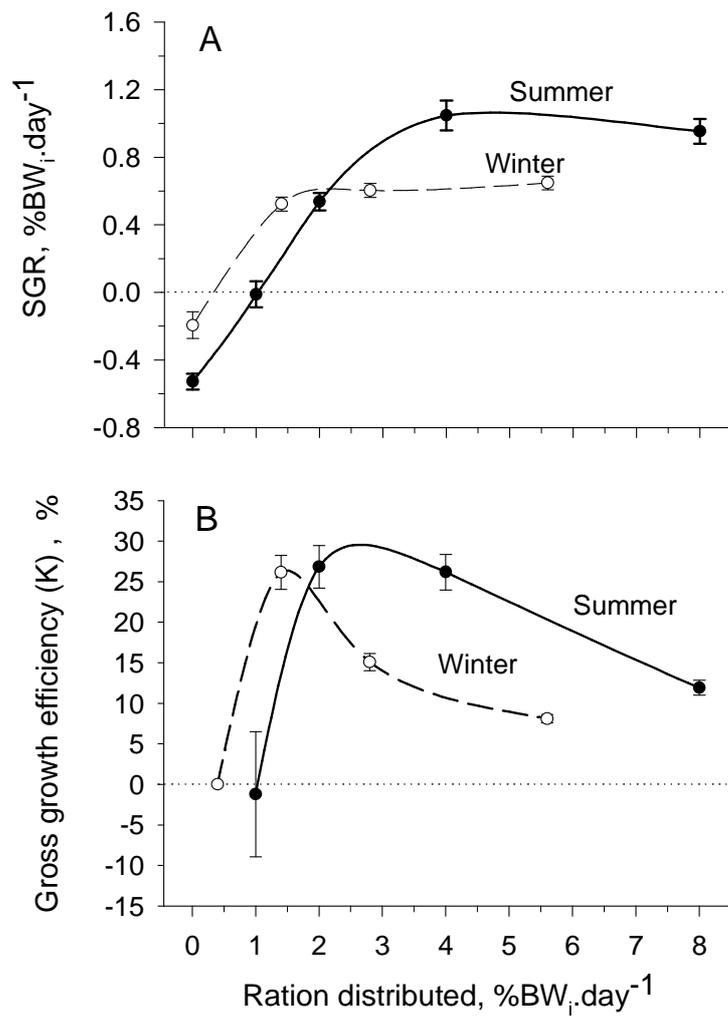
The vast majority of studies on shrimp nutrition measure the effect of experimental feed on growth (weight gain) and survival (D'Abramo and Castell, 1997). As evaluations are carried out by comparing the final mean weights among dietary treatments, they usually disregard potential influence of differences in initial mean weight and mortalities, which can affect the final result. In this study, growth was monitored for each individual using individually tagged shrimp. The size of the statistical samples was thus bigger as each animal was recognised as an independent observation or a replicate. The increase in the number of replicates per treatment thus increased the degrees of freedom and hence the power of the statistical tests carried out. As weight gain was independent of the initial body weight (Fig. 3A) we used variance analysis to compare mean values of individual growth rates (Gr).

Moreover, by monitoring the animals individually, we were able to disregard the influence of mortalities except when these became too high and significantly modified the density and/or biomass, which could in turn affect shrimp's growth.

##### ***Growth as a function of the ration distributed.***

The relations between rations and specific growth (GR curve), and between rations and gross conversion efficiency K (KR curve), are well documented in fish (Brett, 1979). These relations provide key informations to understand the influence of environmental factors on feed intake as well as on growth. Paradoxically, these fundamental relations have rarely been applied in studies on shrimps nutrition. Sedgwick (1979) based his study on these relations to look at the influence of feeding frequency on growth of *Penaeus merguensis* post larvae (initial weight 0.13 g). Kureshy and Davis (2002) used various daily rations to estimate the daily requirements for protein of juvenile *Litopenaeus vannamei* (1.3 g to 8.5 g).

The GR and KR curves defined in this study for *L. stylirostris* juveniles ( $BW_i < 10g$ ) and sub-adults ( $BW_i > 10g$ ) are similar in appearance to those described in some fish (Brett, 1979; Cui and Wootton 1988; Jobling, 1994) (Figs. 4, 5 and 8). Growth is negative in starved and under-fed animals then increases in a sigmoidal fashion to reach maximum growth for the highest rations. It is then a simple matter to plot graphically from these curves the maintenance ( $R_{dm}$ ) and optimum ( $R_{dopt}$ ) rations (Fig. 4). Maximum ration ( $R_{dmax}$ ), on the other hand, is more difficult to determine. This was especially the case for the juvenile shrimps (Trial1) where maximum growth was obtained for a ration of 7.2% (Fig. 5), whereas this ration was clearly in excess since food remains were systematically found.



**Figure 8:** (A) Specific growth rate of sub-adult *L. stylirostris* in relation to ration (on a dry weight basis) in summer (closed circle ;  $27.20 \pm 0.62$  °C) and winter (open circles ;  $22.19 \pm 0.13$  °C). (B) Gross growth efficiency curve (KR) for the same data.

The growth acceleration according to ration size should be linked with an increase in molt frequency and/or weight gain after molting. In sub-adults shrimps, for rations smaller than  $R_{dopt}$ , molting seemed to be delayed and recorded exuvia are very few (Fig. 2). Wu and Dong (2002) have also shown that after a “nutritional stress”, the molt cycle of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is extended and molt frequency decreases. Also in crayfish growth rate is influenced by the ration which regulates molt frequency (Aiken and Waddy, 1992; Barki et al., 1997).

Accuracy of results from the Growth-Ration relation allowed to show a sexual difference in growth rate in 16 g sub-adult shrimps (Fig. 6). Females had greater weight loss when unfed and superior growth rate when fed optimal or maximum rations. Sexual growth differentiation only occurs at a certain size or developmental stage, since it was not observed in juveniles (Fig. 6) or sub-adults shrimps weighing less than 14 g. Sexual growth differentiation of *L. stylirostris* broodstock leads to a difference of 21% in average body weight between males and females breeders (D. Pham, personal communication). More generally, the sexual growth differentiation has been clearly established in some penaeid shrimp species (Parrack, 1979; Devi, 1986; Chow and Sandifer, 1991; Primavera et al., 1998).

#### ***Maintenance energy and “scope for growth”***

Shrimp is a slow feeder and this feeding behaviour exacerbates the problem of leaching of the feed that can significantly reduce the availability of dietary nutrients to the organism. In our study, feed intake calculations took into account the pellets leaching rate according to water temperature and time for the shrimp to consume the whole meal.

Rations  $R_{dm}$  and  $R_{dopt}$  derived from the GR and KR curves were converted into energy units. We based our calculations on apparent digestibility coefficients for gross energy of ingredients in diets determined for *Penaeus setiferus* (Brunson et al, 1997).

The digestible energy for maintenance ( $DE_m$ ) – expended on metabolism, excretion and molting – represent between 23 and 36% of the gross energy intake for an optimum ration ( $GE_{eopt}$ ). The digestible energy channeled to growth is around 38 and 52% of  $GE_{eopt}$ . This basic energy distribution in *L. stylirostris* agrees with that determined for *P. setiferus* juveniles where the SFG represented 50% of energy intake (Saoud and Anderson, 2004). However, it does differ from *L. vannamei* (Zhu et al. 2004), *Penaeus chinensis* (Zang and Dong, 2002) and *Macrobrachium rosenbergii* (Clifford and Brick, 1979) juveniles where the SFG was at best between 15 and 33%. This difference could be explained by the different methods used, usually metabolic requirements were estimated directly by measuring rates of

**Table 7:** Feed and equivalent energy intake, weight gain and feed conversion ratio of 1kg of shrimps fed with experimental diet in summer and winter.

		Intake/day/ kg of shrimp			Gr <sub>opt</sub> <sup>(c)</sup> (g.d <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	FCR <sub>opt</sub> <sup>(d)</sup>
		Feed (g)	GE <sup>(a)</sup> (kJ)	DE <sup>(b)</sup> (kJ)		
<b>Summer</b>	Optimal ration eaten (RS <sub>eopt</sub> ) <sup>(*)</sup>	23.7	446.4	333.5	10.50	2.26
	Maintenance ration eaten (RS <sub>em</sub> ) <sup>(*)</sup>	9.5	179.1	133.5		
	DE <sub>em</sub> /GE <sub>eopt</sub>			29.9%		
	SFG (DE <sub>eopt</sub> -DE <sub>em</sub> )			199.6		
	SFG/GE <sub>eopt</sub> intake			44.8%		
<b>Winter</b>	Optimal ration eaten (RS <sub>eopt</sub> ) <sup>(*)</sup>	12.5	235.6	175.7	6.00	2.08
	Maintenance ration eaten (RS <sub>em</sub> ) <sup>(*)</sup>	3.8	71.5	53.6		
	DE <sub>em</sub> /GE <sub>eopt</sub>			22.7%		
	SFG (DE <sub>eopt</sub> -DE <sub>em</sub> )			122.2		
	SFG/GE <sub>eopt</sub> intake			52.0%		

(\*)12% and 5% feed leaching included for R<sub>opt</sub> and R<sub>m</sub> respectively

<sup>(a)</sup>Gross energy of the diet = 18.8 kJ.g<sup>-1</sup> of experimental food

<sup>(b)</sup>Digestible energy

<sup>(c)</sup>Optimal growth rate

<sup>(d)</sup>Optimal feed conversion ratio (Feed/Gr<sub>opt</sub>)

oxygen consumption. These measurements are experimentally exacting, necessitates the confinement of the shrimp in special apparatus, which may interact with the animal's response, and is usually recorded only over short periods of time (24h to 48h). In addition, metabolic requirements measured in such conditions may be overestimated if handling stress is not taken into consideration as has been reported by some authors (Dall and Smith, 1986; Wabete et al., 2004). SFG and energy for maintenance derived from the CR and KR curves cover a period of several weeks and can integrate events associated with the shrimp's metabolism (molt cycle, feeding, growth, activity and rest), rearing factors (environmental and zootechnical factors) and the shrimps population variability.

The energy lost by the unfed animals was used to estimate standard metabolic requirements in fish (Elliot, 1976; Lupatcsch et al, 1998). When starved, the shrimp *L. stylirostris* loses in summer between 27.28 kJ. day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> and 27.53 kJ. day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>. These values are below the standard metabolism measured by respirometry, which is 121.34 kJ.day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> for juveniles at 28°C (Wabete et al, in preparation). To explain this difference we should look at the weight loss kinetics of the shrimps, which was probably not linear over the three weeks of starvation.

### ***Influence of shrimps size***

At the same temperature, when *L. stylirostris* were fed a 3.6% ration the growth rate of the sub-adults (weight BW ≈ 17 g) was significantly higher than that of the juveniles (BW ≈ 8 g) (Tab. 4). This difference may be associated with a shift, reported in other investigations, in feeding behaviour and regime of the sub-adult shrimps. Indeed, feed ingestion rate of *Penaeus subtilis* was a function of the shrimp body weight: feeding intensity increased with shrimp size between 2 and 10 g then stabilised beyond this size (Nunes and Parsons, 2000). Moreover, in this species, there was a marked decline in detritus consumption coupled with an increase in prey ingestion at 10g shrimp (Nunes et al. 1997). Lee et al (1984) consider that *L. vannamei* experiences a change in its dietary regime between 10 and 20g. They also conclude that small shrimp (4g) have a better ability to utilize protein than larger shrimps (10 and 20g). Other authors reported in the same species an increase in the ratio of amylase to proteases by 3 or 4 orders of magnitude from 2 to 12 g shrimps (Le Moullac, 1995; Gamboa-Delgado et al., 2003).

In the present study, shrimp size (weight) also has a notable effect on food intake and scope for growth. In summer (average temperature = 24.9 ± 0.1°C), the daily ED requirement for optimal growth is estimated at 335 and 402 kJ.day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> in sub-adult and juvenile animals



respectively (Tab. 5). This lower energy requirement in larger *L. stylirostris* is associated with a relative decrease in feed intake, as it has also been shown for the shrimp *Penaeus subtilis* (Nunes and Parsons, 2000) and *Litopenaeus vannamei* (Wyban, 1995). *L. stylirostris* size does affect the distribution of energy intake : higher amount of ED was channelled to growth in juveniles ( $235 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ) than in sub-adults ( $173 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ). Thus DE requirement per unit weight gain (g) was higher in sub-adults ( $23 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) than in juveniles ( $14.95 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) as a result of a drop in SFG (-35%) and specific growth (-200%) in the sub-adult shrimps (Tab. 5). This difference in the ability to convert ED intake into growth results in almost a doubling of the FCR in sub-adult shrimps. This phenomenon is well known in fish, where typically the young animals require less energy per unit weight gain than older fish. This possibly is the result of age-dependent differences in composition of body growth, young salmonids having higher rates of protein synthesis and deposition than older fish in which fat deposition is relatively high (Kaushick and Médale, 1994).

*L. stylirostris* size seems to have little influence on maintenance energy. Daily DE requirements for maintenance are 163 and 167  $\text{kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  of shrimps of  $16.93 \pm 0.36 \text{ g}$  and  $7.95 \pm 0.44 \text{ g}$  respectively (Tab. 5). These values are close from standard metabolism estimated from oxygen consumption which give, for animals of  $10.6 \pm 0.7 \text{ g}$  ( $n=7$ ) at  $28^\circ\text{C}$ ,  $116 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  (Wabete, in preparation).

#### ***Effect of the rearing season***

The rearing season has a considerable effect on the growth of sub-adult shrimps ( $\text{BW}_i > 10 \text{ g}$ ) in relation to food consumption and conversion. Thus, in summer ( $27.20 \pm 0.62^\circ\text{C}$ ) the daily ED requirement for optimal growth is  $333.5 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  whereas in winter ( $22.19 \pm 0.13^\circ\text{C}$ ) it is only  $175.7 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  (Tab. 7). This reduction in energy requirement is mainly due to a 50% decrease in feed intake in winter. Indeed, feeding rate decreases with temperature, as has been shown for shrimps *Penaeus vannamei* (Ponce-Palafox et al., 1997) and *Macrobrachium rosenbergii* (Niu et al., 2003). Similarly, *L. stylirostris* eats a complete meal every 8 h at  $28^\circ\text{C}$  and every 72 h at  $20^\circ\text{C}$  (Chim et al, 2004).

More specifically, the rearing season influences the SFG (Tab. 7); it is 61% less in shrimps reared in winter ( $122 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ) compared with those reared in summer ( $199.6 \text{ kJ.day}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ). A similar trend is noted for growth rate, which drops by 57% in the cold season. This parallel evolution in SFG and growth rate according to season led to a similar DE requirement per unit weight gain in winter ( $20.4 \text{ kJ.g}^{-1}$ ) and in summer ( $19 \text{ kJ.g}^{-1}$ ). Nor



does optimal conversion of the feed appear to be influenced by the season since FCR values are similar, with 2.22 in winter and 2.05 in summer, and with Kmax values of around 26% in both seasons. However, above Ropt ration, gross growth efficiency K decreases much more quickly in the cold season (Fig. 8B). The Kmax is contained within a range of rations between 1.2 and 1.9% in winter and between 1.8 and 4.6% in summer. Since Kmax in winter is restricted within a very narrow range this could increase the risk of over-feeding which in turn could lead to higher amount of waste accumulated in the pond and higher feed-related costs.

The rearing season also affects ED requirement for maintenance, which increases from 53.5 kJ.day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> in winter to 133.5 kJ.day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> in summer (Tab. 7). A greater maintenance requirement in summer leads, in starved animals, to a greater weight loss (5.25 ± 0.05 g.day<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>) than in winter (1.95 ± 0.08 g.day<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>).

The increase in temperature therefore imposes two antagonistic effects on growth in the shrimp *L. stylirostris*: a positive effect by improving SFG, and a negative effect by increasing the cost associated with the maintenance metabolism.

Temperature is probably the most important environmental factor that controls shrimp growth (Wyban et al, 1995), especially in sub-tropical zones where the seasons are more marked. This is the case in Central America (Teichert-Coddington et al., 1994) and New Caledonia (Della Patrona et al., in preparation) where shrimp yields drop considerably in the cold season. In this study, we have shown that temperature has a notable impact on feed intake and energy allocation for maintenance and growth of the shrimp *L. stylirostris*. The development of season specific feeds would undoubtedly contribute to improve the economic yield of the shrimp farm especially in winter.

### **Conclusions**

The growth-ration relationship established for several fish species (Brett, 1979) is applied in the present study to the shrimp *L. stylirostris* individually tagged. This methodological tool appears to be very suitable for shrimp nutrition studies since it allows the measurement of the effects of different foods and ration sizes on metabolism and growth. It is very accurate since the metabolic requirements estimated indirectly from food intake and growth are similar to its estimation from oxygen consumption. Another advantage of this fundamental Growth-ration relation and its derived conversion efficiency equivalents (K-ration relation) is the possibility to study the action of rearing biotic and abiotic factors on shrimp growth, feed intake and metabolism.



The significance of this method can be improved further if the feed “Apparent energy digestibility” is also measured for the shrimp species under study.

As soon as we have available reliable data on the nutritional and energy requirements of the shrimp under rearing conditions, it will be possible to formulate more specific feeds for each life stage and each rearing season and thus offer farmers suitable feeding charts and protocol. Moreover, with a better knowledge of nutritional requirements in terms of input and retention it should be possible to reduce waste production significantly (organic matter in suspension, nitrogen and phosphorus), reduce the food conversion ratio (FCR) and hence the economical and ecological cost of feed.



## References

- Aiken, D.E. and Waddy, S.L., 1992. The growth process in crayfish. *Rev. Aquat. Sci*, 6: 335-381.
- Barki, A., Levi, T., Shrem, A. and Karplus, I., 1997. Ration and spatial distribution of feed affect survival, growth, and competition in juvenile red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared in the laboratory. *Aquaculture* 148: 169-177.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth In. Hoar, W.S. Randall, D.J. & Brett, JR., (Editors), *Fish Physiology*, Vol 8 Academic Press, New York., NY, pp. 599-675.
- Brunson, J.F., Romaine, R.P., Reigh, R.C. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture nutrition* 3: 9-16.
- Catacutan, M.R. Apparent digestibility of diets with various carbohydrate levels and the growth response of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 95 (1-2): 89-96.
- Chamberlain, G.W. 1991. Aquaculture trends and feed projections. *World Aquaculture* 24 (I): 19-29.
- Chim, L., Galois, R., Martin, J.L.M., Lemaire, P., Wabete, N., Massabuau, J.-C, Cuzon, G. 2004. Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution de l'aliment en fonction de la saison d'élevage. In: *Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie* (Ed. Ifremer) pp. 99-105. Actes Colloq., 38:.
- Chow, S., Sandifer, P.A., 1991. Differences in growth, morphometric traits, and male sexual maturity among Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. *Aquaculture* 92: 165-178.
- Clifford, H.C., Brick, R.W., 1979. A physiological approach to the study of growth and bioenergetics in the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricul. Soc.* 10: 701-719.
- Cui, Y., Wootton, R.J., 1988. Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus*, the effect of ration, temperature and body size on food consumption, fecal production and nitrogenous excretion. *Journal of Fish Biology* 33: 431-443.



- Cuzon G., Guillaume J. 1997. Energy and protein :energy ratio. In : Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6 (Ed. by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin & D.M. Akiyama), pp 51-70. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Dall, W., Smith , D.M., 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. Aquaculture, vol. 55, pp. 23-33.
- D'Abramo L.R., Castell J.D. 1997. Research methodology. In Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture. Ed Louis R. D'Abramo, Douglas E. Conckin, Dian M. Akiyama. World Aquaculture Society. Vol 6 p 3-20
- Della Patrona, L., Chim, L., Capo, S., Lemaire P., Brun P. 2004. Stimulation de la chaîne trophique naturelle dans les bassins d'élevage de *Litopenaeus stylirostris* : influence sur les performances zootechniques. in: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003. Ed. Ifremer, Actes Colloq., 38, 173-179.
- Devi, S.L., 1986. Growth and population dynamics of the Indian white prawn, *Penaeus indicus* H.M. Edwards, from Kakinada. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.) 95 (5): 629-639.
- Elliot J.M., 1976. The energetics of feeding, metabolism and growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to body weight, water temperature and ration size. J. Anim. Ecol., 45: 923-948.
- Funge-Smith, S.J., Briggs, M.R.P., 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. Aquaculture, 164: 117-133.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. Aquaculture research. 34: 1403-1411.
- Glencross, B.D., Smith D.M., Thomas, M.R., Williams K.C. 2002. The effects of dietary lipid amount and fatty-acid composition on the digestibility of lipids by the prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture 205: 157-169.
- Jobling, M., 1994. Fish Bioenergetics. Chapman and Hall, London.
- Kaushick, S.J., Médale, F. 1994. Energy requirements, utilisation and dietary supply to salmonids. Aquaculture 124: 81-97.



- Kureshy, N., Davis A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204: 125-143.
- Lee, P.G., Smith, L.L., Lawrence A.L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42: 225-239.
- Le Moullac, G. (1995) Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Thèse Diplôme de l'école Pratique des Hautes Etudes (Océanologie), 122pp.
- Lin, H.ZZ., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W., Zhuojia, J.L. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boon. *Aquaculture Research*, 35: 1441-1447.
- Moriarty, D.J.W., Cook, H.L., Hassan, R.B., Thanabal, M., 1987. Primary production and meiofauna in some penaeid prawn aquaculture ponds at Gelang Patah. *Malay. Agric. J.*, 54: 37-51.
- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S., 1997. Food consumption and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 149: 121-136.
- Nunes, A.J.P., Parsons, G.J. 2000. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187: 133-151.
- Nui, C., Lee, D., Goshima, S., Nakao, S. 2003. Effects of temperature on food consumption, growth and oxygen consumption of freshwater prawn *Macrobrachium rosenberghii* (de Man 1879) postlarvae. *Aquaculture Research*, 34: 501-506.
- Parrack, M.L. 1979. Aspects of brown shrimp, *Penaeus aztecus*, growth in the northern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.* 76 (4): 827-836.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157:107-115.
- Primavera, J.H., Parado-Esteva, F.D., Lebata, J.L. 1998. Morphometric relationship of length and weight of giant tiger prawn *Penaeus monodon* according to life stage, sex and source. *Aquaculture* 164: 67-75.



- Rosenberry, R. 2004. World Shrimp Farming 2004. Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 276 pp.
- Sedgwick, R.W. 1979. Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* de Man. *Aquaculture*, 16: 279-298.
- Saoud, P., Anderson, G. 2004. Using scope-for-growth estimates to compare the suitability of feeds used in shrimp aquaculture. *Journal of the Aquaculture Society*. 35(4): 523-528
- Sumule, O., Koshio, S., Teshima, S.-I., Ishikawa, M. 2003. Energy budget of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae fed highly unsaturated fatty acid-enriched and non-enriched *Artemia nauplii*. *Fisheries science*, 69: 706-7015.
- Tacon, A.G.J. 1996. Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming systems. *Aquacult; Nutr.*, 1:165-174.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D, Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8: 121-137.
- Tacon, A.G.J., Forster, I.P. 2003. Aquafeeds and the environment : policy implications. *Aquaculture* 226: 181-189.
- Teichert-Coddington, D.R., Rodriguez, R. Toyofuku, W. 1994. Cause of cyclic variation in Honduran shrimp production. *World Aquaculture*, 25 (1): 57-61.
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.-C. 2004. Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette péneïde *Litopenaeus stylirostris* à 20 °C. *Styli* 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Ed. Ifremer. Actes Colloq., 38, 280 p.
- Wu L., Dong S. 2002 The effects of repetitive « starvation-and-refeeding » cycles on the compensatory growth response in chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana* 74 (11): 1225-1239
- Wyban J., Walsh W.A., Godin D.M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138 267-279
- Zhang, S., Dong, S.-L. 2002. The effects of food and salinity on energy budget of juvenile shrimp of *Penaeus chinensis*. *Journal of Dalian Fisheries University*. 17 (3): 227-233.



---

Zhu C., Dong S., Wang F, Huang G. 2004. Effect of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 234: 485-496



## Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction des saisons d'élevage

L. Chim, R. Galois, J.L.M. Martin, P. Lemaire, N. Wabete, J.C. Massabuau, G. Cuzon

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Liet.Chim@ifremer.fr

### Résumé

En Nouvelle-Calédonie, la majorité des fermes de crevettes réalise un seul cycle de production par an. Au cours du cycle d'élevage, les animaux sont soumis à des périodes plus ou moins longues de températures inférieures à 22 °C, valeur qui constitue la limite basse de la plage de confort thermique pour *Litopenaeus stylirostris*.

Nous montrons qu'à 28 °C, *L. stylirostris* peut prendre deux repas complets toutes les 8 heures après un jeûne de stimulation alors qu'à 20 °C, dans les mêmes conditions expérimentales, cet intervalle est porté à 72 heures. Le temps du transit intestinal est également 2 fois plus rapide à 28 °C (6 h) qu'à 20 °C (12 h). À côté des modifications de la prise alimentaire et du transit intestinal, les périodes hivernales sont aussi caractérisées par des problèmes de survie et de balance hydro-minérale de *L. stylirostris*. Ces problèmes sont évidents chez les crevettes carencées en acides gras polyinsaturés (AGPI). Par contre, les animaux non carencés sont capables de s'adapter aux baisses de la température de l'eau. Cette adaptation se traduit par une élévation de la teneur en certains AGPI membranaires des cellules branchiales. Cet ajustement du profil acides gras des phospholipides branchiaux en faveur des AGPI contribue très probablement à la conservation des fonctions osmorégulatrices branchiales en maintenant la fluidité des membranes cellulaires au cours des baisses de température.

### Abstract

In New Caledonia, most shrimp farms run only one production cycle per year. During this time, shrimps face periods of time that vary from one year to another with temperature below 22°C. Such temperature being the lower limit for the thermal preferendum of *L. stylirostris*.

Metabolic demand of poikilotherms is under temperature control and it regulates consumption rates, digestion, and feed hydrolysis. For example, at 28°C, *L. stylirostris* can ingest two meals every 8 hours, while at 20°C there is a longer period of time going up to 72 hours to ingest a second whole meal. In a similar way, intestinal transit is twice faster with shrimp raised at 28°C (6 h) than shrimp acclimated at 20°C (12 h).

Aside from a slowing down of digestive functions, winter temperatures can have an adverse effect on hydro-mineral equilibrium in shrimps which are deprived of

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

polyunsaturated fatty acids (PUFAs). On the opposite, it has been shown in our laboratory that shrimps not deprived of PUFA were able to adapt to a decrease in sea water temperature. Such adaptation is shown through an increase in the amount of PUFAs in gill cell membranes and in particular linoleic acid (18:2n-6), linolenic acid (18:3n-3) and EPA(20:5n-3). This increase is counterbalanced by a drop in oleic acid (19:1n-9). We assume that such adjustment of fatty acid pattern in gill phospholipids with prevalence of PUFAs contributes to preserve gill osmoregulatory functions by maintaining cell membrane fluidity and integrity during periods of temperature drops. In shrimp raised at 28°C, osmoregulation capacity and survival rate are not dependent on dietary PUFAs. Therefore, *L. stylirostris* requirements for PUFAs vary throughout the year. Winter temperatures induce a strong requirement of such nutrients which lead when available, to an increase in shrimp performances.

Our results underline the need to adjust feed formulation as well as feeding strategy to cope with a variation in nutritional requirements and feeding behaviour of *L. stylirostris* facing temperature pattern of the cool season.

## Introduction

Les crevettes en élevage sont régulièrement exposées à d'importantes variations physico-chimiques et biologiques de leur environnement qui peuvent conduire à une baisse de leur résistance aux maladies. Ainsi, en Nouvelle-Calédonie, des baisses de températures importantes, jusqu'à 10 °C les dernières semaines de la saison chaude (passant de 29 °C à 19 °C), peuvent entraîner d'importantes mortalités connues sous le terme de « Syndrome 93 » (Mermoud *et al.*, 1998). Cette pathologie montre des phases chroniques et des épisodes aigus de mortalité, souvent précédés par une baisse de la température moyenne vers 22 °C associée à de fortes variations thermiques nyctémérales. Lemaire *et al.* (2002) ont montré que les chutes thermiques du milieu d'élevage s'accompagnaient d'une importante baisse de la capacité osmorégulatrice (Charmantier *et al.*, 1988, 1989) de *L. stylirostris*. Par ailleurs, nous avons montré, en conditions expérimentales, que l'impact des chutes de température était plus ou moins important suivant la qualité des lipides consommés par les crevettes (Chim *et al.*, 2001). Les animaux carencés en acides gras polyinsaturés et exposés aux températures hivernales voient leur capacité osmorégulatrice (CO) diminuer et leur réponse immunitaire se dégrader. Ces phénomènes pourraient affaiblir *L. stylirostris* et augmenter sa sensibilité au *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998a). L'objectif des travaux présentés ici est de mesurer l'influence des températures de saison froide sur différents paramètres de la nutrition de la crevette *L. stylirostris*. Une meilleure connaissance du comportement alimentaire et des besoins nutritionnels de *L. stylirostris* élevée en saison froide devrait en effet nous permettre d'élaborer des formules de granulés spécifiques et de proposer une stratégie d'alimentation mieux adaptée.

## Matériel et méthodes

### Détermination de la capacité osmorégulatrice (CO)

La capacité osmorégulatrice correspond à la différence de pression osmotique entre le milieu ambiant et l'hémolymphe (Charmantier *et al.*, 1989). La mesure de la pression osmotique est effectuée au moyen d'un osmomètre Wescor 5520 à ten-

sion de vapeur. Elle est basée sur la détermination de l'abaissement de la tension de vapeur d'une solution par rapport à la tension de vapeur du solvant.

#### Période réfractaire et vitesse de transit intestinal

La période réfractaire correspond au temps nécessaire à un animal pour prendre un second repas complet équivalent au premier repas pris après 3 jours de jeûne. Le protocole de détermination de la période réfractaire a été décrit par Wabete (2002). La période réfractaire a été déterminée chez *L. stylirostris* acclimatée à 20 °C et à 28 °C. La détermination du temps de transit a été faite avec des animaux à jeun depuis 3 jours et acclimatés à 19 °C, 23 °C et 26 °C. Les crevettes sont gavées individuellement avec 200 µl de bouillie à l'aide d'un cathéter fixé à une seringue hypodermique. Après gavage, les animaux sont remis dans leur bac d'origine. L'aliment présent dans le tube digestif est parfaitement visible par transparence. Les animaux ayant évacué totalement le contenu de leur tube digestif sont comptabilisés en fonction du temps.

#### Lipides alimentaires et adaptation aux températures hivernales

Les effets des lipides alimentaires ont été déterminés sur des crevettes nourries avec deux aliments, l'un pauvre et l'autre riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) dénommés respectivement HC et HFM. Les deux principales matières premières de ces aliments (farines de poisson et de calmar) étaient « délipidées ». Les lipides ont été extraits des farines par 4 bains successifs de 2 heures dans de l'éthanol absolu à 60 °C. En fin d'extraction, l'éthanol est éliminé par évaporation. De l'huile de foie de morue a été ajoutée à l'aliment HFM (7 % w/w) alors que de l'huile de coprah, a été ajoutée à l'aliment HC (7 % w/w). L'analyse des AGPI n-3 (EPA = C20:5 n-3 + DHA = C22:6n-3) sur 5 aliquotes a donné des teneurs de  $2.06 \pm 0,12$  et  $14,51 \pm 0,26$  g.kg<sup>-1</sup> pour les aliments HC et HFM respectivement. L'expérience a été menée dans 16 bacs de 150 l, avec 30 animaux par bac. Les crevettes d'un poids moyen de  $6,56 \pm 1,79$  g ont été mises à jeun une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux de chaque régime alimentaire ont été soumis à deux températures d'élevage 28 °C et 20 °C. Cette expérimentation comprenait donc 4 traitements différents (4 bacs par traitement): deux sources de lipides associées chacune à deux températures. Les crevettes ont été ainsi élevées durant 24 jours. À la fin de l'expérience, elles ont été sacrifiées et leur CO a été déterminée.

#### Analyse des lipides

Les branchies de chaque animal sont rincées à l'eau distillée, pesées et lyophilisées. Les échantillons sont ensuite conservés dans des tubes en Téflon bouchés, sous azote et à -80 °C. Les lipides totaux sont extraits par broyage des échantillons dans des mélanges de chloroforme et méthanol (Folch *et al.*, 1957). Ils sont dosés par un Iatroscan TH-10 connecté à un intégrateur Shimadzu CR3A. Quatre volumes de 1 µl d'extrait concentré sont déposés sur une baguette Chromarod SIII avec une microseringue. Après séchage, la baguette est lue par le Iatroscan sans développement préalable. Une calibration établie avec des standards purs permet de calculer la concentration en lipides de chaque extrait (Parrish & Ackman, 1985). Les lipides polaires présents dans l'extrait lipidique sont séparés des lipides neutres sur une chaîne HPLC couplée à un détecteur de masse évaporatif en dérivation sur la sortie de colonne (colonne semi-préparative, phase Si-Diol). Un gradient de

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

polarité est obtenu avec des proportions croissantes de méthanol dans du chloroforme. Quatre-vingt dix pour cent des lipides polaires injectés dans le système sont récupérés pour les analyses d'acides gras. Les esters méthyliques d'acides gras des lipides polaires sont obtenus après transestérification par du  $\text{BF}_3$ -méthanol (10 %, 1 h, 80 °C) (Morrison & Smith, 1964). Ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne BPX-70 (60 m x 0,25 mm ID), avec l'hydrogène comme gaz vecteur et un gradient de température de 100-220 °C à 1 °C. min<sup>-1</sup>.

## Résultats

### Influence de la température sur la période réfractaire et le transit intestinal

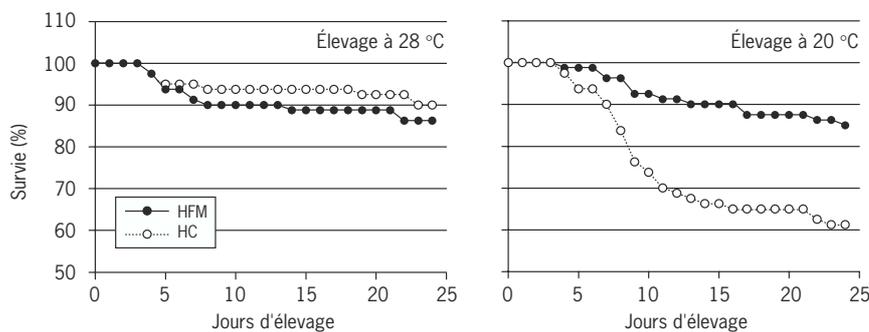
À 28 °C, *L. stylirostris* consomme  $0,103 \pm 0,002$  g de granulés par gramme de poids sec corporel. Huit heures après la première prise d'aliment, la crevette est de nouveau capable de reprendre un repas de volume identique. À 20 °C, le poids d'aliment ingéré rapporté au poids sec de l'animal est de  $0,081 \pm 0,004$  gramme. À cette température, la quantité mangée au cours du deuxième repas redevenait identique au repas initial seulement au bout de 72 heures.

De la même façon, le temps du transit intestinal augmente avec la baisse de la température d'élevage. Douze heures après le gavage, le transit était terminé chez 100 %, 87 % et 30 % des animaux acclimatés respectivement à 26 °C, 23 °C et 19 °C.

### Influence de la température d'élevage et du régime lipidique sur la capacité osmorégulatrice et le taux de survie

La survie au 24<sup>e</sup> jour d'élevage (fig.) était, chez les animaux nourris avec l'aliment HFM, de 90 % et de 82 % respectivement à 28 °C et 20 °C ( $p = 0,21$ ). Chez les animaux nourris avec l'aliment HC, cette survie était de 92 % à 28 °C et de 64 % à 20 °C ( $p = 0,015$ ). C'est également chez les crevettes du traitement HC et 20 °C que la CO mesurée est la plus faible (tab. 1).

Les teneurs en acides gras exprimées en pourcentage des acides gras totaux (AGT) des phospholipides extraits des branchies (principal organe de l'osmorégulation chez la crevette) des animaux nourris avec l'aliment HFM et élevés à 28 °C et 20 °C sont présentés dans le tableau 2. Chez les crevettes élevées à 20 °C, les



Nombre relatif d'animaux vivants (%) en fonction du temps, de l'aliment (HC ou HFM) et de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

lipides membranaires branchiaux sont plus riches en acides linoléique (C18:2n-6), dihomogamma linoléique (C20:3n-6), arachidonique (C20:4n-6), alphalinoléique (C18:3n-3), docosapentaénoïque (C22:5n-3) et eicosapentaénoïque (C20:5n-3). Cette augmentation de la teneur en certains acides gras polyinsaturés est compensée par une baisse de la teneur en acides gras mono-insaturés, notamment, l'acide oléique (C18:1n-9). Les acides gras saturés ne participent pas à la redistribution des acides gras des phospholipides des branchies.

Tableau 1 - Capacité osmorégulatrice (CO) au 24<sup>e</sup> jour en fonction de l'aliment (HC ou HFM) et de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

Température d'élevage	28 °C		20 °C	
	HFM	HC	HFM	HC
Aliments				
Nombre d'animaux en inter-mue	7	15	10	14
Moyenne CO (mOsm.kg <sup>-1</sup> ± ES)	254,86 ± 7,29	264,33 ± 9,79	267,5 ± 5,35	233,86 ± 11,3
Comparaison entre aliments	ns		p = 0,05	

Tableau 2 - Profil acides gras des phospholipides branchiaux des animaux nourris avec l'aliment HFM. Influence de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

Températures d'élevage	20 °C		28 °C	
	3		3	
Acides gras (% AGT des PL branchiaux ± ES)			Valeur p	
C14:0	91,193 ± 1,064	88,807 ± 0,209	0,0012	
C16:0	17,400 ± 0,227	17,440 ± 0,204	ns	
C18:0	7,680 ± 0,067	8,697 ± 0,147	0,0033	
C20:0	0,347 ± 0,012	0,337 ± 0,003	ns	
C22:0	0,507 ± 0,034	0,483 ± 0,012	ns	
C16:1n-7	1,630 ± 0,045	1,303 ± 0,057	0,0107	
C18:1n-9	12,470 ± 0,010	16,057 ± 0,037	< 0,0001	
C18:1n-7	3,960 ± 0,021	3,630 ± 0,121	ns (0,0647)	
C20:1	1,970 ± 0,084	1,850 ± 0,064	ns	
C18:2n-6	7,420 ± 0,120	6,770 ± 0,079	0,0109	
C18:3n-6	0,090 ± 0,006	0,123 ± 0,007	0,0194	
C20:3n-6	5,160 ± 0,135	4,370 ± 0,173	0,0230	
C20:4n-6	0,270 ± 0,006	0,243 ± 0,009	ns	
C18:3n-3	0,357 ± 0,012	0,300 ± 0,000	0,0092	
C18:4n-3	0,107 ± 0,003	0,117 ± 0,003	ns	
C20:5n-3	18,580 ± 0,364	16,650 ± 0,608	0,0532	
C22:5n-3	1,120 ± 0,017	1,030 ± 0,023	0,0356	
C22:6n-3	10,610 ± 0,183	10,520 ± 0,122	ns	
∑ saturés linéaires	26,63 ± 0,326	27,35 ± 0,159	ns	
∑ mono-insaturés	20,03 ± 0,126	22,84 ± 0,152	0,0001	
∑ polyinsaturés n-6	12,67 ± 0,184	11,27 ± 0,165	0,0049	
∑ polyinsaturés n-3	31,04 ± 0,510	28,86 ± 0,536	0,0423	

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

## Discussion et conclusion

Les élevages de la crevette calédonienne sont confrontés à des mortalités (« Syndrome 93 ») en relation avec les baisses de température hivernales. Ces mortalités qui touchent toute la filière d'élevage apparaissent comme un problème majeur à résoudre en termes de finalité économique et de défi scientifique. La stricte chronologie du déclenchement de ce syndrome conforte l'idée que la présence du *Vibrio penaeicida* (Mermoud *et al.*, 1998) dans le milieu n'est pas en soi suffisante pour déclencher cette maladie. Des études récentes ont par ailleurs montré l'effet néfaste des conditions thermiques rencontrées en hiver sur l'osmorégulation et certains aspects immunitaires de *L. stylirostris* (Chim *et al.*, 2001 ; Lemaire *et al.*, 2002).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de la température sur la période réfractaire, que nous avons définie comme étant le temps minimum nécessaire à un animal qui vient de terminer un repas complet, pour reprendre un second repas identique au premier (Wabete, 2002 ; Wabete *et al.*, en préparation). Le repas complet est défini comme la quantité maximale ingérée par un animal après une période de jeûne. Il existe une relation inverse de la période réfractaire avec la température. Cette période, qui est de 3 jours en saison froide (20 °C) est réduite à 8 h en saison chaude (28 °C). De la même façon, notre étude montre un allongement moyen du transit intestinal de 50 minutes pour une baisse de 1 °C de la température d'élevage. Cette forte relation entre la température et la consommation et l'utilisation de l'aliment a été également montrée chez d'autres pénéides (Chen *et al.*, 2001 ; Maguire & Allan, 1992 ; Wyban *et al.*, 1995).

Lemaire *et al.* (2002) ont montré qu'une chute de température (de 26 °C à 22 °C) provoquait chez *L. stylirostris* une baisse de la capacité osmorégulatrice (Charmantier *et al.*, 1989). Parallèlement, Chim *et al.* (2001) ont montré que l'impact d'une chute de température sur la CO était fonction de la qualité des lipides alimentaires consommés par l'animal : la sensibilité des crevettes à un stress thermique et osmotique était très supérieure chez celles nourries avec un aliment carencé en acides gras polyinsaturés. L'étude présentée ici montre une élévation de la teneur en acides gras polyinsaturés des lipides membranaires branchiaux de *L. stylirostris* élevées à basse température (20 °C). L'augmentation de la part des acides gras polyinsaturés dans les phospholipides paraît être une réponse adaptative au froid assez générale chez les poïkilothermes, qui permet de maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires. En effet, les lipides membranaires sont les seuls éléments de structure de la cellule qui peuvent être remaniés en relation avec les variations thermiques de l'environnement (Hazel & Williams, 1990). Différentes études chez les poissons indiquent que les changements de composition en acides gras des lipides des membranes biologiques affectent les mouvements d'eau et d'ions à travers la membrane cellulaire (Cullis & Hope, 1985). Il a été également montré que les acides gras essentiels interviennent dans la régulation de l'absorption des ions (Nonnotte *et al.*, 1987 ; Finstad & Thomassen, 1991). Ainsi, l'hyper-régulation requiert un transport actif d'ions attribué premièrement aux ATPases cation et anion dépendantes (Wheatly & Henry, 1987). Or, les enzymes membranaires peuvent être directement ou indirectement régulées par la composition en acides gras de la membrane cellulaire (Chapelle, 1986 ; Morohashi *et al.*, 1991).

La crevette *L. stylirostris* carencée en acides gras essentiels est incapable de s'adapter au froid par augmentation de la part en AGPI des lipides membranaires branchiaux. Les crevettes sont alors dans l'impossibilité de maintenir leur homéostasie osmotique et survivent mal aux températures hivernales. Ces résultats sont confortés par les travaux de Rees *et al.* (1994) qui ont montré qu'un apport alimentaire élevé en AGPI-n-3 améliorait la survie, la croissance et la résistance à un choc hypo-osmotique chez les post-larves de la crevette *Penaeus monodon*.

Afin de compenser la baisse de la consommation des animaux en hiver, nous suggérons de travailler dans deux directions. La première est d'adapter la fréquence de l'alimentation à la température d'élevage. Cette pratique, outre d'économiser de l'aliment, devrait permettre de prévenir la dégradation du milieu d'élevage par excès de déchets organiques. La seconde est d'augmenter dans les granulés la teneur en nutriments essentiels. Parmi ceux-ci, nous considérons plus particulièrement les AGPI qui, comme nous l'avons vu, jouent un rôle important dans l'adaptation de la crevette aux températures hivernales. Les ajustements préconisés ici pourraient permettre de mieux répondre aux besoins nutritionnels exprimés par *L. stylirostris* élevée en hiver et ainsi contribuer à maintenir la santé du cheptel.



**Références bibliographiques (Chim et al. 2004)**

- Chapelle S., 1986 Aspects of phospholipids metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 423-439.
- Charmantier G., Charmantier-Daures M., Bouaricha N., Thuet P., Aiken D.E., Trilles J.-P., 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans : *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol. Bull.* 175: 102-110.
- Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures M., Thouet P., Trilles J.-P., 1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. *European Aquaculture Society, Special Public.* 10: 65-66.
- Chen C., Huang B., Ye Z., Ji D., Wang S., Guo X., Chen Z., Jia X., 2001. Effect of temperature on growth, food intake and survival rate in *Penaeus vannamei* under different temperature conditions. *J. Jimei Univ. (Nat. Sci.) / Jimei Daxue Sueba* 6: 296-300.
- Chim L., Lemaire P., Delaporte M., Le Moullac G., Galois R., Martin J.L.M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress? *Aquacult. Res.* 32: 91-94.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M., Grimont P., 1998. Isolation and characterisation of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia, exploring a viral hypothesis. *Aquaculture* 164: 311-322.
- Cullis P.R., Hope M.J., 1985, Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In: Vance D.E. & Vance J.E. (eds) *Biochemistry of lipids and membranes*. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., Meulo Park, Calif., pp. 25-70.
- Finstad B., Thomassen M.S., 1991. Does dietary lipid composition affect the osmoregulatory ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at high and low temperatures? *Comp. Biochem. Physiol.* 99A: 463-471.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.



- Hazel J.R., Williams E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167-227.
- Lemaire P., Bernard E., Martinez-Paz J.A., Chim L., 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209: 307-317.
- Maguire G.B.; Allan G.L., 1992. Effects of temperature on growth, food consumption and food conversion of *Penaeus monodon*, *Penaeus plebejus* and *Metapenaeus macleayi*. NSW Fisheries, Salamander Bay, NSW (Australia). Proceedings of the aquaculture nutrition workshop., pp 97-99.
- Mermoud I., Costa R., Ferré O., Goarant C., Haffner P., 1998. "Syndrome 93" in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris* : History and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164: 323-335.
- Morohashi M.T., Tsuchiya K., Mita T., Kawamura M., 1991. Identification of (Na, K) ATPase inhibitor in brine shrimp, *Artemia salina*, as long-chain fatty acids. *J. Comp. Physiol. (sect B)* 161: 69-72.
- Morrison W.R., Smith L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5: 600-608.
- Nonnotte G., Aubree-Pelletier A., Colin D.A., 1987. Na<sup>+</sup> transport in perfused intestine and in isolated enterocytes of freshwater trout deprived of essential fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 66: 431-436.
- Parrish C.C., Ackman R.G., 1985. Calibration of the Iatroscan-Chromarod system for marine lipid class analyses. *Lipids* 20: 521-530.
- Rees J.F., Curé K., Piyatiratitivorakul S., Sorgeloos P., Menasveta P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae : an experimental approach based on Artemia enrichment. *Aquaculture* 122: 193-207.
- Wabete N., 2002. Etude physiologique des besoins métaboliques des crevettes pénéides (*Penaeus japonicus* et *Litopenaeus stylirostris*). Caractérisation des problèmes d'osmorégulation associés à la manipulation. DES Sciences Naturelles. Université de Bordeaux I, 28 p.
- Wheatly M.G., Henry R.P., 1987. Branchial and antennal gland Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of euryhaline crayfish *Pacifastus leniusculus*. *J. exp. Biol.* 133: 73-86.



Wyban J., Walsh W.A., Godin D.M. (1995) Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. 138: 267-279.



## CONCLUSIONS

Dans ce chapitre nous avons d'abord déterminé par des mesures directes de consommation d'oxygène à 20 et 28°C l'intensité du métabolisme oxydatif en période pré- et post-prandiale chez des crevettes *L. stylirostris* sub-adultes (20 g) ainsi que chez des animaux juvéniles (8 g). On verra dans le chapitre suivant que la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature montre que la crevette *Litopenaeus stylirostris* présente un métabolisme qu'on peut qualifier d'exacerbé par rapport aux autres animaux aquatiques.

Ensuite nous avons déterminé indirectement, par une étude de la relation qui lie la croissance de l'animal à la ration, les parts de l'énergie digestible ingérée allouées à l'entretien<sup>1</sup> et à la croissance.

Nous montrons que les résultats de ces deux approches totalement indépendantes sont cohérents entre eux pour ce qui est de l'énergie du métabolisme oxydatif et d'entretien, ce qui conforte la validité de nos protocoles expérimentaux et de nos résultats.

La relation croissance-ration mise au point pour *L. stylirostris*, issue des travaux réalisés chez les poissons (Brett, 1979) apparaît particulièrement précise. Elle a permis d'une part de déterminer des valeurs d'énergie d'entretien qui sont compatibles avec celles du métabolisme oxydatif obtenues en respirométrie et, d'autre part, de discriminer une différenciation sexuelle de la croissance dès le stade sub-adulte. L'intérêt de cette méthode réside dans la possibilité d'étudier l'influence des conditions (réelles) d'élevage, et du stade de développement de l'animal, sur la consommation de l'aliment, la rétention des nutriments et l'énergie allouée à la croissance.

Nous montrons ainsi un effet considérable de la saison d'élevage sur le besoin énergétique de l'animal et son appétit. Ainsi, en été (27.2 ± 0.6 °C) le besoin en énergie pour une croissance optimale est de 333 kJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> alors qu'en hiver (22.2 ± 0.1 °C) il est seulement de 176 kJ.kg<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>. Cette baisse du besoin énergétique, en saison froide, correspond à une diminution de la consommation d'aliment (-50 %) et de la croissance (-57 %). Cette évolution parallèle des deux phénomènes explique l'influence faible de la saison sur la transformation de l'aliment par l'animal. L'efficacité alimentaire maximum (Kmax) aux

---

<sup>1</sup> Somme des énergies perdues pour le métabolisme standard, post-prandial et des énergies perdues pour l'excrétion et la mue



deux saisons est sensiblement égale (26%). En hiver, nous avons déterminé que la quantité d'aliment à fournir pour une efficacité optimale est comprise entre 1.2 et 1.9 % de la masse corporelle par jour, alors qu'en été il faut fournir 1.8 à 4.6 %. Ce résultat a des implications pratiques particulièrement importante en élevage pour une meilleure gestion de l'apport alimentaire et de la qualité de l'eau dans les bassins.

La saison d'élevage influe également sur l'énergie allouée à l'entretien qui varie de 53 kJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> en hiver à 133 kJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> en été. Il doit être noté que ces valeurs sont comparables à celle du métabolisme mesuré en respirométrie qui était de 54 kJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> (valeur calculée en utilisant un coefficient oxycalorifique de 13,84 J.mg<sup>-1</sup> d'O<sub>2</sub>, d'après Brafield et Llewellyn (1982), à 20°C et de 116 kJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> à 28°C.

La baisse des températures en hiver impose donc deux effets antagonistes sur la croissance de la crevette *L. stylirostris*: un effet positif en diminuant le coût associé au métabolisme d'entretien et un effet négatif en réduisant l'énergie allouée à la croissance.

Nous avons également caractérisé la baisse de l'appétit des animaux en hiver par la détermination du temps réfractaire et du transit intestinal. A 28°C, *L. stylirostris*, après une période de jeûne de stimulation, peut prendre deux repas complets toutes les 8 heures. A 20°C, dans les mêmes conditions expérimentales, 72 heures seront nécessaires entre deux repas. Le temps du transit intestinal est également 2 fois plus rapide à 28°C (6 heures) qu'à 20°C (12 heures).

A côté des changements de croissance et de consommation avec la saison nous avons montré une influence de la température sur l'utilisation des lipides alimentaires. En saison froide nous observons une élévation de la teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) membranaires des cellules branchiales, notamment celle des acides linoléiques (18 :2n-6), linoléique (18 :3n-3) et eicosapentaénoïque (20 :5n-3), compensée par une baisse de la teneur en acide oléique (18 :1n-9). L'augmentation de la teneur en PUFA dans les phospholipides paraît être une réponse adaptative au froid, assez générale chez les poïkilothermes, qui permet de préserver la fluidité des membranes cellulaires et de maintenir ainsi leur intégrité structurelle et fonctionnelle. Nous avons montré que les animaux élevés à 20°C lorsqu'ils étaient carencés en PUFA, présentaient une capacité osmorégulatrice réduite, des mortalités plus importantes et une plus grande fragilité aux stress thermique et osmotique. Comme nous le verrons dans la suite de ce mémoire l'affaiblissement des animaux en hiver



provient de leur difficulté, lors d'un stress, à maintenir leur équilibre osmotique. Dans ce contexte la mise au point future d'un régime lipidique approprié, pour renforcer en saison froide la capacité d'adaptation de l'animal, paraît particulièrement prometteur.

Les résultats présentés dans ce chapitre posent donc les bases méthodologiques d'études futures de la relation croissance-ration chez *L. stylirostris*. On pourra ainsi obtenir des informations sur les besoins nutritionnels en fonction des facteurs biotiques et abiotiques des bassins. Il sera dès lors possible de formuler des aliments réellement adaptés aux besoins des animaux en conditions réelles d'élevage, prenant en compte le développement de l'animal, la saison de production et l'apport trophique endogène du bassin. La technique se révèle également précieuse pour étudier l'influence de la zootechnie (fréquence des repas, densités d'élevage..) et devrait permettre à terme d'optimiser rationnement et fréquence des repas. Cette optimisation devrait permettre à terme d'abaisser l'indice de conversion, le coût associé aux aliments et de diminuer significativement la production de déchets par les élevages. Ce dernier point est fondamental pour mieux maîtriser les problèmes de qualité de l'eau.

Au cours de ces expériences, nous avons retrouvé pendant les périodes hivernales les problèmes de mortalité bien connus des crevetticulteurs de Nouvelle-Calédonie. Comme nous l'avons dit dans l'introduction, l'apparition de ces problèmes en hiver correspond aussi à la période au cours de laquelle le syndrome 93 s'exprime le plus. Dans la suite de ce travail nous nous sommes donc attachés à rechercher les causes de cette fragilité par une approche fondamentale d'écophysiologie.



## **CHAPITRE IV**

### **ETUDE DES MECANISMES EXPLIQUANT LA FRAGILITE EXCESSIVE DES ANIMAUX EN HIVER**



## CHAPITRE IV

### ETUDE DES MECANISMES EXPLIQUANT LA FRAGILITE EXCESSIVE DES ANIMAUX EN HIVER

<b>Introduction</b> .....	<b>181</b>
---------------------------	------------

**Life on the edge : physiological problems in penaeid prawns, *Litopenaeus stylirostris*, living in the low side of their thermopreferendum**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2006) Marine Biology (Soumis) .....	<b>183</b>
---	------------

**Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*.**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU (2004). In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (Ed. Ifremer), p99-105. Actes Colloq., 38 .....	<b>219</b>
--	------------

<b>Conclusion</b> .....	<b>233</b>
-------------------------	------------



## INTRODUCTION

Nous avons vu précédemment que les crevettes *L. stylirostris*, qui ont d'une façon générale des besoins métaboliques importants, présentent une grande fragilité en période hivernale. En effet, toute manipulation à cette époque est accompagnée de mortalités importantes, dépassant très souvent les 50 %. Le Groumellec *et al* (1996) ont associé ces mortalités typiques au syndrome 93. L'observation histologique des tissus comme les muscles, l'hépatopancréas et les branchies des animaux moribonds ayant subi le stress de la pêche a en effet mis en évidence des lésions typiques du syndrome 93. Cependant alors que le pathogène est présent tout au long de l'année dans les bassins d'élevage, ce stress de manipulation ne produit pas les mêmes effets selon les saisons. Ceci laisse donc supposer l'existence de facteurs physiologiques aggravant (sensibilité accrue de *L. stylirostris*) et /ou environnementaux.

Dans ce chapitre nous avons abordé ce problème par l'analyse des régulations physiologiques impliquées lors du stress de manipulation. Notre démarche a consisté d'une part à analyser l'évolution des besoins en oxygène de l'animal après manipulation à 20 et 28 °C et d'autre part à examiner les éventuelles perturbations du système de transfert de l'oxygène du milieu ambiant à la cellule.

L'ensemble des interprétations a été réalisé dans le cadre de la stratégie des faibles pressions partielles d'oxygène chez les animaux aquatiques (Massabuau 2001 ; 2003 ; Corbari *et al.* 2004, 2005). Nous montrons en particulier, que c'est très probablement une trop forte dépendance de l'animal vis à vis de cette stratégie qui entraîne sa mort à la suite des manipulations hivernales.



**Life on the edge: physiological problems in penaeid prawns**

***Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum**

by

Nelly Wabete<sup>1,2</sup>, Liet Chim<sup>1</sup>, Pierrette Lemaire<sup>1</sup> and Jean-Charles Massabuau<sup>2\*</sup>

(2006) Marine Biology, *Soumis*

<sup>1</sup>IFREMER, Laboratoire Aquacole de Calédonie, Quai des Scientifiques, BP 2059, 98846, Nouméa, Nouvelle Calédonie.; <sup>2</sup>Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, UMR 5805, Université Bordeaux 1 and CNRS, Place du Dr B. Peyneau, F-33120 Arcachon, France.

\*to whom correspondence must be addressed. e-mail: [jc.massabuau@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:jc.massabuau@epoc.u-bordeaux1.fr)

*Running title:* penaeid life on the edge of their thermopreferendum

*Key words:* thermopreferendum, osmoregulation, ionic balance, oxygen, respiration, blood O<sub>2</sub> transport, metabolism, crustaceans.



**ABSTRACT**

The underlying physiological mechanisms explaining why the adult penaeid prawn *Litopenaeus stylirostris* cannot successfully face heavy stressful events on the low edge of its thermopreferendum (20-22°C) were studied during the austral winter. Prawns were studied during recovery from net fishing and rapid transfer from outdoor earthen ponds into indoor facilities. Osmoregulatory capacity, arterial blood oxygenation status and mortality rates were analyzed. Data were compared to similar test fishing and handling performed at 28°C during the austral summer. At 20-22°C, mortality of up to 70% was observed whereas at 28°C, maximum mortality was 3-5%. Importantly, after fishing and handling at 20-22°C, the resting osmotic pressure shifted briefly towards equilibrium with seawater. Mortality occurred when blood osmotic pressure (OPb) was still fairly high and the arterial O<sub>2</sub> partial pressure went down to its unstressed resting value. This increase in blood osmotic pressure was associated with a decrease in the blood's O<sub>2</sub>-carrying capacity, which can be counterbalanced by hyperoxygenating the blood, and led to a dramatic decrease in mortality. It is concluded that in penaeid prawns *L. stylirostris*, the specific action of low temperatures on ionoregulatory ability contributes to setting the geographical limits for this animal species through an impairment of their blood O<sub>2</sub>-carrying capacity during heavy stressful events like chasing by predators. Different scenarios are proposed and discussed to counterbalance the chain of events leading to death in shrimp farms during animal handling at low temperatures.



## INTRODUCTION

Temperature is an environmental parameter that plays a key role in determining animal distribution in the marine environment. Relationships between animal occurrence and survival have been clearly recognised for long time as being related to maximum and minimum temperature. Indeed, in most water-breathing animals body temperature conforms to the environment. Interestingly, depending on their ecological and geographical distribution, some ectotherms are virtually homeothermic because they live in a narrow range of ambient temperatures. This is the case for animals inhabiting regions where temperatures are relatively constant, like the deep oceans and polar seas, where temperatures are 2-4°C at all times, and equatorial zones, where there is also little or no seasonal change in temperature.

When animals are facing extreme conditions, outside or on the edge of their thermopreferendum range, there are multiple causes of thermal death, each operating within a certain time-temperature combination and often species-specific (Prosser and Heath 1991). The aim of the present work was to use a physiological analysis to obtain more insights into the mechanisms involved in death in penaeid shrimps *Litopenaeus stylirostris* exposed on the low edge of their thermopreferendum zone. The blue shrimp, *L. stylirostris*, is a tropical species native to the Pacific coast of Central and South America from Mexico, where maximum temperature can reach 30°C, to Peru,  $T_{\min} = 20^{\circ}\text{C}$  (Pérez-Farfante and Kensley 1997). Due to its high commercial value, it has been transplanted to various places, including New Caledonia, which is located in the subtropical area. Penaeid shrimps are farmed in ponds which vary in depth from 1-1.5 m and are thus exposed to circannual temperature changes. Importantly, during the austral winter, massive death can occur when temperatures fall below 20-22°C, even in well aerated water (partial pressure of oxygen,  $\text{PO}_2 = 21 \text{ kPa}$ ). We took this opportunity to increase our understanding of the underlying mechanisms which can limit ecological and geographical distribution in a tropical crustacean species. The rationale behind our method was that, even if under steady state conditions an animal is observed to be healthy when on the edge of its thermopreferendum, its efficiency could decrease considerably when facing dynamic imbalance such as would occur after a very stressful event. Indeed, any new stress factor imposed upon an organism changes its equilibrium. Thus, experiments were performed on the low edge of the animal's thermopreferendum, that is at about 20-22°C, by adding a further stress to the low temperature. This stressful event was net fishing followed by handling associated with a rapid transfer from large outdoor rearing ponds to indoor facilities. We studied the importance of maximal disruption, both at optimal temperature (28°C) and on



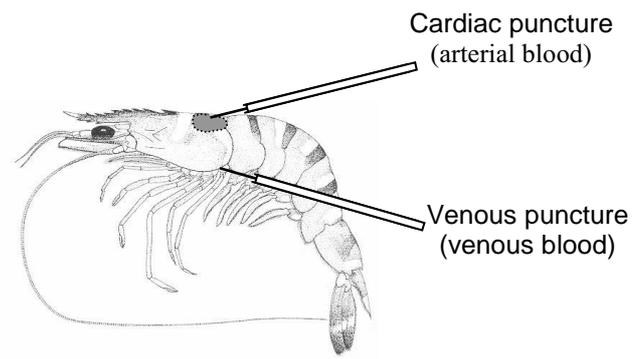
the low edge of the thermopreferendum, for more insights into what affects *L. stylirostris*'s ability to cope with low temperatures. We hypothesized that the handling we imposed could be assimilated to a predator-prey interaction in the wild, which is part of the normal repertoire in a crustacean life.

We show that at 20-22°C fishing and handling stress represent a heavy stimulus often followed by death after 2 days. At both temperatures, this stress is associated with a disturbance in the osmoregulatory capacity and change in O<sub>2</sub>-consumption rates and blood O<sub>2</sub>-status. At 20-22°C, the osmoregulatory disturbance is a rapid breakdown from which the surviving individuals take days to recover. In fact, the peak of mortality at low temperature occurs when the ionoregulatory induced decrease in hemocyanin affinity becomes concomitant with the return of arterial blood PO<sub>2</sub> to its low reference value in water-breathers, *i.e.* 1-2 kPa (Massabuau 2001). For reference, 1 kPa = 7.5 Torr or mm Hg. At 28°C, the oxygen concentration in water equilibrated with air is  $\approx 6.42 \text{ mg l}^{-1}$  and partial pressure  $\approx 21 \text{ kPa}$ .

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals and ambient conditions.*

Experiments were performed during 2 austral summer and winter periods, from July-September 2002 to March 2005, on 330 male and female penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in the intermolt stage (stage C from Drach 1939) weighing either  $15.5 \pm 1.9 \text{ g}$  (mean  $\pm 1 \text{ SE}$ , sub-adults) or  $37.2 \pm 0.7 \text{ g}$  (adults). They were reared in the experimental Ifremer prawn farm in St Vincent, New Caledonia (density in the ponds, 0.5-2 animals/m<sup>2</sup>; pond areas, 1200 m<sup>2</sup>). The ponds were fed with full sea-water (salinity, S‰ = 33-35 ‰; pH = 8.3-8.4) and artificial food pellets were given twice a day. For the experiments, the animals to be sampled were taken from the ponds using a casting net, they were then transferred to the laboratory in plastic tubs with a capacity of approximately 50 l within about 10 min. Once in the laboratory, the animals' fate depended on the experiment in which they were to be used: they were placed either into a concrete tank (15 m<sup>3</sup>) or into plastic tanks (500 l) thermoregulated at field temperature. In both types of tank, the water was constantly oxygenated by injection of air (PO<sub>2</sub> = 20-21 kPa; pH  $\approx 7.76 \pm 0.05$ ). As no significant difference was observed between housing conditions, all data were plotted together. During this phase of housing the prawns were fed on a complete experimental food (fish and



**Figure 1:** Arterial : Arterial and venous blood sampling in the peneid shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Venous blood sampling from the ventral lacunae. Arterial blood sampling by puncturing the heart.

crustacean meal, fish oil, wheat, soya, vitamins oligo-elements, gluten), 3% of their total biomass being given per day. The daily ration was divided into 2 equal meals distributed after performing samples in the morning and at 4.00 pm.

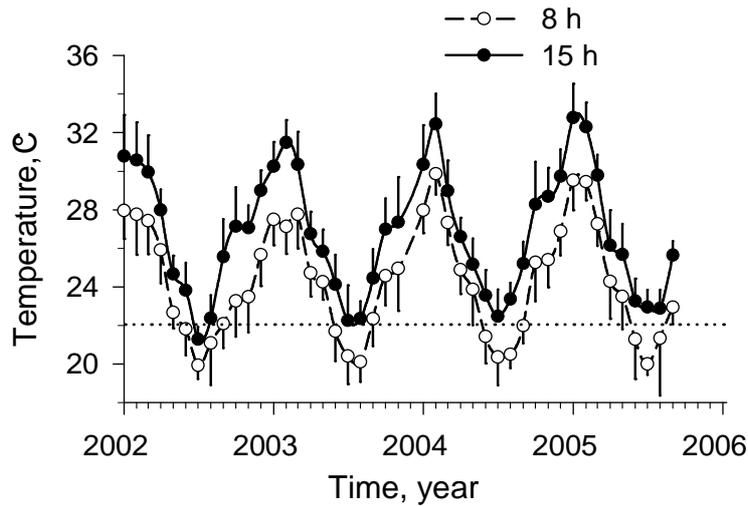
Three types of analyses were performed separately, first on sub-adults and then on adults, to follow the physiological changes occurring during net catching at 28 or 20-22°C: changes in  $O_2$  consumption rates as a function of time after sampling, morbidity and analysis of osmotic pressure and blood oxygenation status in the surviving prawns.

#### *Determination of oxygen consumption.*

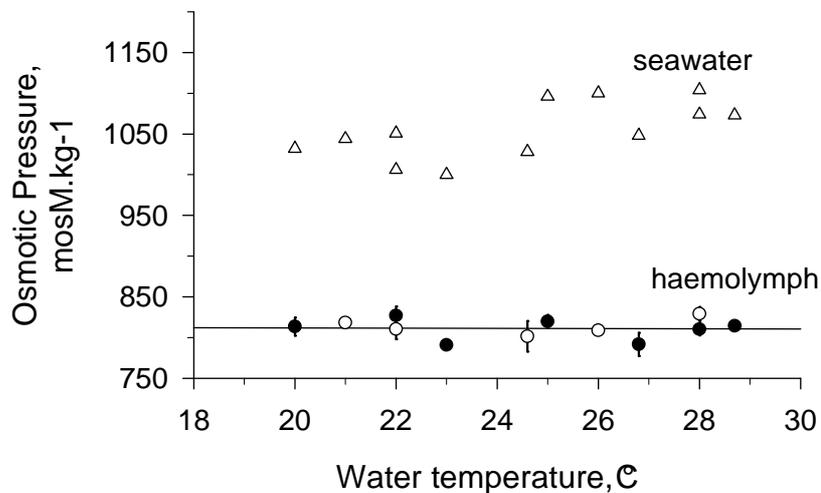
These experiments were performed in July and August on 18 *Litopenaeus stylirostris* weighing  $15.5 \pm 1.9$  g. The  $O_2$  consumption,  $\dot{M}O_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), was measured in an open-flow respirometer, volume 850 ml. The technique used was basically similar to that described by Massabuau et al. (1984). Its main features were (i) a rotor to ensure homogeneity in the system (the result being that the water exiting the chamber - whose composition was controlled - was closely representative of the water inspired by the prawn) and (ii) a laboratory-made automatic device continuously monitoring  $PO_2$  in the exit water. Inspired  $PO_2$  was maintained within a narrow range (15-18 kPa) independently of the  $\dot{M}O_2$  changes induced by the experimental conditions. For water-chemistry adaptation, each prawn was placed first in an open tank (35 L, renewal rate  $0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) with water equilibrated at  $T = 20$  or  $28^\circ\text{C}$  and  $PO_2 = 21$  kPa. During the period 9.00 to 9.30 am it was placed in the respirometer within 2-3 min (at time  $t_0$ ). Reference preprandial  $\dot{M}O_2$  measurement was determined during the following 1-2 days.

#### *Blood gas status: experimental protocol and blood sampling method*

Blood gas analyses were performed during the winter period (August – October) on 97 animals weighing  $36.6 \pm 0.5$  g, and in the summer period (April – March May) on 72 animals weighing  $19.6 \pm 0.2$  g. They were kept in 300 L tanks with water renewed at a rate of about  $2.4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Blood samples were collected by removing prawns from water and immediately puncturing them with capillary glass tubes equipped with a needle through (i) the cuticle at heart level for arterial sampling, and (ii) the ventral side of the cephalothorax, in the infrabranchial lacunae, for venous sampling (Figure 1). The arterial sample (100  $\mu\text{L}$ ) was obtained within the first 20-30 seconds of emersion and the venous sample (100  $\mu\text{L}$ ) within the first minute. With this technique, the arterial blood spontaneously enters the tube and heart



**Figure 2:** Annual temperature change (mean  $\pm$  1 SE; sampling period 2002-2005) in the outdoor experimental ponds of the Ifremer shrimp farm at St Vincent, New Caledonia. Ponds undergo a wide range of circannual changes.



**Figure 3:** Relationship between seawater and shrimp blood osmotic pressure (OP) as a function of seasonal water temperature changes in adult penaeid shrimps *L. stylirostris* at rest (close symbols: body mass,  $23.2 \pm 0.6$  g; open symbols,  $37.1 \pm 0.7$  g ; mean  $\pm$  1 SE). Adult shrimp blood OP is independent of water temperature.  $n = 5-10$  shrimps per data points.

beats are perfectly visible. This sampling technique was critically assessed in Forgue et al. (1992) and Massabuau and Forgue (1996). We applied it both in field and laboratory conditions. After sampling, blood was stored on ice and analysed within 1-5 min.

#### *Analysis of blood oxygenation status and osmotic pressure*

Arterial and venous PO<sub>2</sub> (kPa) were determined within 3 min on 100 µL samples using an E5046 Radiometer polarographic electrode thermostated at 22 or 28°C and equipped with a thin Radiometer head cover to reduce dead space. The electrode was calibrated with seawater equilibrated with O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> and air equilibrated seawater. The blood O<sub>2</sub> concentration (CO<sub>2</sub>, µmol·L<sup>-1</sup>) was determined using a modified Tucker chamber (Tucker 1967) thermostated at 37°C and calibrated with various volumes of normoxic distilled water (10-50 µL). Potassium cyanide (6 g·L<sup>-1</sup>) was used for releasing bound O<sub>2</sub> from hemocyanin (Bridges 1983). Finally, the blood O<sub>2</sub> capacitance (β<sub>a,v</sub>O<sub>2</sub>, µmol·L<sup>-1</sup>·kPa<sup>-1</sup>) was calculated for each individual from the simultaneous measurements of P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>, P<sub>v</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>O<sub>2</sub> and C<sub>v</sub>O<sub>2</sub> as  $\Delta C_{a,v}O_2 / \Delta P_{a,v}O_2$ .

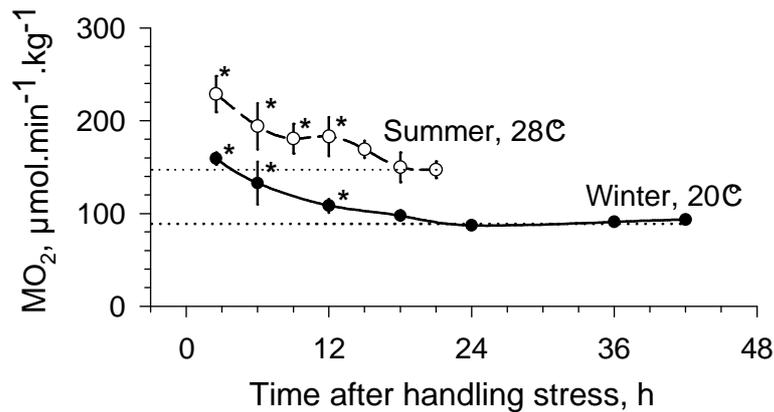
The osmolality (osmotic pressure) of the haemolymph and seawater was measured on 10 µl samples with a Wescor® vapor pressure osmometer, model 5520. The osmotic capacity is the difference between the osmotic pressure in the blood and the seawater (Charmantier et al. 1989). Osmotic pressure and capacity are expressed in mosm·kg<sup>-1</sup>.

#### *Statistics*

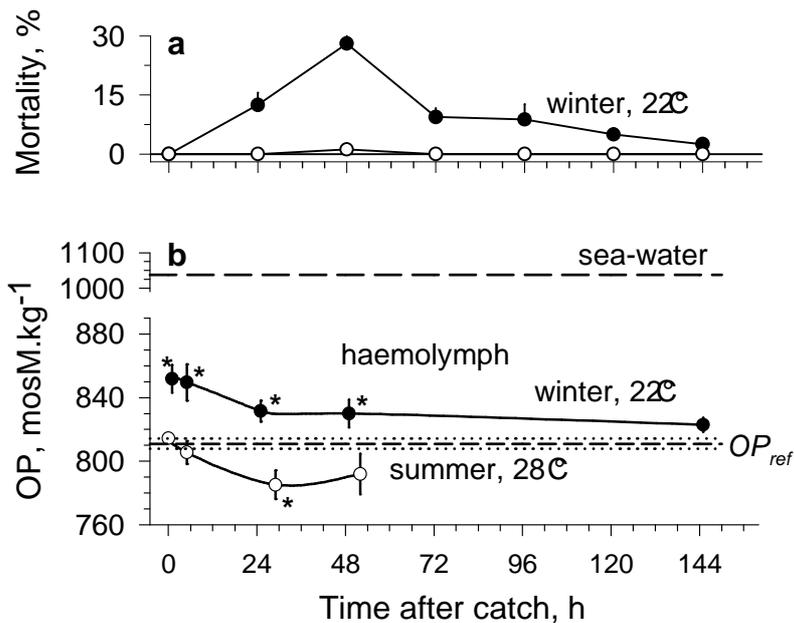
All data are presented as means ± 1 standard error (SE). Paired design *t*-tests were used to analyse changes in O<sub>2</sub>-consumption rates and blood O<sub>2</sub>-status. Otherwise, differences were evaluated using Mann-Whitney *U* test or Student *t*-tests. *P* < 0.05 was taken as the fiducial limit of significance.

## **RESULTS**

Figure 2 shows the temperature record during the experimental period in the rearing ponds. It shows maximum mean temperatures reaching ≈ 32°C during summer and minimum mean values of 19-20°C during winter. Superimposed on the circannual rhythm, short-term variations, occurring within 1-3 days, were recorded of between 2-5°C (data not shown). The relationship between steady-state blood osmotic pressure (OPb) and water temperature, measured at various seasons in *L. stylirostris*, is presented in figure 3, together with the water

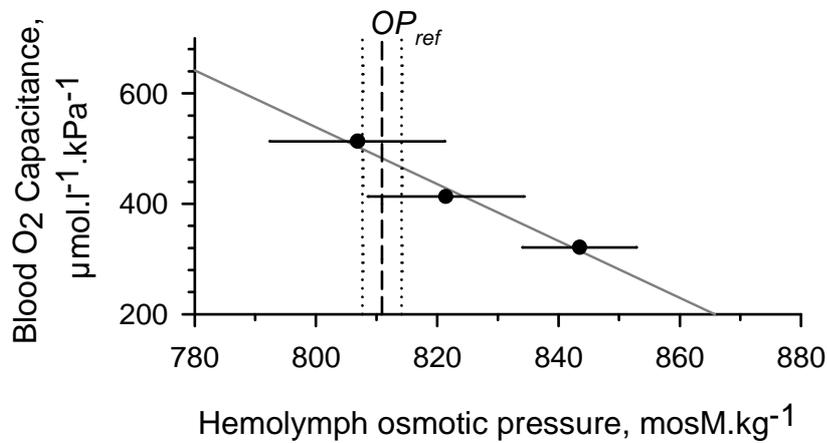


**Figure 4:** Time course of oxygen consumption change following fishing and handling stress (occurring at  $t_0$ ) in *L. stylirostris* at 20 (austral winter) and 28 °C (austral summer). At both temperatures, steady state values are reached within 24 h.  $n = 5-8$  shrimps per data points.

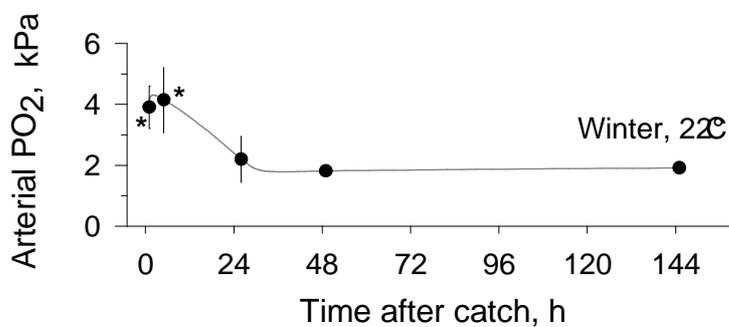


**Figure 5:** Time course of (a) mortality and (b) blood osmotic pressure (OP) changes following fishing and handling stress in *L. stylirostris* at 20 (austral winter, close symbols) and 28 °C (austral summer, open symbols). Net fishing and handling occurred at  $t_0$ . The responses are dramatically different at 22 and 28°C. A huge mortality occurs at 22°C, with a peak at + 48h, when OP is still significantly altered. Horizontal dashed line, steady state mean value ( $\pm 1$  SE) of osmotic pressure from Fig. 3.  $n = 5-11$  shrimps per data points.

osmotic pressure (OP<sub>w</sub>) at the sampling time. Importantly, note the global absence of any relationship between blood osmotic pressure and temperature in the range studied (OP<sub>b</sub> = -0.2 temperature + 815.2;  $r^2 = 1.56$ ). The mean osmotic pressure value in the blood was  $810.9 \pm 3.2 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$  for a mean OP in the water of  $1054.7 \pm 10.2 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ . To get a different insight into the influence of temperature we then studied the ability of the prawns to face the superimposed stress of being caught in a net and transferred from outdoor ponds into laboratory facilities, during either winter time (20-22°C) or summer time (28°C). Figure 4 shows the metabolic changes associated with such stress when it occurs at 28 and 20°C. It shows the time course before steady-state values were reached. Note that, independently of the temperature, this took 24 h. At 28 and 20°C, the resting O<sub>2</sub>-consumption values were respectively  $147.2 \pm 8.8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  (n = 5) and  $86.8 \pm 2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$  (n = 10). The corresponding Q<sub>10</sub> value between both conditions was 2.12. During these experiments many animals died at 20°C after measurements were taken, but not at 28°C, we therefore switched to analysing the time course of mortality, combining it with an analysis of osmoregulatory performances. Figure 5A confirms that indeed, net catching followed by transfer into laboratory facilities during winter, can of themselves have dramatic consequences. Indeed, in the example presented here, total mortality reached 66.3% during winter while it was only 1.2% during summer. What could be the underlying physiological explanation? To approach that question we first analysed the mortality time course and noted that it peaked 48h after net sampling, when O<sub>2</sub>-consumption has recovered and reached a steady state value (compare Fig. 5A and Fig. 4). Thus, an excessive increase in O<sub>2</sub>-demand induced by handling did not in itself appear to be a direct explanation. To go further, we then studied the magnitude and time course of the associated osmotic pressure change measured in the surviving animals (98% at 28°C and 33.2% at 22°C). Importantly, figure 5B shows that these two kinetics differed drastically either in terms of absolute values or speed of recovery. At 28°C, taking as a reference value the mean blood osmotic pressure presented in figure 3, OP<sub>b</sub> was only significantly different at t = 24h when it decreased from  $810.9 \pm 3.2 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $785.1 \pm 8.9 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ . At 22°C, the picture was drastically different: a large OP<sub>b</sub> increase, up to  $851.8 \pm 8.7 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}$ , was evident after 2 hours. Then, OP<sub>b</sub> remained significantly different from the reference value for more than 48h. A calculation based on a slope analysis from t<sub>0h</sub> to t<sub>2h</sub> shows that the speed of ion exchange was about  $40.9 \text{ mosm}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . As the 48 h mortality peak occurred when (i) the blood osmotic pressure was still high, and (ii) it is known that osmotic pressure changes influence blood O<sub>2</sub>-carrying capacity in crustaceans (Truchot



**Figure 6:** Relationship between blood O<sub>2</sub>-capacitance and omotic pressure in adult peneid shrimps *L. stylirostris* at 22°C at rest.  $n = 7$  animals per data point. Vertical dashed line, steady state mean value ( $\pm 1$  SE) of osmotic pressure from Fig. 3.  $n = 5-11$



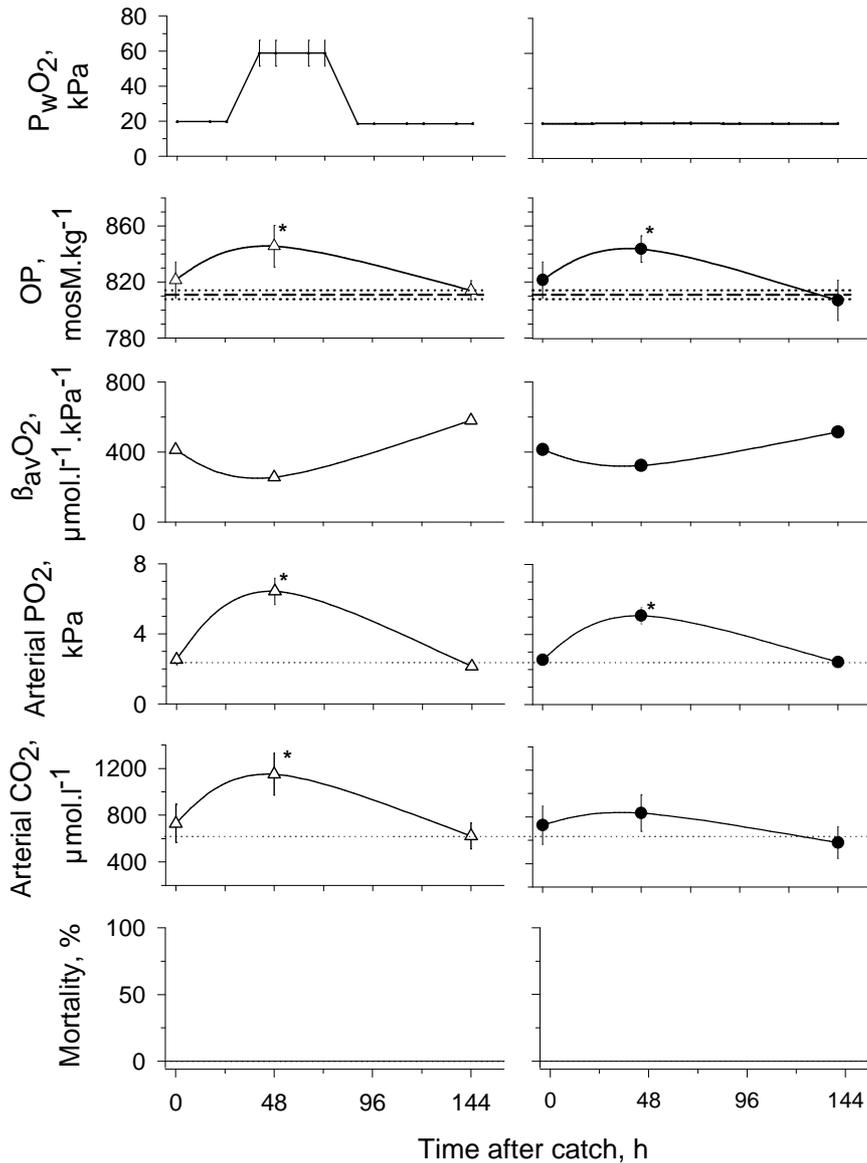
**Figure 7:** Time course of change in O<sub>2</sub> partial pressure, PO<sub>2</sub>, change in the arterial blood following fishing and handling stress in *L. stylirostris* at 22 °C. A low steady state value is attained following 24 h when mortality is peaking at + 48 h.  $n = 6-9$  shrimps per data points.

1992), we then studied the relationship between *in-vivo* blood O<sub>2</sub>-affinity and blood osmotic pressure in *L. stylirostris*. Figure 6 shows the extent to which blood O<sub>2</sub>-affinity decreases when osmotic pressure increases. The relationship between arterio-venous blood O<sub>2</sub> capacitance and osmotic pressure was:  $\text{blood}_{a-v} \text{O}_2 \text{ capacitance} = -5 \text{ OPb} + 4660$ ; ( $R^2 = 0.98$ ). Based on a theoretical point of view, such a decrease in blood O<sub>2</sub>-affinity occurring 48 h after handling could be compensated by a rise in arterial O<sub>2</sub> partial pressure to maintain a constant blood O<sub>2</sub> concentration and thus a constant O<sub>2</sub> carrying capacity. Consequently, we next addressed the issue regarding the change in blood arterial PO<sub>2</sub> following fishing and handling in *stylirostris*. Importantly, figure 7 shows that in *L. stylirostris* the arterial PO<sub>2</sub> did not increase at the time of maximum mortality (i.e. at + 48h): in fact, it returned to a low reference value of  $1.8 \pm 0.1$  kPa. This was the first argument to suggest strongly that the fragility of the species at 20-22°C during winter-time could be at least partially explained by a respiratory failure, initially induced by a temporary increase in blood osmotic pressure.

To test this hypothesis and the idea that an increase in arterial PO<sub>2</sub> could counterbalance the phenomenon, we then performed a transfer at 22°C but accompanied it with a temporary water hyper-oxygenation. Figure 8 (left-hand column) shows that under such conditions the arterial PO<sub>2</sub> rose from 2 to 6 kPa at + 48 h, while the arterial O<sub>2</sub> concentration rose from 600 to 1200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and mortality decreased dramatically. Interestingly, figure 8 (right-hand column) presents an experiment performed in normoxia at 22°C, during which the arterial PO<sub>2</sub> spontaneously rose during the transitory period following the transfer. Again, no mortality was observed.

## DISCUSSION

In this report, we have studied physiological changes occurring on the low edge of the thermopreferendum in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*. We present evidence that, following stress, they exhibit (i) an immediate increase in O<sub>2</sub>-consumption and O<sub>2</sub> partial pressure in their arterial blood which recovers within 24 h, and (ii) specifically at 20-22°C, a large increase in blood osmotic pressure compared with reference steady-state status. At 22°C, the alteration lasts for 2-6 days and is associated with a massive mortality occurring mainly after 2 days. Analysis of the kinetics shows that the increase in blood osmotic pressure reduces the animal's blood O<sub>2</sub>-affinity and blood O<sub>2</sub>-carrying capacity just when the partial pressure of oxygen in the arterial blood is back to its low reference value which is exactly in the range of the most frequently measured arterial PO<sub>2</sub> described in numerous water-breathing



**Figure 8:** Relationship between blood respiratory parameters and mortality following fishing and handling stress in *L. stylirostris* at 22°C, with either experimental (left-hand column) or spontaneous (right-hand column) improvement in blood oxygenation status. From top to bottom,  $P_{wO_2}$ ,  $O_2$  partial pressure in the ambient water, kPa; OP, blood osmotic pressure, mosm.kg<sup>-1</sup>;  $\beta_{avO_2}$ , arterio-venous blood  $O_2$ -capacitance, μmol.L<sup>-1</sup>.kPa<sup>-1</sup>;  $PaO_2$ ,  $O_2$  partial pressure in the arterial blood, kPa;  $CaO_2$ ,  $O_2$  concentration in the arterial blood, μmol.L<sup>-1</sup>; mortality, %. An improvement in blood  $O_2$  status during the 24-72 h period following fishing and handling dramatically limits mortality. Horizontal dashed line, steady state mean value ( $\pm 1$  SE) of osmotic pressure from Fig. 3.  $n = 7-10$  shrimps per data points.

animals *i.e.* 1-3 kPa (Cheng et al. 2003; Massabuau 2001; Massabuau and Forgue 1996). To test if the conjunction of the last two events played a key role in the morbidity process, we experimentally increased water oxygenation at that time to improve the blood O<sub>2</sub>-status. As this dramatically decreased mortality, we suggest that in penaeid prawns *L. stylirostris*, the specific action of low temperatures on ionoregulatory ability contributes to setting the geographical limits of this animal species through an impairment of their blood O<sub>2</sub>-carrying capacity. This shows an inability to successfully face very stressful situations (here, test fishing and handling) on the low edge of their thermopreferendum.

#### *Comparisons with data in the literature.*

Generally speaking, in the area of prawn farming, oxidative metabolism has often been measured in postlarvae and juveniles but few studies have concentrated on the adult animals. Table 1 summarises some of these results. Overall, the values obtained in this study, at 20°C, were similar with those of Spanopoulos-Hernandez (2005) for the same species and temperature. This oxidative metabolism was twice higher than data obtained for *P. japonicus* with the same technique at the low temperature of 18°C and were similar with some other species reported in the data at 25°C (*P. esculentus*, *P. californiensis*). *L. stylirostris* O<sub>2</sub> consumption at 28°C was clearly higher than other species except *X. kroyeri*. Figure 3 shows that in *L. stylirostris* O<sub>2</sub> consumption at 20 and 28°C as blood osmotic pressure (see Fig. 5) and oxygen partial pressure in the arterial blood (Fig. 7), increased from the very first measurements. Handling *L. stylirostris* therefore has a considerable and rapid effect (in the first minutes) on respiratory function. This question has recently been discussed by Steffensen (2002) in relation to measuring oxidative metabolism. Similarly, an overall recovery time of 6-8 days for returning to a stable physiological state is coherent with the observations of Massabuau and Forgue (1996) in the green crab *Carcinus maenas*. If we then compare our values with a selection of data representative of measurements in crustaceans and fish (table 2), we see that, overall, the metabolism rate of penaeids is among the highest, with *L. stylirostris* in particular presenting a much higher metabolism rate than the trout *Oncorhynchus mykiss* and the salmon *Salmo salar*, being comparable with yellowfin tuna. It is certain that such a level of demand for oxygen at cell level requires a perfectly functioning system of gas transfer from the blood. The choice of model and its exceptional metabolic rate clearly play a key role in revealing the mechanisms described in this study.

Finally, the low arterial blood PO<sub>2</sub> values reported in *Litopenaeus stylirostris*, despite their high O<sub>2</sub> consumption rates, are in close agreement with the low blood and tissue O<sub>2</sub>-strategy

**Table 1:** Routine metabolic rates of *Litopenaeus stylirostris* and other marine prawns (normoxia, salinity > 25 ‰).

Species	BW (g)	T (°C)	$\dot{M} O_2$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Authors
<i>Penaeus monodon</i>	10	25	120	Kurmaly et al. (1989)
<i>Penaeus duorarum</i>	9.66	25	100	Subrahmanyman (1976)
<i>Penaeus esculentus</i>	10	25	91.4	Dall and Smith (1986)
<i>Penaeus semisulcatus</i>	17.3	25	127.1	Kutty (1969)
<i>Penaeus californiensis</i>	10	25	94.5	Villarreal and Ocampo (1993)
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	10	25	148.5	Carvalho and Phan (1997)
<i>Penaeus japonicus</i>	29.2	18	38 ± 2.3	Wabete et al. (unpublished)
	11.8	25	90.5	Ergusa (1961)
	12.8	25	165	Kulkarni and Joshi (1980)
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	10	20	71.6	Spanopoulos-Hernandez (2005)
	10	30	117.7	Spanopoulos-Hernandez (2005)
	15.5	20	86.8 ± 2.8	This study
	15.5	28	147.2 ± 8.8	This study

**Table 2:** Routine metabolic rates ( $\dot{M} O_2$ , mean ± E.S.) of different aquatic species (normoxia, salinity > 25 ‰).

Species (currently name)	T (°C)	$\dot{M} O_2$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Authors
<b>Crustacean</b>			
<i>Astacus leptodactylus</i> (Crayfish)	13	13.8 ± 0.8	Massabuau and Burtin (1984)
<i>Homarus vulgaris</i> (Lobster)	15	16.4 ± 1.0	Butler et al. (1978)
<i>Carcinus maenas</i> (Green crab)	15	19.3 ± 1.1	Taylor and Butler (1978)
<b>Fish</b>			
<i>Silurus glanis</i> (Catfish)	13	15.4 ± 1.5	Forgue et al. (1989)
<i>Anguilla anguilla</i> (Eel)	18	25.6 ± 0.8	Le Moigne et al. (1986)
<i>Cyprinus carpio</i> (Carp)	15	27.8 ± 3.8	Ott et al. (1980)
<i>Tinca tinca</i> (Tench)	13	20.2 ± 1.2	Nonnotte (1981)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (trout)	15	44.6 ± 2.8	Ott et al. (1980)
<i>Salmo salar</i> (Salmon)	15	35.8 ± 1.8	Maxime et al. (1990)
<i>Thunnus albacares</i> (yellowfin tuna)	25	100 – 130	Korsmeyer et al. (1996)
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	20	86.8 ± 2.8	This study
	28	147.2 ± 8.8	This study

described in numerous poikilotherms, including fish, mollusks, crustaceans (Massabuau 2001 and 2003) and insects (Hetz and Bradley 2005). To sum up, the rationale for such a strategy has been discussed in the context of an evolutionary theory and in terms of equilibrium between physiological and pathological reactions associated with O<sub>2</sub> excess vs O<sub>2</sub> lack, plus emerging concepts about the importance of O<sub>2</sub>-dependent cell mechanisms in the low but physiological PO<sub>2</sub> range. Lastly, it demonstrates that even highly O<sub>2</sub>-demanding animals, with high cellular O<sub>2</sub>-requirements and O<sub>2</sub>-consumption, can work with low blood oxygenation levels. Until now, this had only been demonstrated in animals exhibiting a moderate to low oxidative metabolism (*Astacus leptodactylus*, Massabuau and Burtin 1984; *Silurus glanis*, Forgue et al. 1989; *Corbicula fluminea*, Tran et al. 2000; insect pupa of *Attacus atlas*, Hetz and Bradley 2005).

#### *Origin of the osmoregulatory imbalance following stress*

The use of osmoregulation disruption in crustaceans has been extensively reviewed and discussed by Lignot et al. (2000). Penaeid prawns are hyper-hypoosmoregulators (Charmantier-Daures et al. 1988) and their gills work at maintaining body salt concentrations against a significant inward gradient for diffusive salt entry. It is well known that these are the primary organ for salt transport in crustaceans, and that a full set of hormones exercises control over branchial transport processes (Kamemoto 1982; Charmantier et al. 1984; Mantel 1985; Péqueux and Gilles 1988; Eckhardt et al. 1994; Morris 2001). Among these hormones, CHH (Crustacean Hyperglycemic Hormone), has long been known as being characteristic of states of stress in these animals (see Chang 2005). It is synthesized in the eyestalk X-organs and stored in the sinus gland before being released into the blood. In fact, it has a multifunctional role (see Böcking et al. 2002; Chang 2005) and it has been shown to act on various physiological functions such as the secretion of digestive enzymes (Keller and Sedlmeier 1988) and the metabolism of lipids (Santos et al. 1997). Its liberation into the blood flow is stimulated during stress such as emersion, anoxia, salinity and temperature changes (Dean and Vernberg 1965; Keller and Orth 1990). In fact, short-term air exposure experiments have demonstrated that significant increases in CHH levels can be detected during the first 15 min of emersion (Webster 1996) which is typically the type of stimulus with which the prawns in our experiments were confronted. We therefore suggest that, through its role in osmoregulatory function, CHH lies behind the disturbances in osmotic pressure that we report here. As far as the mechanism that lies behind its action, it is interesting to note that analysis of the literature shows that an increase in blood CHH,



obtained experimentally by injecting eyestalk extracts containing purified or unpurified CHH (Spanings-Pierrot et al. 2000; Serrano et al. 2003), is associated with an increase in osmotic pressure (Kamemoto 1976; Charmantier et al. 1984; Mantel 1985; Charmantier-Daures et al. 1988 and 1994; Charmantier et al. 1989; Freire and McNamara 1992; Serrano et al. 2003). The increase in osmotic pressure observed in *L. stylirostris* after the stress they experienced in being fished and handled could therefore be perfectly coherent with an increase in circulating CHH, although of course this hypothesis remains to be verified.

#### *The cause of death: a proposal for the incipient mortality*

We have already seen that the point of departure in factors that could cause death in prawns naturally exposed to temperatures of 20-22°C in winter was an inability to maintain a low osmotic pressure in the blood when affected by considerable amounts of stress. In fact, we have shown that this increase in OP leads to a decrease in hemocyanin affinity in the prawn for oxygen following a classic Bohr effect (Truchot 1992). As we have shown that the mortality peak is observed at the moment when both the decrease in affinity is at its strongest and the oxygen partial pressure returns to its low reference level, it is clear that this is a critical period, for it is at this moment that the oxygen concentration in the blood is at its lowest. Since oxygen requirements remain high, the heart rate has to bear all the needs of the O<sub>2</sub> transport system via the circulation. The prawn could then ultimately die through circulatory failure.

#### *Suggestions to handle post-stressful situations in penaeid prawns*

These prawns, as is the case for many other species of penaeids, are farmed in many regions around the world and are therefore subjected to a great deal of handling. Our experiments suggest two main routes by which it should be possible to block, or at least to limit considerably the physiological problem of stress in these animals. Firstly, it is clear that handling will lead to a decrease in the animal's ability to maintain blood osmotic pressure at a stable level that is much lower than the osmotic pressure of the seawater in which it is living. Since it is impossible to eliminate the release of stress hormones (unless we consider decreasing the intensity and frequency of handling to limit the amount of hormones released into the blood), we suggest that we act on its effects on osmoregulation. To do this, clearly the first approach that we should consider is blocking the original phenomenon. Indeed, if the animals were placed in brackish water after stress, at around the isosmoticity point, then this would prevent the increase in blood osmotic pressure above a threshold value. This would



then block the impact of the increase in osmotic pressure on the oxygen affinity of hemocyanin by limiting the decrease in this affinity. For the same oxygen partial pressure in the arterial blood, the decrease in oxygen concentration would thus be less. This technique could therefore guarantee, in theory, that the blood oxyphoric capacity was maintained. The second approach is of course over-oxygenation of the water during the critical period, as we did during this study. Lastly, a third approach, starving the prawns, can be envisaged. The aim would be to avoid a post-prandial rise of O<sub>2</sub>-consumption and to manipulate the animal's blood acid-base balance status so as not to accentuate the decrease in the hemocyanin oxygen affinity. In the crab *Carcinus maenas*, in normoxic water, regulation of blood pH at a lower control value in post-prandial conditions than in pre-prandial conditions has been described (Legeay and Massabuau 1999). This acidification reduces the O<sub>2</sub>-affinity of hemocyanin. This change in control value has been interpreted as a mechanism to facilitate the release of oxygen at cell level at a moment when O<sub>2</sub> demand linked with the cost of protein syntheses, is very much increased, especially in the hepatopancreas (Mente et al. 2003). With regard to stress in the prawn, in this study we have seen that a decrease in affinity plays a key role in the question of mortality. There is therefore no point in providing food, which would be an additional source of decreasing the blood's oxygen affinity.

From a bio-technological point of view, it should be noted that the interest of these rearing techniques lies in the fact that they can be classed in the category of soft technology since they require only a manipulation of water salinity, which can be achieved by using a fresh water – seawater mixture and by withholding food. In terms of cost, the input is minimal. The addition of oxygen to the water should be considered as a further possibility, which could be used occasionally, to counterbalance the mechanism which decreases the oxyphoric capacity of the blood. It should also be noted that our results show that it is not necessary to use it during the entire post-stress period. Oxygen added during the window corresponding to the mortality peak should suffice. These suggested protocols still have to be tested on a large scale in order to test their relative effectiveness.

### *Conclusions*

In conclusion, the present data extends our knowledge of the underlying physiological mechanisms that contribute to determine the geographical distribution of penaeid prawns *L. stylirostris*. On the low edge of their thermopreferendum, when the animals are facing a strongly stressful situation, an osmoregulatory induced impairment of the blood O<sub>2</sub>-transport system is caused. Following handling stress, fatalities are frequent. Remarkably, they occur



when the animals do not spontaneously raise their  $O_2$  partial pressure in the blood but remain at the low resting arterial blood  $PO_2$  level characteristic of the low blood  $O_2$ -strategy (Massabuau 2001 and 2003; Massabuau and Soyez 2004). This therefore reinforces the idea that maintaining a low blood and tissue  $O_2$ -strategy is a fundamental, and powerful, drives in many, if not all, water-breathers. We see here a dramatic consequence of this ubiquitous characteristic.

*Acknowledgements:* We thank Pierrette Lemaire for her invaluable technical support and the technical staff of the experimental facilities at St Vincent, New-Caledonia for their help. All the experiments comply with the current laws of New Caledonia.



**REFERENCES**

- Böcking D, Dircksen H, Keller R (2002) The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: Structures and biological activities. In: K. Wiese (ed.) The crustacean nervous system. Springer, Berlin, pp 84–97
- Bridges CR (1983) PO<sub>2</sub> and oxygen content measurements in blood samples using polarographic oxygen sensor. In: Gnaiger E and Forstner H (eds) Polarographic Oxygen Sensors. Heidelberg: Springer, pp 219-233
- Butler PJ, Taylor EW, McMahon BR (1978) Respiratory and circulatory changes in the lobster (*Homarus vulgaris*) during long term exposure to moderate hypoxia. J Exp Biol 73: 131-146
- Carvalho PSM, Phan VN (1997) Oxygen consumption and ammonia excretion of *Xiphopenaeus kroyeri* Sëller (Penaeidae) in relation to mass temperature and experimental procedures, shrimp oxygen uptake and ammonia excretion. J Exp Mar Biol Ecol 209: 143–156
- Chang ES (2005) Stressed-out lobster: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins. Integr Comp Biol 45: 43-50
- Charmantier G, Charmantier-Daures M, Aiken DE (1984) Neuroendocrine control hydromineral regulation in the American lobster, *Homarus americanus* (H. Milne-Edwards, 1837) (Crustacea, Decapoda). Juveniles Gen Comp Endocrinol 54: 8-19
- Charmantier G, Bouaricha N, Charmantier-Daures M, Thuet P, Trilles J-P (1989) Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. European Aquaculture Society special Publication 10: 65-66.
- Charmantier-Daures M, Charmantier G, Van Deijnen J E, Van Herp F, Thuet P, Trilles J-P Aiken DE (1988) Isolement d'un facteur pédonculaire intervenant dans le contrôle neuroendocrine du métabolisme hydrominéral de *Homarus americanus* (Crustacea, Decapoda). Premiers résultats. C R Acad. Sci 307: 439-444
- Charmantier-Daures M, Thuet P, Charmantier G, Trilles J-P (1988) Tolérance à la salinité et osmorégulation chez les post-larves de *Penaeus japonicus* et *P. chinensis*. Effet de la température. Aquat. Living Ressour. 1: 267-276
- Charmantier-Daures M, Charmantier G, Janssen KPC, Aiken DE, Van Herp F (1994) Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult lobster *Homarus americanus*. Gen Comp Endocrinol 94: 281-293



- Cheng W, Liu C-H, Kuo C-M (2003) Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* 220: 843-856
- Dall W, Smith DM (1986). Oxygen consumption and ammoni-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture* 55: 23-33.
- Dean JM, Vernberg FJ (1965) Variations in the blood glucose level of crustacea. *Comp Biochem Physiol* 14: 29-34
- Drach P (1939) Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann Inst Oceanogr Paris* 19: 103-391
- Eckhardt E, Pierrot C, Thuet P, Van Herp F, Charmantier-Daures M, Trilles JP, Charmantier G (1995) Stimulation of osmoregulating process in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *Gen Comp Endocrinol* 99: 169-177
- Ergusa S (1961) Studies on the respiration of the kuruma prawns *Penaeus japonicus* (Bate). II. Preliminary experiments on its oxygen concentration. *Bull Japan Soc Scient Fish* 27: 650-659
- Forgue J, B Burtin, Massabuau J-C (1989) Maintenance of oxygen consumption in resting teleost *Silurus glanis* at various levels of oxygenation. *J Exp Biol* 143: 305-319
- Forgue J, Truchot J-P and Massabuau J-C (1992) Low arterial PO<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood O<sub>2</sub> affinity. *J Exp Biol* 170: 257-264
- Freire C, McNamara JC (1992). Involvement of the central nervous system in neuroendocrine mediation of osmotic and ionic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Gen Comp Endocrinol* 88: 316-327
- Hetz SK, Bradley TJ (2005) Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 233: 516-519
- Kamemoto FI (1976) Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod crustacea. *Am Zool* 16: 141-150
- Kamemoto FI (1982) Crustacean neuropeptides and osmoregulation. In: Farmer DS, Lederis K (eds) *Neurosecretion: Molecules, Cells, Systems*. Plenum, New-York, pp 329-335
- Keller R, Orth HP (1990) Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. *Prog Clin Biol Res* 342: 265-271



- Keller R, Sedlmeier D (1988) A metabolic hormone in crustaceans: the hyperglycemic neuropeptide. In: Laufer H, Downer R G H (eds) *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, vol. II. New York, pp 315-326
- Korsmeyer KE, Dewar H, Lai NC, Graham JB (1996) The aerobic capacity of tunas: adaptation for multiple metabolic demands. *Comp Biochem Physiol* 113A: 17-24
- Kulkarni GK, Joshi PK (1980) Some aspects of respiratory metabolism of penaeid prawn, *Penaeus japonicus* (Bate) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Hydrobiologia* 75: 27-32
- Kurmaly K, Yule AB, Jones DA (1989) Effects of body size and temperature on the metabolic rate of *Penaeus monodon*. *Mar Biol* 103: 25-30
- Kutty MN (1969). Oxygen consumption of the prawns *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) and *Penaeus semisulcatus* De Haan. *FAO Fish Rept* 57: 957-969
- Le Moigne J, Soulier P, Peyraud-Waitzenegger M, Peyraud C (1986) Cutaneous and gill O<sub>2</sub> uptake in the european eel (*Anguilla anguilla* L.) in relation to ambient PO<sub>2</sub>, 10-400 Torr. *Respir Physiol* 66: 341-354
- Legeay A, Massabuau J-C (1999) Blood oxygen requirement in resting crab *Carcinus maenas* 24 hours after feeding. *Canad J Zool* 77: 784-794
- Lignot JH, Spanings-Pierrot C, Charmantier G (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191: 209-245
- Mantel LH (1985) Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Amer Zool* 25: 253-263
- Massabuau JC (2001) From a low blood- to low tissue-oxygenation strategy, an evolutionary theory. *Respir Physiol* 128: 249-262
- Massabuau JC (2003) Primitive, and protective, our cellular oxygenation status? *Mech Ageing Develop* 124: 857-863
- Massabuau JC, Burtin B (1984) Regulation of the oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus*: role of the peripheral O<sub>2</sub> chemoreception. *J Comp Physiol B* 155: 43-49
- Massabuau J-C, Fougue J (1996) A field vs laboratory study of blood O<sub>2</sub>-status in normoxic crabs at different temperatures. *Canad J Zool* 74 (3): 423-430



- Massabuau JC, Soyez C (2004) La gestion du flux d'oxygène chez les animaux aquatiques. Application au cas des crevettes pénéidés. In: Ifremer (ed) Styli 2003: trente ans de crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Actes colloques (38), pp 66-74
- Maxime V, Peyraud-Waitzenegger M, Claireaux G, Peyraud C (1990) Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid-base status and O<sub>2</sub> affinity of haemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). J Comp Physiol B 160: 31-39
- Mente E, Legeay A, Houlihan D, Massabuau J-C (2003) Influence of oxygen partial pressures on protein synthesis in feeding crabs. Am J Physiol: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 284: R500 -R510
- Morris S (2001) Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. J Exp Biol 204: 979-989
- Nonotte G (1981) Cutaneous respiration in six freshwater teleost. Comp Biochem Physiol 70A: 541-543
- Ott ME, Heisler N, Ultsch GR (1980) A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. Comp Biochem Physiol 67A: 337-340
- Péqueux A, Gilles R (1988) NaCl transport in gills and related structures. In: R. Gregor (ed.) Comp Environ Physiol Vol 1, NaCl Transport in Epithelia. Springer-Verlag, Berlin, pp 2-73
- Pérez Farfante I, Kensley B (1997) Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Mémoires du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle, tome 175, 233p
- Prosser CL, Heath JE (1991) Temperature. In: Prosser CL (ed) Environmental and Metabolic Animal Physiology, Wiley-Liss, New-York, pp 109-165
- Santos EA, Nery LEM, Keller R, Goncalves AA (1997) Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. Physiol Zool 70: 415-420
- Serrano L, Blanvillain G, Soyez D, Charmantier G, Grousset E, Aujoulat F, Spanings-Pierrot C (2003) Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. J Exp Biol 206: 979-988
- Spanings-Pierrot C, Soyez D, Van Herp F, Gompel M, Skaret G, Grousset E, Charmantier G (2000) Involvement of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. Gen Comp Endocrinol 119: 340-350



- Spanopoulos-Hernandez M, Martinez-Palacios CA, Vanegaz-Perez RC, Rosas C, Rosse LG, (2005) The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture* 244: 341-348
- Steffensen JF (2002) Metabolic cold adaptation of polar fish based on measurements of aerobic oxygen consumption: fact or artefact? *Artefact! Comp Biochem Physiol* 132: 789-795
- Subrahmanya CB (1976) Tidal and diurnal rhythms of locomotory activity and oxygen consumption in the pink shrimp *Penaeus duorarum*. *Contr Mar Sci Univ Texas* 20: 123-132
- Taylor EW, Butler PJ (1978) Aquatic and aerial respiration of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15 °C. *J Comp. Physiol* 151: 185-190
- Tran D, Boudou A, Massabuau J-C (2000) Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Canad J Zool* 78: 2027-2036
- Truchot JP (1992) Respiratory function of arthropod hemocyanins. *Adv Comp Envir Physiol* 13: 377-404
- Tucker VA (1967) Method for oxygen content and dissociation curves on microliter blood samples. *J Appl Physiol* 23: 410-414
- Villarreal H, Ocampo L (1993) Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Comp Biochem Physiol* 106A: 97-101
- Webster SG (1996) Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J Exp Biol* 199:1579-1585



## Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* à 20 °C

N. Wabete, L. Chim, P. Lemaire, J.C. Massabuau

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Nelly.Wabete@ifremer.fr

### Résumé

En Nouvelle-Calédonie, les taux élevés de mortalité associés à une fragilité excessive des crevettes sont un problème majeur des élevages pendant l'hiver et les périodes de transition saisonnière. La conséquence de ce problème spécifique, qui se rajoute aux faibles taux de croissance en hiver, est un arrêt de la production pendant environ 3 mois, ce qui constitue un frein au développement de l'industrie. Le but de cette étude est de documenter quelques aspects des dérèglements physiologiques liés à une manipulation et un transfert rapide de crevettes vers des enceintes expérimentales maintenues à des températures comprises entre 20 et 28 °C. Des crevettes ont été pêchées dans un bassin d'élevage ( $T = 23-25$  °C) de la ferme expérimentale de Saint-Vincent (Nouvelle-Calédonie), entre septembre et octobre 2002, en utilisant une procédure standard, et transférées, dans un délai de 10 minutes, dans un bassin en béton extérieur ou en laboratoire dans des bacs en PVC à la même température. L'intensité du métabolisme aérobie, la capacité osmorégulatrice (CO) et la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel ( $PaO_2$ ) ont été mesurées en fonction du temps après la manipulation. Les résultats sont comparés aux données de référence obtenues au centre océanologique du Pacifique (Tahiti), où les conditions d'élevage sont extrêmement stables tout au long de l'année, avec des températures comprises entre 26 et 28 °C. Le métabolisme oxydatif de repos de *L. stylirostris* est exceptionnellement élevé. Les troubles majeurs associés à une manipulation sont une stimulation transitoire de ce métabolisme, une suroxygénation du sang et un effondrement de CO. Le phénomène se produit dans les premières heures (1 à 6 h). La chute de la capacité osmorégulatrice jusqu'à 160-170 mosm/kg est indépendante de la température et du site d'étude, ce qui suggère que la phase initiale de rupture est principalement liée au stress de la manipulation. La phase de récupération semble température dépendante : elle est de l'ordre de 6 à 7 jours à 20 °C et de 24 h à 28 °C à Tahiti. L'évolution de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel de *L. stylirostris* est comparable à ce qui avait déjà été rapporté pour le crabe vert *Carcinus maenas* suite à un transfert en laboratoire (Massabuau & Forgue, 1996) bien que, pour la crevette à 22 °C, le retour à des valeurs de 1-2 kPa soit réalisé en uniquement 30 heures. Pour référence, dans une eau équilibrée à l'air,  $PO_2 = 21$  kPa. La manipulation entraîne donc en hiver des perturbations physiologiques plus profondes que prévues qui pourraient expliquer partiellement l'exceptionnelle fragilité hivernale.

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

## Abstract

High mortality rates associated with excessive fragility are a severe problem in shrimp farms during winter and seasonal transition periods in New Caledonia. The consequence of this specific problem (associated with low winter growth rates), is a stop of production for about 3 months, which is a bottleneck for the development of the industry.

The aim of the present report was to document some aspects of the physiological disturbance and time constant involved, following standard catching test and rapid transfer of the shrimp from the pond to experimental tanks held at temperature ranging from 20-28°C. First, we showed that even at 20°C, their O<sub>2</sub>-consumption is exceptionally high and comparable to tuna. Second, shrimps (weighing 38 g) were caught in a pond (T = 23-25°C) of the experimental shrimp farm of St-Vincent (New Caledonia), from September to October 2002 using standard procedures and transferred within 10 minutes in either outdoor concrete tanks or indoor plastic tanks (20-28°C). Osmoregulatory Capacity (OC), partial pressure of oxygen (PO<sub>2</sub>) in the arterial blood and whole body water content were then measured as a function of time after fishing. Results are compared to reference data from the shrimp farm of Taravao, Tahiti, where temperature stays constant all year round (26-28 °C).

The major trouble associated to shrimp catch, either in Tahiti or New Caledonia, was a large change in OC associated to an outward water shift. Both phenomena occurred within the 1st hour of handling. The maximum drop was reached by one hour. The drop of OC was  $\approx 60$  mosm/kg and was independent of temperature change and field location, which suggests that the major drive was the initial stress itself. Importantly, the recovery was temperature dependent and took as long as 6-7 days at 20°C in comparison with 24 h in Tahiti at 28°C. Despite these costly ionoregulatory disturbances, the arterial PO<sub>2</sub> increased within the first hour but recovered at only 1-2 kPa by 30 h as previously described for the green crab *C. maenas* following transfer from the field to the laboratory (Massabuau & Forgue, 1996). For reference, PO<sub>2</sub> = 21 kPa in air-equilibrated water. Due to the low shrimp blood O<sub>2</sub>-carrying capacity and its excessively high O<sub>2</sub>-demand, the whole data set suggests an important heart work overload. It is concluded that handling represents a dramatic event with unexpected long-term physiological disturbances. It may partly explain excessive winter fragility.

## Introduction

La crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*, espèce cultivée en Nouvelle-Calédonie, est originaire du Pacifique. Son aire de répartition originelle va du nord du Mexique, où la température maximale peut atteindre 30 °C, au nord du Pérou où les minima passent rarement en dessous de 20 °C, ce qui illustre les limites thermiques de l'espèce. Dans les fermes de Nouvelle-Calédonie, c'est en 1993, à l'époque de la saison fraîche où les températures nocturnes peuvent être significativement inférieures à 20 °C, qu'une pathologie saisonnière à caractère épizootique a fait son apparition. Cette maladie, qui a reçu le nom de « Syndrome 93 » a été attribuée à une bactérie, *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998a). Les contraintes induites, principalement l'abandon des élevages de saison fraîche comme princi-

pale parade sanitaire, ont entraîné une baisse de la production néo-calédonienne. Le « Syndrome 93 », qui touche la majorité de la filière, est aujourd'hui un problème majeur à résoudre en termes de finalité économique et une piste centrale est l'aspect pathologie. La présence de *Vibrio penaeicida* (Mermoud *et al.*, 1998) toute l'année dans tous les élevages (y compris ceux où le syndrome ne se déclenche pas) et le synchronisme de son apparition aux saisons de fortes variations thermiques ont cependant conforté l'idée que la seule présence de la bactérie n'était pas suffisante pour rendre compte des mortalités. Un effort important a donc été fait par le laboratoire aquacole de Calédonie (LAC) à Saint-Vincent sur la description de l'état des bassins et leur gestion globale. L'observation a fait apparaître entre autres une forte relation entre le déclenchement du syndrome et le régime de température quand il atteint des minima en saison hivernale entre 18 et 22 °C. On sait maintenant que les périodes hivernales ainsi que d'entrée et de sortie de l'hiver cumulent les déficits dans les élevages, et qu'on assiste alors à une véritable « pénurie trophique » (Della Patrona *et al.*, en préparation). Cette « pénurie trophique », qui n'est pas compensée par l'aliment commercial, pourrait être à l'origine de carences nutritionnelles des animaux qui deviendraient ainsi plus sensibles au régime thermique typique de cette période (Chim *et al.*, 2001 ; Lemaire *et al.*, 2002).

D'un point de vue physiologique, ce qui caractérise certainement le plus les *L. stylirostris* sélectionnées pour l'aquaculture est une croissance rapide et une fragilité importante face aux stress. Un des buts de notre travail a été de caractériser les variations de leur niveau métabolique dans ces conditions et d'aborder les principes de la gestion des besoins en oxygène dans le cadre de la théorie des faibles niveaux d'oxygénation. L'idée globale est que *L. stylirostris*, avant et après un repas en normoxie et indépendamment de la température, devrait fonctionner avec des pressions partielles d'oxygène, PO<sub>2</sub>, dans le sang artériel exceptionnellement basses comme de très nombreux animaux aquatiques (≈ 1-2 kPa ; pour comparaison, PO<sub>2</sub> dans le sang artériel humain est 10-14 kPa et dans l'air ou dans une eau aérée, 21 kPa ; Massabuau, 2001, 2002). Le fonctionnement avec d'aussi faibles PO<sub>2</sub> dans le sang pose bien sûr de nombreux problèmes puisque les animaux qui suivent cette stratégie fonctionnent à la limite du seuil d'anaérobiose (0,7-0,8 kPa), c'est-à-dire du manque d'oxygène au niveau cellulaire (Forgue *et al.*, 1992 ; Legeay & Massabuau, 2000). Tout problème venant interférer avec les processus de transfert des gaz du milieu ambiant jusqu'à la cellule peut alors avoir des implications fatales.

Pour aborder ces problèmes, nous avons étudié les mécanismes mis en jeu au moment de la phase de rupture d'équilibre qui suit une manutention représentative de celles qu'on impose dans les fermes d'élevage. Nous avons, d'une part, étudié l'intensité et l'évolution du métabolisme après une manipulation de quelques minutes en laboratoire et, d'autre part, nous avons analysé les mécanismes de régulation des échanges ioniques et respiratoires suite à un transfert du terrain au laboratoire (Massabuau & Forgue, 1996). En Nouvelle-Calédonie, cet acte s'accompagne d'une très forte mortalité en hiver, atteignant un maximum après 2-3 jours. Le même geste est sans conséquence en été. Tout au long de ce travail, l'état des animaux à Tahiti est pris comme référence. Deux raisons expliquent ce choix. La première est que *L. stylirostris* produite en Nouvelle-Calédonie provient de la souche qui avait été d'abord implantée à Tahiti, où elle ne fait pas l'objet d'exploitation intensive. La seconde raison concerne les conditions d'élevage à Tahiti, extrêmement stables tout au long de l'année, sans variation notable de température en

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

dehors de la plage 26-28 °C. Les premiers résultats présentés ici font partie d'une thèse en cours (thèse Nelly Wabete).

### Matériel et méthodes

Les expériences rapportées ont été réalisées au LAC, laboratoire aquacole de Calédonie à Saint-Vincent (Nouvelle-Calédonie) à la fin de l'hiver 2002. Les animaux ( $38,5 \pm 0,6$  g) utilisés proviennent principalement des élevages extensifs de la station de Saint-Vincent (0,5 à 2 animaux par mètre carré, dans des bassins de 1 200 m<sup>2</sup>). Ces élevages sont exclusivement orientés vers la production de géniteurs. Des animaux juvéniles provenant de la ferme Sodacal ont également été utilisés. Le prélèvement des animaux dans les bassins était fait à l'épervier, ils étaient ensuite transférés au laboratoire dans des bailles en plastique d'environ 50 litres. Une fois au laboratoire, la destination des animaux était fonction de l'expérimentation ; ils étaient mis soit dans un bassin en béton (15 m<sup>3</sup>), soit dans des bacs en plastique (250 l) thermorégulés. Quel que soit le système de bac considéré, l'eau était oxygénée en continu par injection d'air surpressé. Au cours de cette phase de stabulation, les crevettes étaient nourries avec un aliment expérimental complet (farine de poisson et de crustacés, huile de poisson, blé, soja, vitamines, oligoéléments, gluten) à 5 % de leur biomasse totale.

### Analyses

**Détermination du stade de mue.** La détermination des stades de mue est basée sur les travaux de Drach & Tchernigovtzeff (1967). On observe, sous loupe binoculaire, la base des soies des écailles antennaires ou de l'uropode.

**Mesure de la consommation d'oxygène.** En bref, la consommation d'oxygène,  $\dot{M}O_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , rapportée au poids frais, PF), était mesurée dans un respiromètre en circuit ouvert ( $V = 850$  ml) placé sur une table antivibratoire. Un schéma de principe du dispositif est présenté dans la section Matériel et méthodes dans Massabuau *et al.* (1984). La chambre à métabolisme et l'électrode étaient maintenues à la température étudiée (18 ou 20 °C). La chambre était alimentée en continu (débit de renouvellement,  $V_w$ ) par une eau de mer saturée en oxygène par bullage d'air ( $PO_2 = 21$  kPa). Un système de vannes commandées à distance permettait de mesurer successivement la valeur de  $PO_2$  de l'eau entrant ( $P_{in} O_2$ ) et sortant ( $P_{out} O_2$ ) de la chambre du respiromètre et ainsi d'effectuer un étalonnage journalier de l'électrode. Une hélice ( $\varnothing 55$  mm, vitesse de rotation 1  $\text{tour}\cdot\text{sec}^{-1}$ ) assurait une homogénéisation au sein du respiromètre de telle sorte que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau sortant de la chambre soient les mêmes que celles de l'eau inspirée par l'animal. Ces valeurs étaient mesurées en continu par une électrode polarographique à oxygène. Cette électrode était reliée à un système informatique permettant l'enregistrement en continu de la valeur de  $PO_2$  par le logiciel SHRIMP (développé par Gaël Guillou et Hervé Chartois, Crema L'Houmeau, Ifremer-CNRS).

La consommation d'oxygène,  $\dot{M}O_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), était calculée en appliquant le principe de Fick à l'état stationnaire :

$$\dot{M}O_2 = V_w \cdot \alpha_{O_2} \cdot (P_{in} O_2 - P_{out} O_2)$$

**Prélèvements sanguins.** Les prélèvements de sang artériel (100 à 150  $\mu$ l), destinés à la mesure de  $PO_2$  artériel, étaient réalisés à l'aide d'un capillaire en verre équipé d'une aiguille hypodermique introduite dans la cavité cardiaque, directement à travers la cuticule. Le sang artériel monte alors spontanément et par à-coups dans le capillaire et l'observation de ces battements permet de vérifier l'origine artérielle du sang ponctionné. La fiabilité de cette technique a été discutée dans des publications antérieures (Forgue *et al.*, 1992; Massabuau & Forgue, 1996). Le sang veineux était ponctionné au niveau du sinus infrabranchial (sang prébranchial) à l'aide d'un second capillaire en verre que l'on piquait ventralement sous le céphalothorax au niveau de la première paire de pléopodes. Les temps de prélèvement (sortie de l'animal de l'eau sans perturber les congénères et prélèvement d'hémolymphe) n'excédaient pas la minute. Après le prélèvement, le capillaire était bouché et déposé sur la glace pour ralentir le métabolisme et les phénomènes de coagulation. Le début des analyses était effectué dans la minute qui suivait.

**Oxygénation du sang.** La  $PO_2$  artériel était déterminée dans les 3 minutes qui suivaient le prélèvement sur 100  $\mu$ l d'échantillon avec une électrode polarographique à oxygène (Radiometer E5046) thermostatée à la température des bacs d'élevage et de maintenance. L'électrode était préalablement étalonnée avec des solutions à  $PO_2 = 0$  et 21 kPa.

**Pression osmotique.** La mesure était effectuée au moyen d'un osmomètre Wescor 5520 à tension de vapeur. La capacité osmorégulatrice (CO) correspond à la différence entre la pression osmotique de l'hémolymphe et celle du milieu d'élevage (Charmantier *et al.*, 1989).

## Résultats

### Mesures de $O_2$ préprandial après une manipulation à 20 °C

L'évolution du métabolisme aérobie de *L. stylirostris* après une manipulation est caractérisée par des enregistrements très instables avec une alternance activité-repos présentant un rythme confus comme le montre l'enregistrement typique de la figure 1A. Les phases d'activité sont fréquentes, correspondant à un animal qui bouge constamment avec un métabolisme de repos difficile à appréhender. La figure 1B présente les valeurs moyennes obtenues chez les animaux en normoxie qui correspondent aux minima mesurés. On arrive à un plateau environ en 24 heures. La valeur moyenne de repos déterminée dans ces conditions est  $86,8 \pm 2,8$   $\mu$ mol/min/kg PF (n = 10 animaux). Dans les 2-3 premières heures après le transfert, elle atteignait  $163,7 \pm 10,2$   $\mu$ mol/min/kg PF. La figure 2 permet la comparaison avec une sélection de données représentatives de mesures publiées chez divers crustacés et poissons. On voit que, d'une façon globale, le métabolisme « de repos » mesuré chez *L. stylirostris* est parmi les plus élevés. Il est le double de celui de la truite *Oncorhynchus mykiss* et du saumon *Salmo salar* et se compare à celui de tunidés. Ces données confirment les mesures faites par C. Soyez au COP à Tahiti (voir Massabuau & Soyez, même volume) dans des conditions expérimentales comparables. Le métabolisme oxydatif de *L. stylirostris* est donc exceptionnellement important par rapport à celui des autres crustacés. Le phénomène est probablement à mettre en relation avec la croissance rapide de l'espèce.

Styli 2003 - Trente ans de crevetteculture en Nouvelle-Calédonie

### Dérèglement des échanges ioniques et respiratoires

Les figures 3A et 3B montrent l'évolution de la capacité osmorégulatrice (CO), et de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel (PaO<sub>2</sub>), d'animaux capturés à l'épervier en bassin d'élevage à t<sub>0</sub> (22 °C) et transférés en bac en béton de stabulation à la même température.

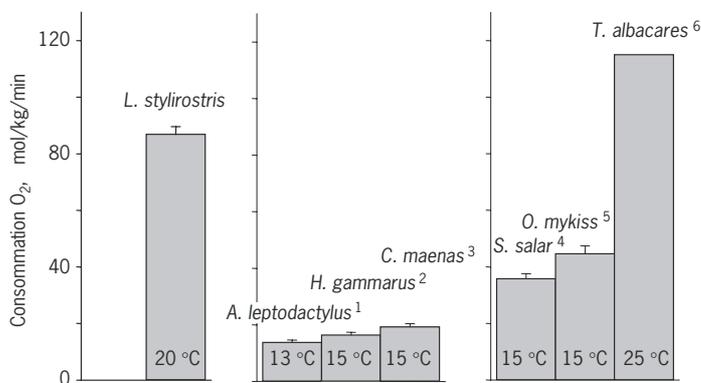
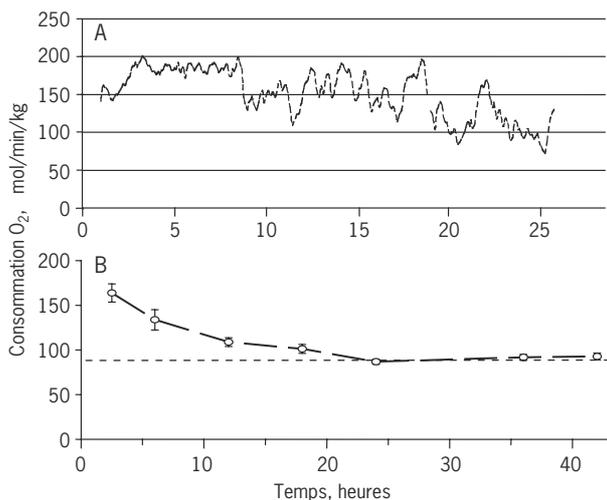


Figure 2 - Valeurs de consommation d'oxygène « au repos » (Mo<sub>2</sub>, moyenne ± 1 ES) chez quelques espèces d'animaux aquatiques (normoxie, salinité > 25 ‰).<sup>1</sup> Massabuau & Burtin, 1984; <sup>2</sup> Butler et al., 1978; <sup>3</sup> Taylor & Butler, 1978; <sup>4</sup> Maxime et al., 1990; <sup>5</sup> Ott et al., 1980; <sup>6</sup> Korsmeyer et al., 1996. La valeur chez *L. stylirostris* est supérieure à celles des salmonidés et approche celle de tunidés.

Les résultats de Nouvelle-Calédonie pour la CO (fig. 3A; symboles foncés) sont comparés à ceux des analyses réalisées en référence à Tahiti (symboles clairs; Lignot, 1995). Il est remarquable de constater que, dans les conditions « optimales » de Tahiti (à 28 °C), la chute de CO est de la même amplitude qu'en Nouvelle-Calédonie mais que la récupération liée au transfert est réalisée en 24 h alors que, dans les conditions hivernales néo-calédoniennes (20-22 °C), la perturbation se prolonge pendant 6-7 jours. L'évolution des valeurs moyennes de PO<sub>2</sub> artériel est présentée sur la figure 3B. Ces valeurs culminent à 4-5 kPa juste après la manipulation et

diminuent progressivement pour atteindre un niveau stable et faible à partir de 24 à 48 heures. La figure 4 présente les valeurs les plus fréquemment mesurées (correspondant aux modes) et leur distribution en fonction du temps. Elles sont, dès le début, dans la gamme 1-3 kPa mais on voit bien que la diminution de la moyenne observée sur la figure 3B correspond à la disparition des valeurs élevées. Le phénomène est caractéristique d'animaux perturbés, présentant une activité instable (voir l'enregistrement de la fig. 1A) et hyperventilant de façon transitoire avec des phases de repos. Il est intéressant de voir que ces perturbations de l'oxygénation du sang sont tout à fait comparables à celles qui avaient été rapportées chez le crabe *Carcinus maenas* à la suite d'une pêche et de transferts entre le bassin d'Arcachon et la station marine d'Arcachon (Massabuau & Forgue, 1996).

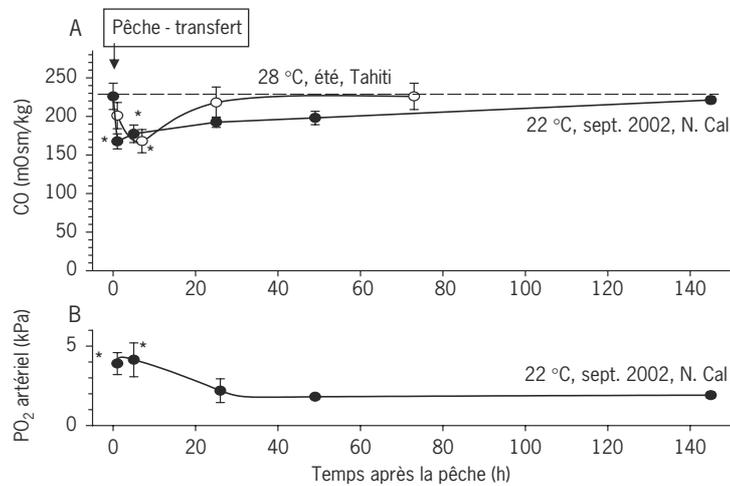


Figure 3 - Caractérisation du stress chez *L. stylirostris* en saison fraîche lors d'une pêche et d'un transfert à 22-23 °C en septembre (symboles noirs) et comparaison avec la référence de Tahiti à 28 °C (symboles clairs). (A) Impact sur la capacité osmorégulatrice et (B) sur la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel (moyenne ± 1 ES; n = 10-12 par point expérimental).

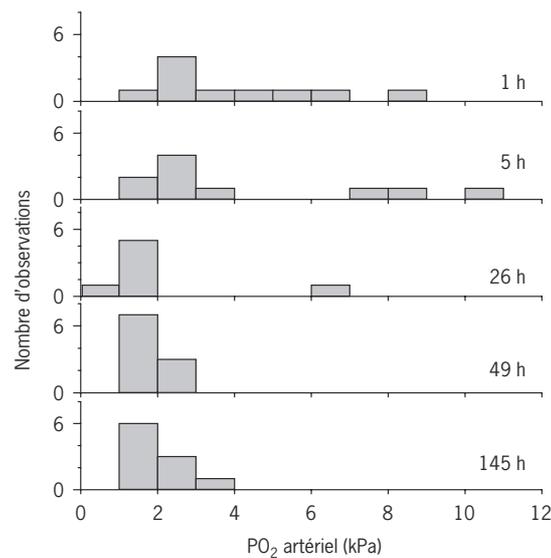


Figure 4  
Évolution de la distribution des valeurs de PO<sub>2</sub> dans le sang artériel de *L. stylirostris* après la pêche en bassin décrite sur la fig. 3. Transfert à 22-23 °C. La diminution des moyennes correspond à la disparition des valeurs les plus élevées. À comparer avec la cinétique décrite chez *Carcinus maenas* pour une manipulation semblable (Massabuau & Forgue, 1996).

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

## Discussion

Ce travail rapporte les résultats préliminaires d'une étude de physiologie respiratoire et des échanges ioniques sur les mécanismes de mortalité hivernale associés aux manipulations chez la crevette pénéide d'élevage, *Litopenaeus stylirostris*, implantée en Nouvelle-Calédonie depuis plus de 20 ans.

En bref, nous montrons que *L. stylirostris* a un métabolisme oxydatif de repos exceptionnellement élevé et comparable, lorsqu'il est exprimé par unité de poids, à celui d'un tunidé. Nous montrons, de plus, que toute manipulation du type pêche et transfert entraîne une forte stimulation du métabolisme, de profonds désordres de la balance hydrominérale et des changements significatifs de l'état d'oxygénation du sang qui prennent un à plusieurs jours pour être compensés. Ces résultats illustrent les perturbations physiologiques que subissent les animaux soumis à des perturbations liées à la manipulation et l'expérimentation en hiver. On sait qu'à cette période des mortalités très importantes accompagnent toute manipulation et transfert en Nouvelle-Calédonie. Par exemple, en ce qui concerne les mesures de métabolisme, nous montrons que, suite à une manipulation, le métabolisme est fortement stimulé pendant une période de 24 h avant d'atteindre un état stationnaire de repos dans nos conditions expérimentales. Pour bien évaluer l'importance du phénomène et la sensibilité des animaux, il est important de se rappeler que (i) l'aquarium de maintenance et le respiromètre étaient placés dans la même pièce et (ii) le temps de manipulation total était seulement de 1 à 3 minutes pour la mise en place des animaux. La manipulation agit donc de façon rapide (dès les premières minutes ou secondes) et importante. Cette question de la difficulté des mesures de métabolisme est peu discutée, car toujours embarrassante, mais a fait l'objet de revues occasionnelles (Herreid, 1980; Steffensen, 2002). Comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'évolution de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel observée est comparable à ce qui avait déjà été rapporté dans le cas d'un transfert laboratoire-terrain pour *Carcinus maenas* à Arcachon bien que, pour *L. stylirostris* à 22 °C, le retour à la normale soit réalisé en environ 30 h au lieu de 6 j à 15 °C pour *Carcinus*. Les causes de la différence sont bien sûr multiples. En plus de différences d'espèce et de température, il faut préciser qu'à Arcachon les crabes capturés par un pêcheur professionnel avaient fait un séjour à sec en chambre froide pendant environ 24 heures.

La chute initiale de capacité osmorégulatrice (pour rappel, l'animal régule une pression osmotique, PO, dans son sang largement inférieure à PO dans l'eau de mer et une chute de CO correspond donc à une diminution de  $\Delta PO$  entre eau et sang) correspond à une augmentation de la concentration ionique dans l'animal qui peut être expliquée par différents mécanismes. Elle peut être le résultat (1) d'une entrée nette d'ions ou (2), dans une optique dynamique, d'une entrée constante couplée à une extrusion qui aurait chuté. Par analogie avec des mécanismes qui ont déjà été décrits chez les poissons, le phénomène pourrait être consécutif à une décharge de type catécholaminergique associée au stress et agissant à la fois sur les perméabilités branchiales et le contrôle urinaire.

Nos travaux montrent que toutes les perturbations de la balance hydrominérale que nous venons de décrire se déroulent alors que la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel évolue de 4-5 kPa après la manipulation jusqu'à une valeur plus faible et sensiblement constante. Dès 26 h, la valeur la plus fréquemment

mesurée est alors en permanence dans la gamme 1-3 kPa. Cette observation suggère, vu les troubles de pression osmotique et les effets que l'on connaît sur l'affinité de l'hémocyanine chez les crustacés (une augmentation de PO sanguine est associée à une diminution de l'affinité du pigment respiratoire pour O<sub>2</sub>, voir Truchot, 1987), que la concentration d'O<sub>2</sub> dans le sang devrait diminuer. Le phénomène correspond à une diminution de la capacité de transport d'O<sub>2</sub> par le sang et devrait impliquer une augmentation potentielle du débit cardiaque qui pourrait éventuellement se conclure par un accident cardiaque. On aurait peut-être ici une partie de l'explication des mortalités à court terme en période hivernale lors des manipulations d'animaux.

#### **Application aux problèmes d'échantillonnage expérimental et de mortalité des pénéides en élevage**

L'ensemble des données présentées dans ce rapport montre donc l'impact insoupçonné, en termes d'amplitude et de durée (6-7 j), que peut prendre un geste qui pouvait paraître aussi anodin qu'une pêche et un transfert sur quelques centaines de mètres en hiver, et en quelques minutes, dans une ferme d'aquaculture. En termes pratiques, ce résultat devrait déjà intéresser la filière de production des animaux reproducteurs. En effet, une fois que les géniteurs ont atteint la taille de reproduction en bassin de terre, ils sont pêchés et transférés dans l'écloserie dans des conditions identiques à celles décrites pour nos expérimentations. Or, cette étude suggère deux choses qui nous paraissent dignes d'être considérées. La première est qu'en hiver le temps nécessaire à la récupération est excessivement long à 20 °C mais qu'un transfert dans un bac à 25-28 °C paraît favoriser une récupération rapide des animaux et diminuer les mortalités. La seconde est qu'après la pêche, si on considère le cas des femelles pubères par exemple, les perturbations rapportées sont parfaitement capables d'affecter la vitellogenèse secondaire, c'est-à-dire l'accumulation de vitellus exogène dans l'ovule. Des analyses complémentaires seraient bien sûr indispensables mais on peut sans doute d'ores et déjà reconsidérer la stimulation de la vitellogenèse et des pontes par épédonculation durant cette phase de récupération. On devine en tout cas clairement une partie de ce que doit entraîner cette manipulation classique sur leur physiologie.

**Méthode d'échantillonnage sanguin:** Du point de vue de la recherche et des expérimentations, nos résultats doivent clairement alerter sur les possibles biais des protocoles de mesure de l'état de stress des pénéides. Il est évident que le simple fait de manipuler l'animal, même avec le plus grand soin apparent, peut avoir un impact énorme sur sa réponse physiologique. De nombreuses analyses doivent être faites soit sur des prélèvements réalisés en quelques secondes, soit sur des animaux longuement acclimatés.

**Mortalité des pénéides en élevage:** Le Syndrome 93 qui atteint la Nouvelle-Calédonie se traduit par des mortalités importantes des élevages, regroupées en entrée et en sortie de saison froide. Ces périodes sont caractérisées par une descente importante de la température de l'eau et des variations nyctémérales importantes. Ces conditions particulièrement contraignantes, d'une part, affaiblissent l'animal qui n'arrive plus à maintenir son homéostasie ionique et, d'autre part, se traduisent notamment par un appauvrissement de l'apport trophique du bassin. L'ensemble de ces phénomènes est de toute évidence à l'origine de désordres du milieu d'élevage. Nos résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension

Styli 2003 - Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

sur l'affaiblissement de l'animal durant les saisons de transition (entrée et sortie de saison froide) qui le rendrait plus sensible au pathogène, le *Vibrio penaeicida*. L'affaiblissement de l'animal peut être relié à un effet direct des variations thermiques ou à un effet secondaire au travers d'un stress nutritionnel. En effet, c'est durant ces périodes que l'animal est le plus exposé aux carences nutritionnelles. Les capacités d'apport trophique sont appauvries dans les bassins alors qu'il y a une moindre capacité de la crevette à utiliser l'aliment et qu'on assiste à une augmentation des besoins en acides gras polyinsaturés en réponse aux températures hivernales (Galois, comm. pers.).

Face au Syndrome 93, la solution, qui ne saurait être que provisoire, employée par la filière à ce jour est d'arrêter la production durant ces périodes à haut risque. Cette solution a pour conséquence la concentration de toute la production sur un seul cycle d'élevage au lieu de deux cycles normalement. Le groupement de la production sur 8 mois de l'année est à l'origine d'une désorganisation des activités amont et aval se traduisant par des périodes d'engorgement au niveau des écloséries et de l'usine de conditionnement. Ces deux activités se retrouvent alors pratiquement à produire en flux tendu, ce qui ne permet aucune marge d'erreur. C'est dans une telle circonstance que des difficultés rencontrées en élevage larvaire au cours de l'année 2001 ont été à l'origine d'un manque à gagner de l'ordre de 200 tonnes de crevettes.

Les outils mis en œuvre au cours de cette étude nous permettent d'évaluer de façon reproductible l'état physiologique de l'animal, notamment, sa capacité de réponse à un stress envisagé sous l'angle de l'amplitude des dérégulations et du temps nécessaire de son retour à un niveau de référence. Le couplage de ces outils avec des recherches en nutrition devrait nous permettre de mieux évaluer les besoins nutritionnels exprimés par les crevettes lors de stress occasionnés par leur environnement d'élevage. À moyen terme, on devrait donc ainsi aboutir à une amélioration des pratiques en élevage qui passent également par l'amélioration d'aliments permettant d'augmenter la tolérance aux contraintes du milieu et la résistance aux pathogènes.

## Conclusion

Les forts niveaux métaboliques qu'on mesure chez *L. stylirostris* demandent dans l'absolu deux choses : au niveau environnemental, des conditions d'oxygénation optimales, une physico-chimie de l'eau stable (température, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, salinité) et un apport trophique adapté et varié ; au niveau cellulaire, une gestion optimisée des apports d'O<sub>2</sub>, de l'élimination de CO<sub>2</sub> et de ce qui apparaît aujourd'hui comme un des « déchets » du métabolisme oxydatif les plus toxiques, les radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species). Or, chez les poïkilothermes, tout changement de température est associé à des changements de métabolisme, d'état acide-base du sang, des capacités de transport des gaz du sang et de régulation des échanges ioniques. Dans ce contexte, il est clair qu'une meilleure connaissance des particularités physiologiques de l'espèce (et sa fragilité face à divers stress) est une piste qui devrait permettre de mieux comprendre les raisons de la fragilisation de l'animal aux périodes critiques de l'élevage et *in fine* de l'expression des *Vibrios*.

**Références bibliographiques (Wabete et al. 2004)**

- Butler, P.J., Taylor, E.W., McMahon, B.R. 1978. Respiratory and circulatory changes in the lobster (*Homarus vulgaris*) during long term exposure to moderate hypoxia. *J. Exp. Biol.* 73, 131-146.
- Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thouet, P., Trilles, J.-P. 1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of peneid shrimps. *Eur. Aquacult. Soc ; Spec. Publ.* 10, 65-66.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Lemoullac, G., Galois, R., Martin J.L.M. 2000. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeids prawns to environmental stress ? *Aquaculture Research* 32, 91-94.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legourmellec, M., Grimont, P. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164, 297-309.
- Della Patrona, L., Brun, P., Capo, S., Chim, L., Martin, J.L.M. Contribution de la productivité naturelle du milieu d'élevage à la production de la crevette *P. stylirostris* : influence de la saison et de quelques pratiques zootechniques, *en préparation*.
- Drach, P., Tchernifovtzeff, C. 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Forgue, J., Truchot, J.-P., Massabuau, J.-C., 1992. Low arterial PO<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood O<sub>2</sub> affinity. *J. Exp. Biol.*, 170, 257-264
- Herreid, C.F. II 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A: 311-320.
- Korsmeyer, K.E., Dewar, H., Lai, N.C., Graham, J.B. 1996. The aerobic capacity of tunas: adaptation for multiple metabolic demands. *Comp. Biochem. Physiol.* 113A (1), 17-24.
- Legeay, A. et Massabuau, J.-C. 2000. Effect of water salinity on resistance to hypoxia in resting green crab *Carcinus maenas* after feeding. *Marine Biol.* 136, 387-396
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.-A., Chim, L. 2002. Combined effects of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub-adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209, 307-317.
- Massabuau, J.-C., P. Dejours et Y. Sakakibara 1984. Ventilatory CO<sub>2</sub> drive in the crayfish: influence of oxygen consumption and water oxygenation. *J. Comp. Physiol. B* 154: 65-72.
- Massabuau, J.-C. 2002. Primitif, l'oxygénation de nos cellules ? *La Recherche*. 354: 48-51



- Massabuau, J.-C. et Forgue, J. 1996. A field vs laboratory study of blood O<sub>2</sub>-status in normoxic crabs at different temperatures. *Canad. J. Zool.* 74 (3): 423-430
- Massabuau, J.-C., Burtin, B. 1984. Regulation of the oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* : role of the peripheral O<sub>2</sub> chemoreception. *J. Comp. Physiol. B.* 155, 43-49.
- Massabuau, JC 2001. From a low blood- to low tissue-oxygenation strategy, an evolutionary theory. *Respir. Physiol.*, 128 (3) : 249-262
- Maxime, V., Peyraud-Waitzenegger, M., Claireaux, G., Peyraud, C. 1990. Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid-base status and O<sub>2</sub> affinity of haemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Physiol. B.* 160, 31-39.
- Mermoud, I., Costa, R., Ferre, O., Goarant, C., Haffner, P. 1998. "Syndrome 93 in New Caledonia outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164, 323-335.
- Ott, M.E., Heisler, N., Ultsch, G.R. 1980. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A, 337-340.
- Steffensen, J.F. 2002. Metabolic cold adaptation of polar fish based on measurements of aerobic oxygen consumption : fact or artefact? Artefact! *Comp. Biochem. Physiol.* 132, 789-795.
- Taylor, E.W. and Butler, P.J. 1978. Aquatic and aerial respiration of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15 °C. *J. Comp. Physiol.* 151, 185-190.
- Truchot, J..P. 1987. Comparative aspects of extracellular acid-base balance. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 248p.



## CONCLUSIONS

Les travaux présentés dans ce chapitre sont une analyse des mécanismes de mortalité des crevettes *L. stylirostris* qui surviennent lors des manipulations en période hivernale. Nous avons replacé cette problématique dans le cadre des limites d'un thermopreferendum chez les animaux aquatiques. Dans ce contexte de thermopreferendum, et alors que les animaux non perturbés (mais à la limite basse de leur plage thermique) ne meurent pas, l'acte de pêche-manipulation-transfert a été utilisée comme un outil permettant la mise en évidence d'une fragilité sous-jacente. Il est clair que cette fragilité, révélée par la manipulation, caractérise un état de faiblesse limite de l'animal qui ne peut que favoriser l'expression de toute pathologie rampante. Dans ce contexte, et alors qu'il est bien sûr irréaliste de vouloir manipuler la température en bassin, tout renforcement de l'état physiologique de la crevette est naturellement favorable. Un élément clé, comme par exemple l'apport d'un aliment approprié (qualité et quantité), pourrait donc être crucial et c'est pour cela que nous travaillons par ailleurs sur ce problème. Pour conclure sur ce plan zootechnique, on peut donc dire dans le cadre du syndrome 93 que l'élevage de crevettes *L. stylirostris* aux limites basses de son thermopreferendum prépare le lit de l'expression du vibrio.

Nos résultats montrent que suite à la manipulation, les animaux présentent une augmentation de la pression osmotique dans leur sang (diminution de la capacité osmorégulatrice) qui est couplé à une diminution transitoire de la capacité de transport de l'oxygène par l'hémocyanine. Cette diminution de capacité de transport est synchrone avec le retour « post-stress de manipulation » des pressions partielles d'oxygène aux valeurs basses réglées chez les animaux aquatiques. C'est le synchronisme de ces deux cinétiques qui à notre avis est la cause première des mortalités observées. En effet, la faible capacité oxyphorique du sang chez l'animal stressé implique une augmentation de son débit cardiaque pour continuer à alimenter les tissus en oxygène.

Nous avons testé cette hypothèse en manipulant l'oxygénation de l'eau de façon à forcer l'entrée d'oxygène dans l'animal afin d'obtenir une compensation à l'insuffisance respiratoire mise en évidence entre 24 et 72 h. L'hyperoxygénation de l'hémolymphe ainsi obtenue de 1-3 kPa aux environs de 5-6 kPa a pratiquement totalement aboli les mortalités observées. Nous avons également décrit une situation, exceptionnelle selon notre expérience



de terrain, où en sortie de période hivernale, les animaux ont spontanément présenté une suroxygénation du sang.

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre introductif, une fois que les animaux en bassin ont atteint la taille de reproduction, ils sont pêchés et transférés en écloserie dans des conditions identiques à celles décrites pour nos expérimentations. En hiver, les mortalités des géniteurs consécutives au stress de manipulation, peuvent alors être massives et représenter un réel problème économique pour l'écloserie.

En nous basant sur nos observations ainsi que sur les acquis de la littérature, nous avons proposé quatre stratégies pour contrecarrer ces phénomènes :

- réduire l'augmentation de la pression osmotique sanguine de façon à limiter à l'origine l'effet sur l'affinité du pigment respiratoire (nécessite des analyses complémentaires);
- interrompre l'apport d'aliment car en période post prandial, une acidification du sang a été rapportée chez le crabe (Legeay *et al.* 1999) ;
- élever la température afin d'accélérer les mécanismes de pompage ionique permettant de rétablir la pression osmotique originelle.
- et dans les cas extrêmes, une sur-oxygénation du milieu avec un mélange enrichi en oxygène pur (limitée à la période 24-48 h) pourrait être envisagée.

Nous avons testé les trois premiers protocoles, les plus accessibles techniquement, dans le chapitre suivant. Dans un premier temps, les expériences préliminaires ont été effectuées avec des animaux sub-adultes, puis avec des géniteurs, dans l'écloserie expérimentale du laboratoire. Le protocole ainsi défini a ensuite été appliqué en grandeur réelle, dans une écloserie commerciale.



**CHAPITRE V**

**DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE  
MANIPULATION DES GENITEURS DE  
*LITOPENAEUS STYLIROSTRIS***



**CHAPITRE V**  
**DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE**  
**MANIPULATION DES GENITEURS DE**  
***LITOPENAEUS STYLIROSTRIS***

**Introduction** ..... 239

**A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress.**

Nelly WABETE, Liet CHIM, Dominique PHAM, Pierrette LEMAIRE, Jean-Charles MASSABUAU  
(2006) Aquaculture (Accepté)..... 241

**Conclusion** ..... 281



## INTRODUCTION

Nous venons de voir dans le chapitre précédent que les processus de mortalité en période hivernale, lors des manipulations liées à la pêche et au transfert de bassins d'élevage au laboratoire (et/ou dans les locaux destinés à la reproduction artificielle des géniteurs), peuvent être expliqués par une diminution de la capacité oxyphorique du sang couplée à un retour des pressions partielles d'oxygène d'une valeur «stressée» à une valeur basse de repos. La concomitance de ces deux phénomènes aboutit à une diminution de la concentration sanguine d'O<sub>2</sub> qui implique, en toute hypothèse, une augmentation du débit cardiaque. In fine, la tachycardie qui en résulte devrait conduire à un accident cardiaque conduisant à la mort sinon à un profond affaiblissement de l'animal<sup>1</sup>.

Nous avons ainsi montré que la diminution de la capacité de transport d'oxygène par le sang était induite initialement par une augmentation de la pression osmotique sanguine. Nous avons conclu le chapitre précédent en proposant plusieurs protocoles, qu'on pourrait qualifier de «solutions douces» (dans le sens où, d'un point de vue zootechnique, elles n'impliquent pas l'utilisation de «médecines») pour contrecarrer le phénomène. Dans ce chapitre nous avons testé ces protocoles, soit isolément, soit en association.

Nous verrons que l'emploi raisonné et en synergie de ces solutions permet de réduire de façon drastique la mortalité lors de la manipulation des crevettes. Nous montrerons que nos solutions ont été appliquées avec le plus grand succès à des animaux aussi fragiles que des géniteurs et que l'application en ferme d'élevage est d'ores et déjà réalisée.

---

<sup>1</sup> Dans le cadre de cette thèse nous n'avons pas pu, faute de matériel disponible à St Vincent, tester cette hypothèse mais il est évident que c'est un travail qui devrait être mené prochainement.



**A soft technology to improve survival and reproductive performance of Litopenaeus stylirostris by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress.**

By

Nelly WABETE<sup>1,2</sup>, Liet CHIM<sup>1,\*</sup>, Dominique PHAM<sup>1</sup>, Pierrette LEMAIRE<sup>1</sup>,  
Jean-Charles MASSABUAU<sup>2</sup>.

(2006), Aquaculture, *Accepté*.

<sup>1</sup> IFREMER, Département d'Aquaculture en Calédonie, B.P. 2059, 98846  
Nouméa, New Caledonia.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques,  
UMR 5805. Université Bordeaux 1 and CNRS, Place du Dr B. Peyneau, 33120  
Arcachon, France.

\* Corresponding author. Tel.: +687 35 25 74; fax.: +687 35 11 77

E-mail addresses: [nwabete@ifremer.fr](mailto:nwabete@ifremer.fr) (N. Wabete), [lchim@ifremer.fr](mailto:lchim@ifremer.fr) (L. Chim).



## Abstract

The consequences of handling stress (fishing, transfer, eyestalk ablation) on shrimp broodstock are poorly documented. The weakness of farmed shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, during winter is a major problem in New Caledonia, because of seasonal climate (tropical-sub temperate). The transfer of broodstock in winter from earthen outdoor ponds to indoor maturation tanks in the hatchery (T = 20°C, Salinity = 35‰, fed shrimp) usually leads, after 48 hours, to high mortality (up to 70%). Eyestalk ablation to induce ovarian maturation in females leads to further mortality.

Starting from a background analysis of physiological disturbances (initial osmoregulatory imbalance) associated with handling stress (Wabete et al., 2004), we developed a protocol using a soft technology, based on modifications of water salinity, temperature and feeding regime. The aim was to minimize problems of osmoregulatory imbalance and associated mortalities. The protocol we developed, called the LSD OT protocol (Low Salinity and Diet, Optimal Temperature), was first evaluated on sub-adult shrimp (20-25 g) and then applied to broodstock. Survival after transfer and following eyestalk ablation, as well as reproductive achievement (spawning rate, nauplii number) was considerably improved when shrimps were transferred under "physiological comfort" i.e. warmed isosmotic water (26 °C and 26‰) and unfed for 3 days. This new handling protocol, based on a better control of salinity, temperature and feeding conditions, has been transferred successfully to private hatcheries and already contributes to an increased profitability of New-Caledonian shrimp industry.

Key words: Shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, broodstock, handling stress, spawning, eyestalk ablation.



## 1. Introduction

In 2004, New Caledonia produced 2,200 tonnes of top quality farmed shrimps. The whole caledonian production is based on a single species, Litopenaeus stylirostris, endemic to the Pacific coasts of Central and South America (from Mexico to northern Peru) (Pérez-Farfante and Kensley, 1997). The control of the complete life cycle (AQUACOP, 1979) and the development of specific rearing techniques (AQUACOP, 1983; Galinié, 1989) have allowed this introduced species' commercial farming since 1980.

After being reared in earthen ponds, broodstock are harvested and transferred to the hatchery where they are conditioned for reproduction (Galinié, 1989). The handling during transfer and eyestalk ablation of the females cause a high mortality rate, observed in all the hatcheries both in cold and hot seasons. Consequently, 20,000 broodstock shrimps (males and females) must be reared to obtain the 200 million post-larvae necessary to stock in the grow-out ponds.

Eyestalk ablation is carried out a few days after the shrimps' stocking into the hatchery, to induce ovarian maturation and spawning (Chamberlain and Lawrence, 1981; Ottogali et al., 1988). Each eyestalk contains a neuroendocrine complex that synthesises and secretes the Gonado Inhibiting Hormone (GIH) (Charniaux-Cotton, 1985). The removal of one source of GIH is sufficient to prevent the inhibition of vitellogenesis and trigger ovarian maturation. This ablation is obviously a stressful factor which affects many aspects of the animal's physiology including the immune system (Perazzolo et al., 2002) and can alter the survival of the broodstock (Browdy, 1992). In the shrimp Penaeus notialis, Rosas et al. (1993) reported that the stress caused by unilateral eyestalk ablation led to an increase in ventilatory activity and a decrease in oxidative metabolism.

The metabolic and physiological effects of the handling of crustaceans have been less studied. In L. stylirostris, osmotic homeostasis approximately equals  $810 \text{ mosM.kg}^{-1}$  when water temperatures are between 20 and 28 °C. Handling stress of the animal during transfer into a hatchery leads to disturbances in osmoregulation and oxygen transport from the gills to the tissues. In particular, a decrease in oxygen affinity of hemocyanin caused by an increase in osmotic blood pressure has been demonstrated, whereas partial oxygen pressure in the arterial blood remains stable. It has also been shown that shrimp transferred at 25-28 °C requires 24 h to recover its osmoregulatory capacity (OC), while in winter, at 22 °C, recovery time can be as long as 5 to 7 days (Wabete et al., 2004). These disturbances are associated with problems of oxygen supply which weaken the animals and could ultimately result in a heart attack.



A similar result has been described in the case of acid rain toxicity mechanisms and hydromineral disturbances induced in fish (Wood, 1989).

In this study, based on our analysis of ionoregulation problems caused by the handling of L. stylirostris (Wabete et al., 2004), we have perfected a protocol using a “soft” technology which could reduce the results of handling stress and the associated mortality. Our approach was based on adjustments to salinity, temperature and feeding regime. The protocol was tested in New Caledonia on sub-adult shrimps and broodstock in experimental and commercial hatcheries. The transfer conditions were evaluated according to the survival and the reproductive achievement of the broodstock: maturation of the females, fecundity and number of nauplii per spawn. As the problems associated with handling began with an imbalance in the ion exchange system, the idea was: (i) to manipulate water salinity in order to limit ion and water exchanges and the associated variations in blood pH (Truchot, 1987); (ii) to promote the functioning of ion exchange systems by returning to the optimal temperature for the species; (iii) to avoid feeding shrimps in order to limit oxygen requirements, to minimize use of gas transport system and transbranchial ion exchanges which ensure the acid-base regulation in the blood during post-prandial period (Legeay and Massabuau, 1999; 2000). The final protocol will be termed LSD OT for Low Salt and Diet, Optimal Temperature.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Facilities and material**

The maturation tanks were circular in shape and made in Scobalite® (fibreglass sheet 1 mm thick). Two sizes of tank were used: 4 metre diameter tanks for females and 3 metre diameter tanks for males. All the tanks were 1.25 m high and held 50 cm of water. The bottom of the tanks was covered by a lower layer of gravel separated by Bidim® (geotextile) from an upper layer of sand. The total thickness of the substrate was 8-10 cm. Each tank was supplied with sea water through a PVC tube (4 cm diameter) with a shutter. A PVC tube drain (9 cm diameter) fixed vertically in the centre of each tank determined the water's height. Water renewal was continuous, at a rate of 50% per day for females and 100% for males. Each tank was also equipped with an air-lift system connected to a circular network of PVC tubes buried in the lower sediment layer. With this system, the water circulated from top to bottom through the sand base which thus acts as a mechanical filter. Additional aeration was provided at the bottom of each tank by two high pressure air diffusers.



## 2.2. The shrimps

### 2.2.1 Rearing

For the elaboration of the new transfer protocol, the experiments on Litopenaeus stylirostris were carried out in two steps (i) firstly on sub-adult shrimps (average weight 20-25 g).and then on broodstock (45 to 75 g). The sub-adults shrimps were reared in earthen ponds (1,000m<sup>2</sup>) for four months, starting with 20-day post-larvae (P20) at density of 20 animals per m<sup>2</sup>. The rearing process of broodstock's production (Ottogalli et al., 1988) included two stages: (i) from the post-larval stage to an average weight of 20 g, the animals were reared at a density of 1-2 animals.m<sup>-2</sup> for 4 months, (ii) the 20 g shrimps were then transferred into another pond for a further 4 months at a lower density (0.5 per m<sup>2</sup>) while they reached their reproduction size (40 to 60 g).

During rearing period in ponds, animals were fed twice a day on commercial feed pellets. A fresh food supplement (chopped squid) was given once a week, during the second stage of broodstock's production.

### 2.2.2 Capture and transfer of the broodstock

At the end of the rearing period, the broodstock in the earthen ponds were caught with a cast net and transferred to 50-litre containers filled with seawater (10 animals / container). The oxygen in the transport water was maintained at saturation point with compressed air aerator powered by the tractor battery. In the hatchery, the animals were sorted by hand, according to sex, into the maturation tanks. As the water in these tanks came from the lagoon, it was at a temperature of about 21 °C in winter and 28 °C in summer.

In winter after the eyestalk ablation, the water temperature in the female tanks was gradually increased to reach 29°C by 1 to 2 °C a day with a heater (2,000 watts). The water in the male tanks was not thermo regulated.

As soon as they were transferred into the maturation tanks, the animals were fed twice a day (8am and 4pm) with fresh food (mussel, squid at 9% of shrimps biomass) and once a day (1pm) with a special commercial feed pellet (at 3% of shrimp biomass). The daily diet is adjusted on leftovers from the previous day

In the maturation room, the photoperiod (day/night: 14 h/10 h) was set from the first day: the spotlights above the tanks were switched on at 7pm and turned off at 9am. In the natural environment, spawning takes place at night, so adjustment of photoperiod permits the observation of spawning at the beginning of the afternoon.



### **2.2.3 Maturation, insemination, spawning and determining the number of nauplii per spawn.**

Four days after the animals were transferred to the hatchery, the females were fished out individually with a landing net to undergo unilateral eyestalk ablation (Ottogalli et al., 1988). To prevent haemorrhage, a wire ligature was used below the section. Once the operation was over, the animals were put back in their initial tank where in winter the water was then increased to 29 °C. This temperature was maintained throughout the production period (2 to 3 weeks). Eyestalk ablation triggers ovarian maturation and leads the shrimps to spawn.

Depending on the season, the first females ready to spawn were observed two to four days after eyestalk ablation. They are noticeable by their developed ovaries, orange/brown in colour, which are easily visible through the carapace along the dorsal part of the abdomen from the cephalothorax to the base of the telson. The state of gonad development was assessed every day by directing a light towards the animal in its tank. The mature females spawned between 11am and 2pm.

In *Litopenaeus stylirostris*, mating occurs a few hours before spawning. In the laboratory, the males and females were kept in separate tanks, and the females that were ready to spawn were inseminated manually one to two hours before spawning occurred. The spermatophores were extracted by a simple dorso-ventral pressure on the 5<sup>th</sup> pair of pereopods on the male. The sperm was then extracted from the spermatophore and spread, using forceps, on the thelycum (simple depression of the cuticle in the ventral area of the female) between the two last pair of pereopods. The inseminated females were then placed individually in calm (without aeration) and dark spawning tanks. A few hours after spawning, the females were transferred back to their original tanks.

## **2.3 Experimental protocols**

### **2.3.1 Determination of the broodstock isosmotic point.**

Experiments were carried out in January and April 2004. Shrimps were caught from an earthen pond (T = 26.8 °C; S = 36‰) and 6 to 7 animals were stocked in each 10 circular polyester tanks (1.20 diameter and 0.65m high, capacity 500 l). The tanks had been previously filled with filtered seawater (35‰). The water temperature throughout the experiment was  $26.7 \pm 0.4$  °C (mean  $\pm$  1 standard error). Females weighted  $45.5 \pm 0.7$  g (n = 36) and males,  $36.4 \pm 0.4$  g (n = 32).

Three days after transfer, water salinity was gradually reduced (5 ppt /day) by addition of fresh water to obtain a range of 5 salinities (35, 30, 25, 20 and 15‰), with 2 tanks per



salinity. The animals were kept unfed in these different environments for 24 hours before blood was sampled. Osmotic pressures were measured only on animals at the intermoult stage (stages C and D0; Drach and Tchernigovtzeff, 1967).

### 2.3.2 Experimental transfer of sub-adults (15 to 35 g)

Two preliminary experiments were carried out with sub-adult animals weighing 15 to 35 g in June 2003 (winter) and October 2003 (winter-summer transition period).

For the winter experimental transfer, 400 sub-adults weighting  $22.1 \pm 0.2$  g were transferred from the rearing pond into the hatchery at day 0 ( $d_0$ ) and distributed in batches of 100 shrimps into 4 maturation tanks. A specific treatment was applied to each tank: Control [35;21;F] (Salinity 35 ‰, ambient temperature 21 °C, F = feeding); [26;21;F] (Salinity 26‰, temperature 21 °C, feeding); [26;26;F] (Salinity 26‰, T = 26 °C, feeding) and [26;26;UF], called the LSD OT protocol or Low Salt and Diet, Optimal Temperature (Salinity 26‰, T = 26 °C, UF = unfed). The 26‰ salinity corresponds to the isosmotic point of sub-adult animals (Lemaire et al., 2002). In the first 3 treatments, the animals were fed a single food ration per day, 4% of the biomass, with commercial feed pellets divided into two meals (8am and 4pm). Mortalities were recorded twice a day (8am and 4pm) for 4 days after transfer ( $d_0$  to  $d_4$ ).

Based on the results of the previous experiment, we then tested the effect of the low salinity and diet (LSD) protocol on the consequences of eyestalk ablation in sub-adult females. The experiments were carried out in October 2003. Seventy-four females, average weight =  $26.4 \pm 0.3$  g, were fished at day 0 ( $d_0$ ) and sorted into 2 maturation tanks: one control tank (Salinity 35‰, ambient temperature, food) and one experimental tank for the LSD condition (Salinity 26‰, ambient temperature, no food). The average ambient temperature of tanks' water until  $d_5$  was  $24.8 \pm 1.3$  °C. Eyestalk ablation was practised at  $d_3$ . The LSD protocol was applied during 5 days ( $d_0$  to  $d_4$ ). At  $d_5$ , two days after eyestalk ablation of females, feeding was resumed and tanks' water was heated to reach  $28.5 \pm 0.5$  °C two days after ( $d_7$ ). At  $d_6$ , salinity was gradually increased to reach 35‰ at  $d_8$ . Mortality was monitored for 11 days ( $d_0$  to  $d_{11}$ ) after transfer.

### 2.3.3 Experimental transfers of the broodstock (45 to 75 g)

In September 2003 (winter), the LSD OT protocol was tested on broodstock survival after their transfer indoors. Then, 188 females ( $P_m = 68.0 \pm 1.2$  g) and 184 males ( $P_m = 51.9 \pm 0.6$  g) were harvested from earthen pond (salinity = 35‰, temperature = 21 °C), sorted by sex and transported in tanks containing pond water (35‰; 21°C) to maturation room.



Fifteen minutes after harvesting, shrimps were stocked in 6 maturation tanks ( $n = 60-65/\text{tank}$ ): 3 (diameter = 3 m) for males and 3 (diameter = 4 m) for females. One tank of males and one tank of females were used as controls (salinity and temperature identical to initial pond conditions). The LSD OT protocol was applied to the other four tanks from  $d_0$  to  $d_3$  with salinity gradually increased from 26 to 35‰ after  $d_4$ . On the fifth day ( $d_5$ ), the animals were fed and the water in the females' tanks was heated to  $28.1 \pm 0.7$  °C at  $d_8$  when the females underwent eyestalk ablation. After fishing, the blood osmolality of the unfed shrimps in intermoult stage was measured at 15 min (just before repartition in maturation tanks), 4 h after stocking and then, every 24 h until 120 h ( $d_5$ ).

In July 2004, the experiment was repeated to check the reproducibility of our technology during broodstock transfer, and to test the LSD OT protocol on survival rate after eyestalk ablation and on reproduction achievement of females. This experiment was carried out on 300 females, average weight  $51.9 \pm 0.4$  g, in 4 tanks (4 m diameter, density  $5/\text{m}^2$ ) and 268 males (average weight  $41.9 \pm 0.3$  g) in 4 tanks (3 m diameter, density  $8.5/\text{m}^2$ ). The LSD OT protocol was applied from  $d_0$  to  $d_4$  (2 tanks per sex) with a gradual increase in salinity from 26 to 35‰ from  $d_5$ . After eyestalk ablation (practised on  $d_4$ ), the water in the female tanks was heated to 28 °C. Then, the females ready to spawn were monitored for each treatment. After artificial insemination of the mature females, the spawn was collected, the number of eggs and nauplii per female were determined. Moreover, the number of dead shrimps was recorded twice a day (8am and 4pm) until 144h ( $d_6$ ).

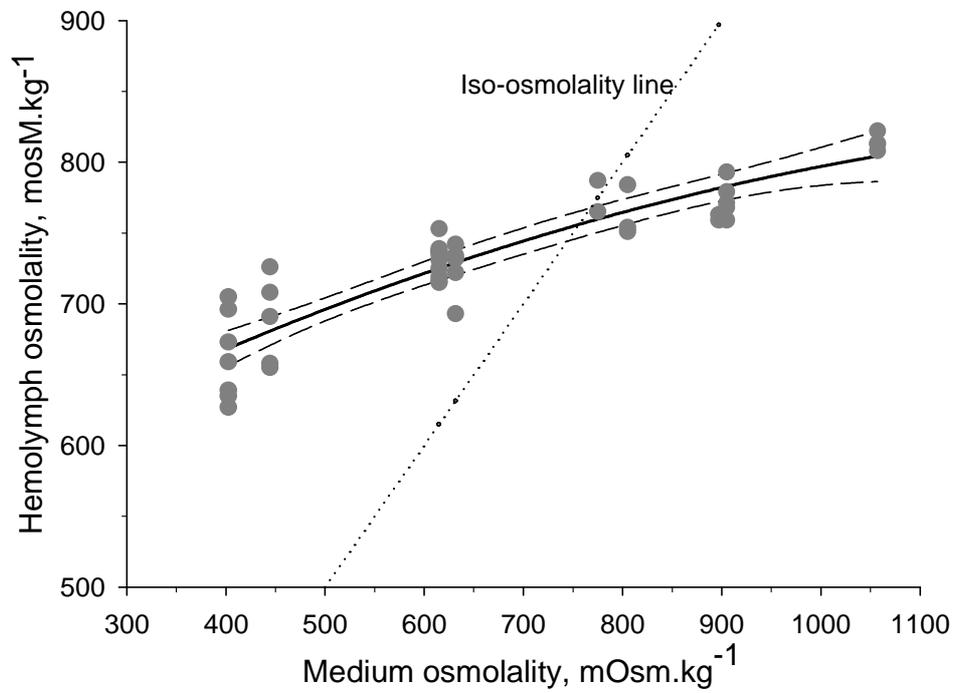
### 2.3.4 Analysis

**Determination of moult stage.** Molting stages were determined by microscopical examination of antennal scales according to the method of Drach and Tchernigovtzeff (1967).

**Haemolymph sampling.** Blood was sampled (50µl) using a glass capillary with a hypodermic needle introduced into the cardiac cavity. The arterial blood then rise spontaneously in spurts into the capillary, and observation of these beats certifies arterial origin (Forgue et al., 1992; Massabuau and Forgue, 1996).

**Osmotic pressure.** The measuring device used was a Wescor®, model 5520, osmometer with a 10 µl sample on a 6.35 mm diameter filter paper. The blood and the tank water osmolality were expressed in  $\text{mosM.kg}^{-1}$ . Lemaire et al. (2002) had previously determined the linear function linking salinity expressed in ppt and in  $\text{mosM.kg}^{-1}$ . This function is described in the following equation:

$$y = 28.939x - 23.103,$$



**Figure 1:** Haemolymph Osmolality as a function of the tank water osmolality ( $T = 26.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ) for *L. stylirostris* broodstock ( $40.4 \pm 1.5$  g). The continuous and dotted lines correspond to hyper then hypo-osmotic regulation (dashes: confidence interval at 95%) and to the iso-osmolality line respectively. The intersection of the two gives the isosmotic point:  $756 \text{ mosM.kg}^{-1}$  (26.9%).

where  $x$  and  $y$  are the salinity expressed in ppt and in mosM.kg<sup>-1</sup>, respectively.

**Monitoring the spawning** – After eyestalk ablation and until the end of the experiment, the females that were ready to spawn were monitored and systematically inseminated before being placed individually into the spawning tanks. Cumulative spawning (CS in %) can be calculated using the following formula :

$$CS = \left( \sum_{i=0}^n \frac{P_i}{F_i} \right) * 100,$$

where  $i$  = day  $i$ ;  $F_i$  = number of females on day  $i$ ;  $P_i$  = number of spawns on day  $i$ .

The daily average spawning (DS in %) can be calculated using the following formula:

$$DS = \frac{CS}{d_n},$$

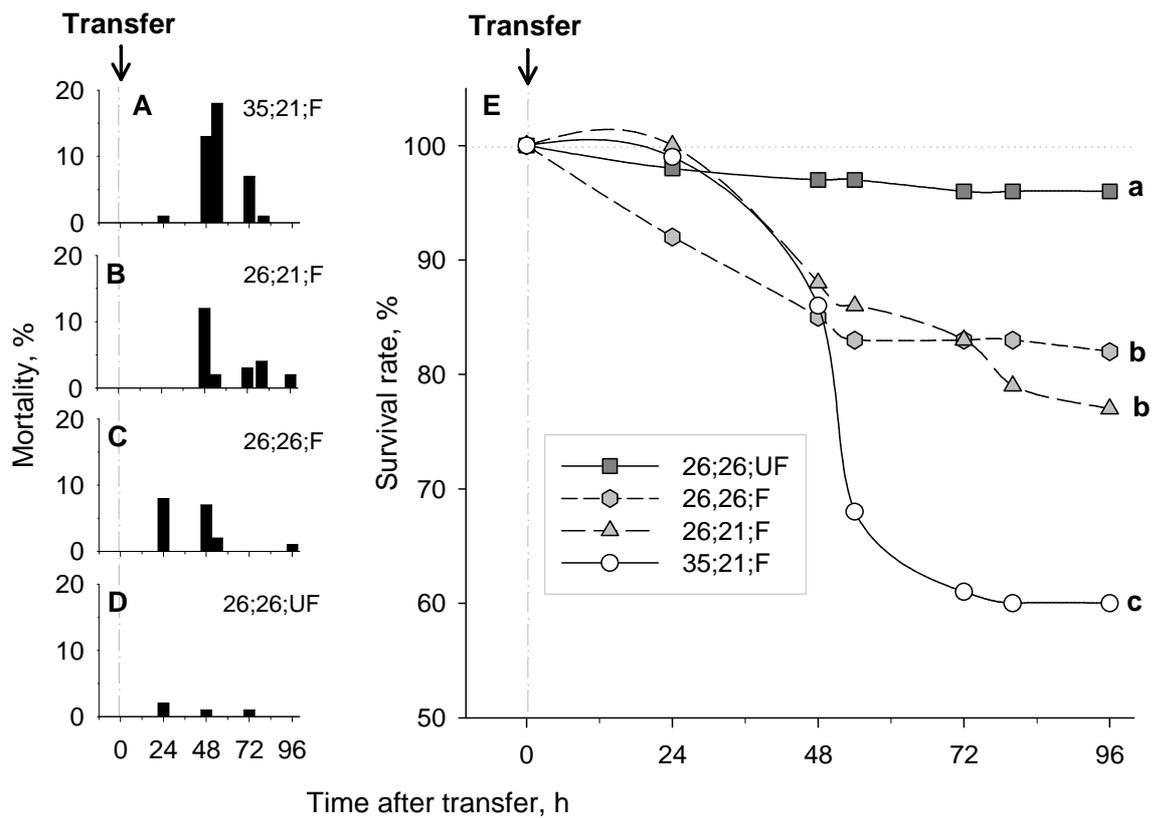
where  $d_n$  = number of days since eyestalk ablation.

**Number of nauplii per spawn.** The day after spawning, the number of nauplii was determined for each spawn. Each spawn was collected, by draining the spawning tank over a 100  $\mu$ m filter, and then poured in a 10-litre bucket. After manual mixing, a volumetric count of the nauplii was done from 2 samples of 1 ml each.

**Determination of spawning rank.** After spawning, the females were tagged and returned to their maturation tank. Tagging was carried out by injecting coloured elastomer (Northwest Marine Technology) under the cuticle of the abdomen; the number and rank of spawns for each female could thus be determined.

## 2.4 Production results at the hatcheries.

The application of the LSD OT protocol to a large scale production was studied by a statistical analysis of the data from Saint-Vincent experimental hatchery (Ifremer) and from a commercial hatchery in northern New Caledonia, “Ecloserie du Nord” (EDN), (BP 16, 98860 - Koné). This study was carried out in Saint-Vincent hatchery on 87 production batches of broodstock in standard conditions (summer,  $n = 45$ ; winter,  $n = 42$ ) and on 24 production batches ( $n = 12$  for each season) using the new protocol. For the commercial hatchery, data from 21 batches were analysed, between 2001 and 2004, before and after the application of LSD OT protocol. The first 14 batches (2001 to 2003), managed according to standard procedure, were made of 8 summer productions and 6 winter productions. The last seven batches (2003 and 2004, 4 during summer and 3 during winter) were carried out with broodstock transferred according to the LSD OT protocol.



**Figure 2:** Mortality after transfer from outdoor pond into tanks in the hatchery according to treatment: **A**, 35‰, 21°C, fed from the first day (Control); **B**, 26‰, 21°C, fed; **C**, 26‰, 26°C, fed; **D**, 26‰, 26°C, unfed. **E**: cumulative survival rate after transfer according to treatment. Sub-adults (mean BW = 22.3 ± 1.5 g). Significant differences at 96 h ( $p < 0.01$ ) among treatments after  $\chi^2$  test are followed by different small letters

The experimental Saint-Vincent hatchery does not produce post-larvae for sale. The shrimps are produced solely for genetic or experimental research (physiology, nutrition and pathology studies). For our experiments, all the mature females were inseminated and allowed to spawn, regardless of the requirements for larval rearing .

## 2.5 Statistical analyses

The data are presented in individual values, frequency histograms and/or average values  $\pm 1$  standard error (SE). Statistical analysis of the data was carried out using StatView® V5 software (SAS Institute Inc.). Survival rates were compared according to treatment using the  $\chi^2$  test. Osmotic pressure and reproduction performance indexes were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) or Student test. A square root Arcsin transformation was used before processing percentage data. A significant difference was admitted for  $p < 0.05$ .

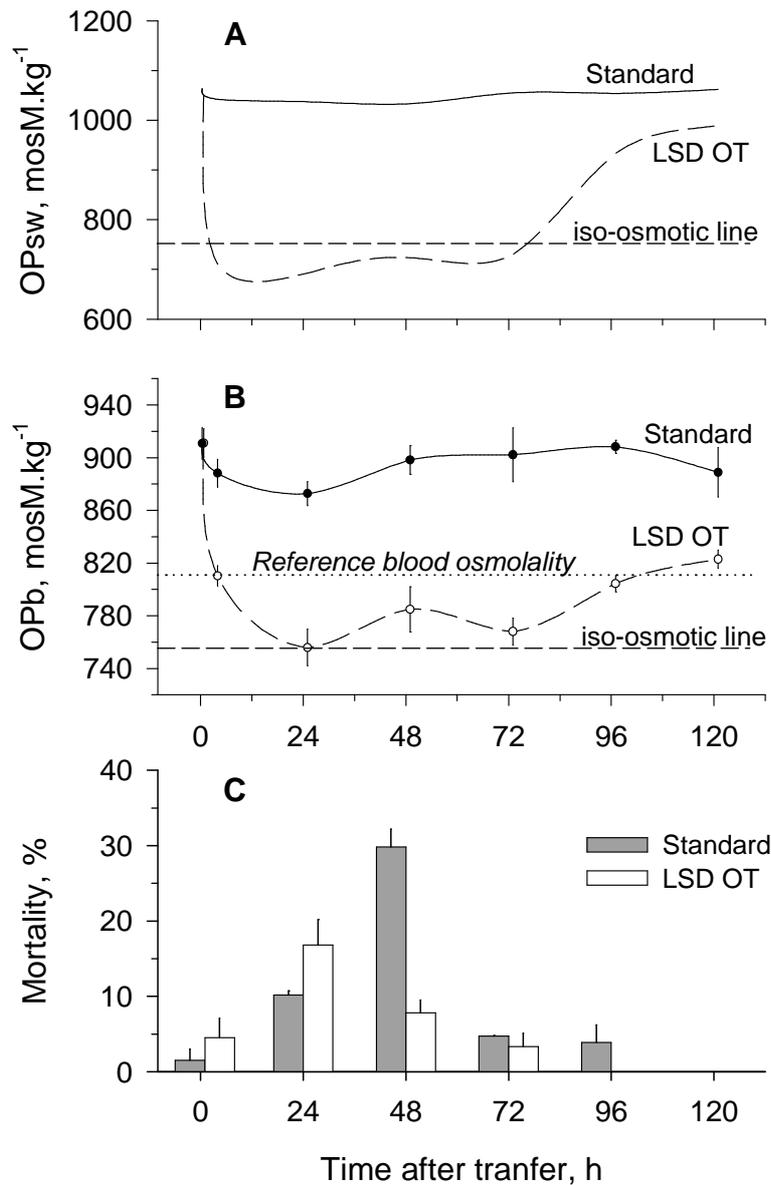
## 3. Results

### 3.1. Iso-osmotic point of the broodstock shrimps

Variations in blood osmotic pressure (OP) according to tank water OP are presented in figure 1. Since no difference was observed regarding the sex of the animals, all data are pooled. The hyper-hyporegulation polynomial curve ( $y = -1.32x^2 + 0.4x + 529$ ) intersects the iso-osmolality line at the isosmotic point of  $756 \text{ mosM.kg}^{-1}$  (salinity of 26.9‰). Below this point, broodstock shrimp hyper-regulates its blood osmolality and above this value, animal hypo-regulates.

### 3.2. Influence of water quality on mortality caused by the transfer into hatchery

**Sub-adult shrimps.** After capture from earthen pond (salinity 35‰; temperature 21 °C) and transfer into indoor tanks, the evolution of mortality rates was function of physico-chemical conditions in tanks (Fig. 2). In the control batch subjected to the usual technique [35‰; 21 °C; Fed] (Fig. 2A), mortalities appeared 48-72 h after transfer, with a peak at 48 h (13%) and 54 h (18%). This mortality at 48-54h was reduced to 12 and 2% by a decrease of water salinity to 26‰ (near isosmotic point) (Fig. 2B) and to 7 and 2% if tank's water was also heated (Fig. 2C). Finally the best results were obtained when shrimps are transferred into isotonic water at 26 °C and kept unfed ([26;26;UF], LSD OT protocol) since mortality at 48 h



**Figure 3:** (A) Tank water salinity change, (B) haemolymph osmolality (PO, mean  $\pm$  1 ES; n = 6-8), and (C) mortality rate after transfer of the *L. stylirostris* broodstock (mean BW = 59.8  $\pm$  9.3 g) into the hatchery under standard (—) and experimental LSD OT (-·-) conditions. (- - -) salinity of isotonic water. Reference blood osmolality determined for this species by Wabete et al. (in preparation).

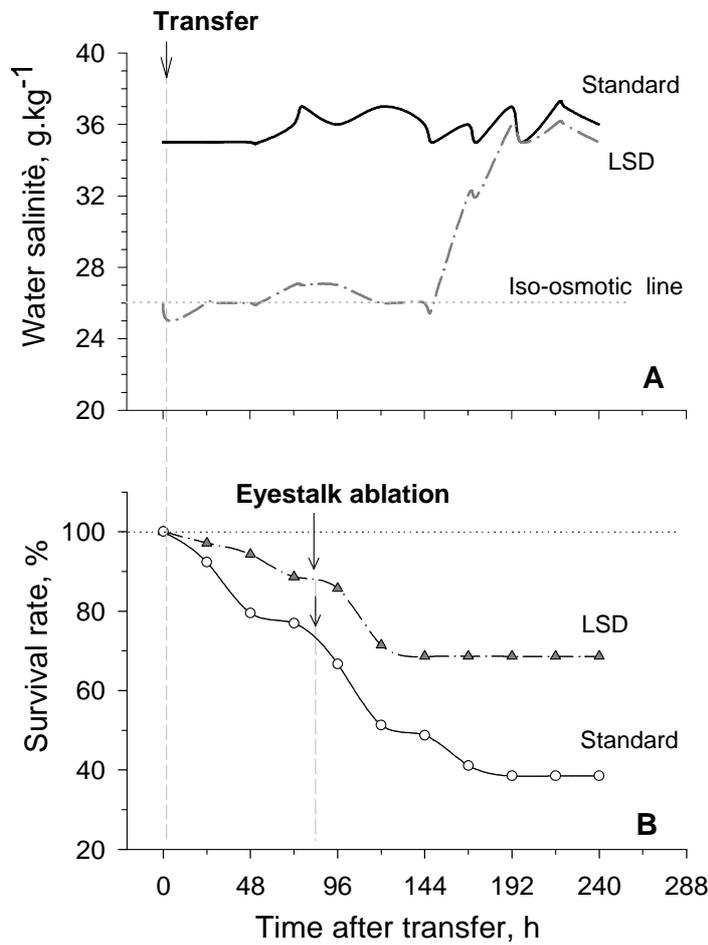
was reduced to 1% (Fig. 2D). The survival 96 h after transfer appeared to be clearly dependent on the number of favourable parameters and was significantly improved ( $\chi^2$  test;  $p < 0.01$ ) in the 3 treatments ( $[26;21;F] = 77\%$ ;  $[26;26;F] = 82\%$ ;  $[26;26;UF] = 96\%$ ) compared to the control (60 %, Fig. 2E).

**Broodstock.** To confirm the results obtained previously with sub-adult shrimps weighing 15-35 g, experiments were repeated with broodstock shrimps weighing 45 to 75 g. The haemolymph osmolality is immediately increased after fishing, as OP measured fifteen minutes after fishing and transport in tanks containing pond water (35‰; 21 °C) was respectively  $910.7 \pm 11.8$  and  $911.0 \pm 10.7$  mosM.kg<sup>-1</sup> for shrimps of standard and LSD OT batches (Fig. 3B). In maturation tanks, when transfer was performed into hypertonic water (standard conditions, Fig. 3A), osmolality remained high (approximately 900 mosM.kg<sup>-1</sup>, Fig. 3B) during the five days of experiment and mortality was particularly heavy with a peak at 48 h ( $29.8 \pm 2.4\%$ , Fig. 3C). When shrimps were transferred in a low salinity and warmed water, the blood OP decreased rapidly to isosmotic point in the first 24 hours and increased slowly from 72 h with water salinity to reach OP reference value at 120 h. The LSD OT protocol reduced considerably total mortality which was 25.6% against 54.1% in standard conditions (-52.7%).

### 3.3. Effect of LSD OT protocol on survival after eyestalk ablation.

As the previous results showed that adjustment of salinity, temperature and feeding enable the shrimps to better cope with the handling stress during fishing, the LSD OT protocol had been assessed on survival after eyestalk ablation (additional stress for broodstock). Firstly, a simplified protocol which just included "Low Salt and Diet" (LSD) condition was tested on sub-adult females; indeed, experiments were performed at the end of winter (water temperature increased to 25 °C). Then, the LSD OT protocol had been tested during winter on broodstock.

**Sub-adults.** As previously, the animals transferred in standard conditions (salinity of  $35.9 \pm 0.2\%$ , Fig. 4A) suffered a greater mortality 48 h after fishing and transfer than in LSD conditions (Fig.4B). So survival at 72 h, before eyestalk ablation, was respectively 76.9 and 88.6% with standard and LSD protocols (Fig. 4B). After eyestalk ablation, additional mortality was observed for each batch and at the end of the experiment (at 240 h), final survival was respectively 38.5 and 68.6 % for the control and LSD batches. Transfer in an isotonic water therefore improved the animals' survival by 15.2 % before eyestalk ablation and by 78.2 % after the two stresses.



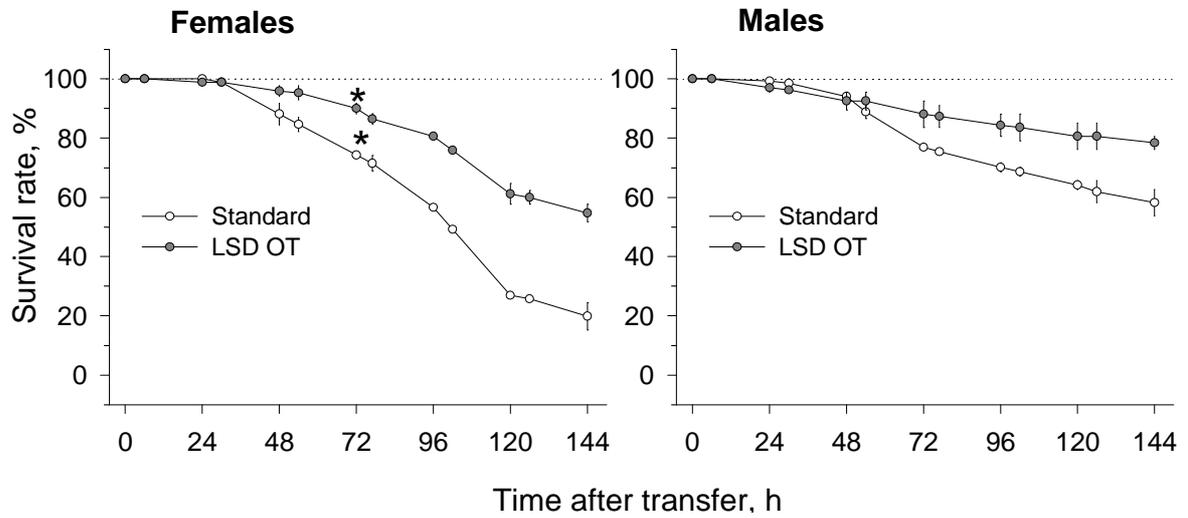
**Figure 4:** Evolution of (A) tank water salinity and (B) survival rate of *L. stylirostris* sub-adults shrimps (mean BW =  $24.1 \pm 2.5$  g) transferred into the hatchery under standard [35‰; Temperature ambient; Fed] (—) and "Low Salt and Diet" [LSD: 26‰; Temperature ambient; Unfed] (---) conditions. The ambient temperature during experiment was  $24.8 \pm 1.3$  °C.

**Broodstock.** In the control batches, survival rates at 72 h were similar for females ( $74.3 \pm 1.0\%$ , Fig. 5A) and males ( $76.9 \pm 0.7\%$ , Fig. 5B). Unilateral eyestalk ablation carried out at 72 h has amplified the mortality rate on the females. Thus, survival at 144 h after transfer was only  $19.9 \pm 4.6\%$  for the females compared with  $58.2 \pm 4.5\%$  for the males. The application of the LSD OT protocol once again reduced mortality following the two handling stresses: (i) survival rates at 72 h after transfer were improved to  $90.0 \pm 1.8\%$  for females and to  $88.1 \pm 4.5\%$  for males in the treated batches; (ii) at 144 h, seventy-two hours after eyestalk ablation of the females, the batches transferred in LSD OT conditions showed a survival rate of  $54.7 \pm 2.9\%$ , compared to  $19.9 \pm 4.6\%$  for the control groups. The final survival rates of males which only underwent the stress of transfer were  $78.4 \pm 2.2\%$  in the treated batches and  $58.2 \pm 4.5\%$  in the control treatments.

### 3.4 Influence of LSD OT protocol on spawns and nauplii numbers

**Study in an experimental hatchery.** After broodstock acclimation either in standard or LSD OT conditions in maturation room of the Saint-Vincent experimental hatchery (Ifremer), spawning has been monitored in September 2003 (Fig. 6A) and July 2004 (Fig. 6B). Animals treated with the LSD OT protocol spawned earlier than the control animals. The first spawns in the control and treated batches occurred at 96 and 72 h, respectively, after eyestalk ablation in September, and at 168 and 120 h in July. The one day difference between September and July can be explained by experimental conditions. In September 2003, eyestalk ablation was carried out at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $35\text{ }‰$  for the two treatments (control and LSD OT), whereas in July 2004, the ablation was performed in isotonic water at  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  and afterwards salinity and temperature were gradually increased to  $35‰$  and  $28^{\circ}\text{C}$  (2 days after eyestalk ablation).

The average rates of daily cumulative spawning present a first phase of acceleration followed by a second phase with a clear slowing down (Fig. 6C and 6D). In the control animals, the acceleration phase lasted 48 hours in September (72 to 120 h) and July (144 to 192h). In the LSD OT conditions, it lasted 48 h in September (48 to 96 h) and 120 h in July (96 to 216 h). So, the acceleration phase of cumulative spawning was therefore considerably longer for females that had been transferred and ablated according to LSD OT protocol (+150%). At the end of this acceleration phase, the cumulative spawning rates (Fig. 6 A&B) in September and July were respectively 20 and 38.4% for the control and 33.3 and 71.9% for the LSD OT treatment. In September, final cumulative spawning rates (264 h after eyestalk ablation) were 60% for the control and 115% for the LSD OT treatment. At the end of the



**Figure 5:** Evolution of broodstock survival rates (average  $\pm$  1 ES) after transfer into the hatchery. Influence of transfer conditions and Male - Female comparison. (\*) Eystalk ablation of the females 72 h after transfer.

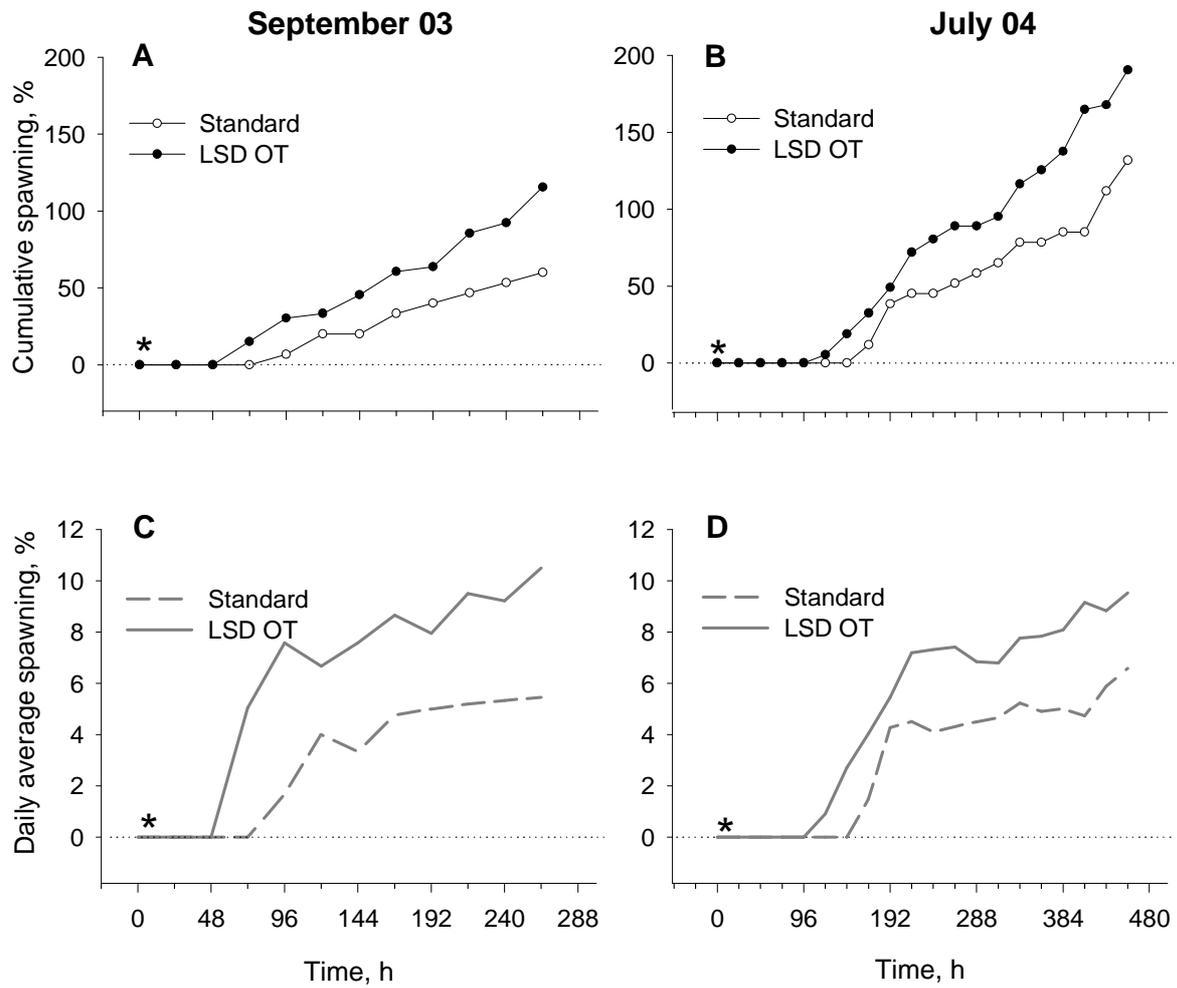
July production (456 h after eyestalk ablation), they were 131% for the control and 190% for the LSD OT batch. Thus in both cases, the LSD OT protocol increased spawning by 55 to 60%. Moreover, the observation of spawns' frequency during July production showed that some of the treated females spawned as many as 4 times, while the control animals spawned a maximum of twice (Fig. 7).

From the survival and spawning rate data obtained experimentally, the yield (total number of nauplii harvested over the production period) from a batch of 100 broodstock shrimps was estimated according to the season and the transfer protocol applied (Tab. 1). Excepted the number of nauplii per spawn, which was 20 % higher in summer for the females transferred in standard conditions, the new transfer protocol produced a significant improvement for all the other rearing indicators: survival rate, spawning rate per female, total number of spawns and total number of nauplii. In terms of total production of nauplii, the LSD OT protocol showed an improvement of 60 % and 175 %, in summer and winter respectively.

**Data study from a professional hatchery.** Figure 8 shows the evolution of survival rates before and after the LSD OT protocol application. The analysis of production results showed that the application of the LSD OT protocol in a commercial hatchery (Ecloserie du Nord, New Caledonia) has improved broodstock's survival rates in maturation rooms. Indeed four days after transfer, survival rate increased in summer, from 63.5 to 90.2 % ( $p = 0.0007$ ) and in winter, from 90.7 % to 94.7 % ( $p = 0.61$ ) (Fig.8A). Survival rates 15 days after transfer -which took into account the transfer and the eyestalk ablation- were significantly enhanced from 34.5 to 77.0 % in hot season ( $p < 0.01$ ) and from 66.5 to 87.3 % in winter ( $p < 0.05$ ) (Fig.8B). Moreover, the application of LSD OT protocol has improved the total nauplii production by respectively 65 and 7 % in summer and winter (Table 2). An ANOVA analysis of all the data shows a very significant seasonal effect ( $p = 0.0003$ ).

#### 4. Discussion

In this study, we have shown that it was possible to reduce mortalities associated with handling stress undergone by *L. stylirostris* by using “soft” technology. **Optimization** of the handling conditions of broodstock (Low Salt and Diet, Optimal Temperature) from the very beginning of the reproduction cycle improves their performances in the hatchery: a better survival rate combined to a higher spawning rate leads to an increase of nauplii number per cycle.



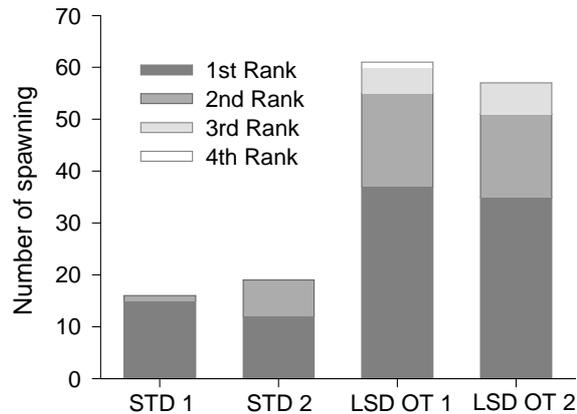
**Figure 6:** Evolution of cumulative spawning (A & B) and daily spawning rate (C & D) in September 2003 and July 2004 in broodstock females of *L. stylirostris* transferred in standard conditions [35;20;F] and LSD OT conditions [26;26;UF]. (\*) Eyestalk ablation of the females.

### **Application of the LSD OT protocol and mortality decrease associated with handling stress**

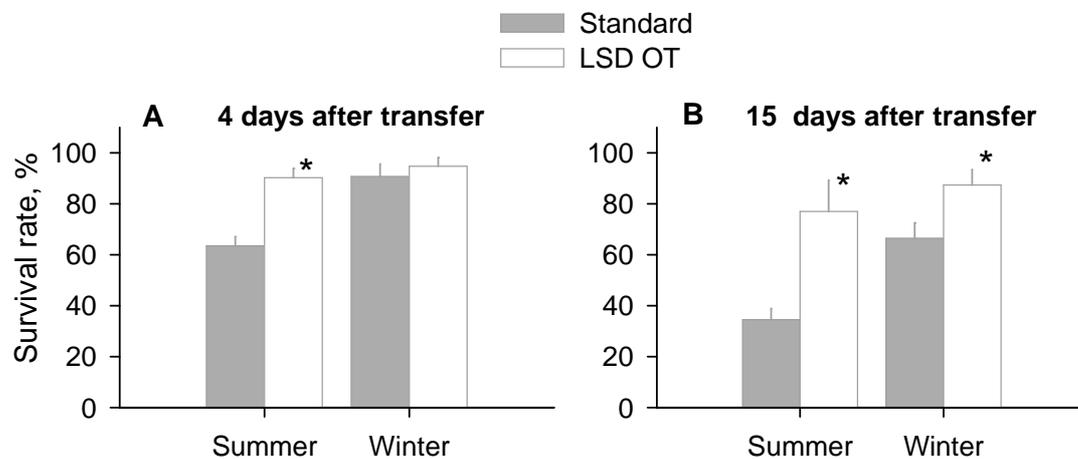
The metabolic and physiological consequences of handling aquatic animals have been studied a very few times. The major problems associated with the handling of *L. stylirostris* in summer and winter are (i) a collapse in osmoregulatory ability, (ii) a short-term stimulation of the oxidative metabolism, and (iii) an over-oxygenation of the blood (first 24 h) (Wabete et al., 2004). The disturbance of osmoregulation in winter at 22 °C lasted for 4 to 5 days, whereas in summer, at 28 °C, recovery occurred in less than 24 h. In *L. stylirostris* (Wabete et al., 2004), as in other crustaceans, a decrease in the osmoregulatory ability leads to a drop in the affinity of haemocyanin (respiratory pigment) for oxygen (Truchot, 1987). The drop in the haemolymph's ability of transporting oxygen, consequence of the blood osmolality disturbances, implies a potential increase in heartbeat rate. At the very least, this phenomenon weakens the animal and at worst, may result in a heart attack. This is a highly possible hypothesis with *L. stylirostris*, given its exceptional metabolic requirements, even in winter (Wabete et al., 2004).

The iso-osmotic point measured at 26 °C in *L. stylirostris* broodstock (756 mosM.kg<sup>-1</sup> or 26.9 ‰) is higher than in the juvenile animals (735 mosM.kg<sup>-1</sup> or 26.2‰ - Lemaire et al., 2002). The same trend is observed for the shrimp *Penaeus japonicus* which presents a higher isosmotic point in the adult (880 mosM.kg<sup>-1</sup>) compared to the post-larvae (820 mosM.kg<sup>-1</sup>) (Charmantier-Daurez et al., 1988).

The blood Osmotic Pressure (OP) of broodstock stocked in a salinity of 25-27‰ falls rapidly to a value close to the isosmotic point, the ion gradient with the external medium tending to be cancelled out. However, we have shown that a decrease in blood OP was associated with an increase in the affinity of the haemocyanin for oxygen (Wabete et al., in preparation). Thus the animals that were put into an isotonic medium did not develop the problems of ion exchange and respiratory physiology described in shrimp put in a hyper-osmotic medium. This probably explains the improved survival rate of the animals kept in an isotonic medium after handling (Fig. 2E, 3C and 4B). In this study, we also demonstrated that survival rate in handled sub-adult animals could be improved twice if, as well as adjusting salinity to an isosmotic value, we also didn't feed animals and regulated the water at 26 °C (Fig. 2). Indeed, in an earlier study, we showed that in a stressed animal the speed of osmoregulatory capacity recovery was temperature-dependent and was accelerated in heated water (Wabete et al., 2004). Moreover, we know that when the shrimp takes food, there is an increase in the



**Figure 7:** Total number of spawns including relative proportions of different spawning ranks for each of the control tanks (STD 1 & 2) and experimental tanks (LSD OT 1&2).



**Figure 8:** Average broodstock survival rate 4 (A) and 15 days (B) after their transfer into maturation tanks according to season and protocol applied. Average results from 23 productions (2001 to 2004) at the commercial hatchery, “Ecloserie du Nord”. Summer: standard protocol, n = 8 and LSD OT protocol, n = 4; Winter: standard, n = 6; LSD OT, n = 3. (\*) Result significantly different from that obtained in standard conditions ( $p < 0.05$ ).

oxidative metabolism (Wabete et al., in preparation) and major changes in ionoregulation (Lignot et al., 1999). In the crab Carcinus maenas, when the metabolism and therefore O<sub>2</sub> consumption are activated after a meal, the blood pH drops (Legeay et Massabuau, 1999; 2000). This postprandial acidosis leads to a decrease in the oxygen's affinity of the haemocyanin in order to favour the release of O<sub>2</sub> into the tissues. The blood capacity to carry O<sub>2</sub> is thus linked to a subtle adjustment of the respiratory pigment characteristics via blood pH and trans-gill ion exchanges between blood and water (Legeay et Massabuau, 1999). In the crayfish Astacus leptodactylus, this type of pH regulation would become impossible when mechanisms for maintaining the osmoregulatory capacity start working (Burtin and Massabuau, 1988).

The considerable improvement in survival rate (Fig. 2E) by transferring animals according to the LSD OT protocol (salinity close to the isosmotic point, animals unfed and optimal temperature) can thus be explained by a synergy of the three factors considered in this study. These three factors contribute to maintain the balance of the ion exchanges system in animals subjected to handling stress: (i) isotonic water, which blocks the ion imbalance; (ii) optimal temperature, which promotes ionoregulation and recovery of homeostasis, and (iii) no food which avoids stimulating the post-prandial metabolism and enhances acid-base regulation by trans-gill ion exchanges.

At the EDN hatchery, between 2001 and 2003, broodstock mortalities associated with handling stresses (transfer and eyestalk ablation in the females) were higher in summer (65.5%) than in winter (33.5%) (Fig. 8B). These mortality rates in summer are specific to the EDN hatchery, and we are unable, for the moment, to explain them in physiological terms. Nevertheless, they may be related to the conditions of high stocking density during the transport that were applied by this hatchery (pers. com. H. Schneider, senior manager, EDN). However, as in winter, mortality rates decreased considerably when the animals were kept in "physiological comfort" during handling.

### **Application of the LSD OT protocol on reproduction performances**

To ensure the reliability of post-larval production in hatcheries, it is important to understand the origins of variations in the reproduction of penaeid shrimps in captivity. The main studies in this area have focused on the influence of nutrition (Wouters et al., 2001), size or age (Peixoto et al., 2004), and season (Crococ et Coman, 1997) on the spawning performances. New Caledonia, which is located in the subtropical area, has two very distinct seasons. During the austral winter, water temperatures in ponds fall below 20-22 °C and can increase above

**Table 1:** Summary of results obtained at the Saint-Vincent hatchery (Ifremer) according to season and transfer protocol. Estimate, on the basis of 100 broodstock shrimps, of the total number of nauplii harvested and improvements obtained by applying the new protocol.

Season	Standard Protocol	LSD HT Protocol	Gain
	<u>Survival rate (%) <sup>(1)</sup></u>		
Summer	89,3	93,3	4%
Winter	70,5	89,1	26%
	<u>Spawning rate per female <sup>(2)</sup></u>		
Summer	0,6	1,15	92%
Winter	0,85	1,65	94%
	<u>Total spawning number</u>		
Summer	54	107	100%
Winter	60	147	145%
	<u>Nauplii number per female</u>		
Summer	81 071	64 938	-20%
Winter	120 000	134 302	12%
	<u>Total Nauplii number</u>		
Summer	4 343 807	6 967 469	60%
Winter	7 191 000	19 744 456	175%

Based on 100 females transferred in hatchery.

<sup>(1)</sup> 4 days after transfer.

<sup>(2)</sup> 10 and 17 days following eyestalk ablation in summer and winter respectively.

**Table 2:** Total number of nauplii produced for 100 females transferred into the hatchery “Ecloserie du Nord” in summer and winter according to transfer protocol applied.

Season	Standard protocol			LSD OT protocol			Gain
	n	Means	S.E.	n	Means	S.E.	
Summer	8	2 149 760	604 312	4	3 541 297	605 338	65%
Winter	6	7 736 925	1 068 434	3	8 277 597	3 149 718	7%

28-30 °C in summer. In the hot season, especially when temperatures are at their highest, the rate of nauplii production per female is considerably reduced (Tab. 1). This phenomenon has to be linked with the drop in males' fertility. Indeed, Pascual et al. (1998) have shown that the sperm quality of Penaeus setiferus declined with an increase of the spermatophores' necrosis number when the temperature rose over 28 °C. Crocos and Coman (1997) have shown a relationship between the rate of nauplii production and the season in wild broodstock, with minimum production in March (southern hemisphere summer). However, these authors also revealed a high level of interaction with age or size of the shrimp.

The consequences of handling stress on broodstock shrimp (transfer and eyestalk ablation) have been less documented. A few authors (AQUACOP, 1979; Primavera, 1983; Browdy, 1998) have observed a relationship between the handling stress and broodstock mortality. However no study has been carried out, to our knowledge, on the consequences of this handling on reproduction. Our results on this subject are striking: when females are handled in conditions of "physiological comfort" (LSD OT), the latency period (time between eyestalk ablation and the first spawns) is significantly shortened and the acceleration phase (rapid increase in the percentage of daily spawning) is considerably longer (Fig. 6). Ovarian maturation occurs when the secondary vitellogenesis is completed: the biosynthesis of proteins and lipids, their transport and storage in the oocytes (Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 2001) lead to an increase of 4 to 9 fold the ovarian weight in 3 to 7 days (Jeckel et al., 1989; Mourente and Rodriguez, 1991). The whole process involves a considerable mobilisation of energy over a short period for successful achievement. In the shrimp Palaemonetes pugio vitellogenesis is described as an increase in metabolic demand, associated with an increase in the heartbeat rate (Guadagnoli and Reiber, 2005). Secondary vitellogenesis can thus not be triggered if the female is under stress as the animal prioritizes its metabolic demand to its homeostasis recovery. Thus, animals that are transferred and handled in standard conditions would have to devote more time and energy to osmoregulation. This would therefore extend the latency period between eyestalk ablation and the first spawn.

Only a part of the females that begin the reproduction cycle will complete vitellogenesis and spawn, and some of them will have several vitellogenesis resulting in successive spawns (Beard and Wickins, 1980; Emmerson, 1980). For the shrimps transferred under "physiological comfort", the lengthening of the acceleration phase to reach a reproductive peak can be explained by a greater number of females that spawn (the LSD OT treatment



multiplies survival of the females by 2.7, Fig. 5). Meanwhile, the shortening of the latency period under the LSD OT protocol, contributes to an increase in the number of spawns per female (Fig. 7).

In summer in the Saint-Vincent hatchery (Ifremer), we observed a greater number of nauplii produced per female in the control animals compared with LSD OT treatment (Tab. 1). This apparent counter-performance could be explained in standard transfer conditions, by a form of selection carried out on the most resistant broodstock which may also be the most fertile. After handling in conditions of “physiological comfort”, some of the least fertile females that have survived will take part in reproduction leading to a drop in the average number of nauplii per spawn.

Nevertheless, transfer of the animals under “physiological comfort” produces considerable improvements in productivity in most of the production indicators (survival after transfer and eyestalk ablation, average number of spawns per female, and the total number of nauplii produced) (Tab. 1). These improvements have been estimated experimentally at 60% to 170% of extra nauplii in hot and cold seasons, respectively.

### **Conclusion**

Handling broodstock under “physiological comfort” reduces the impact of stress thus improving the survival and reproduction of L. stylirostris. The more weakened are the animals (season, pre-moult stage), the more significant are the improvements. The application of LSD OT protocol should considerably reduce production costs either by reducing the number of earthen ponds devoted to broodstock or by shortening the production cycle in the hatchery. This latest consequence would increase the time for implementing sanitary measures in the hatchery and thus reduce the risks of disease in larval production. The results of our studies are being successfully applied in commercial hatcheries in New Caledonia. The developed protocol is certainly not exclusive to L. stylirostris but could be usefully applied, with adjustments of temperature and salinity, to other broodstock shrimps such as Penaeus monodon and Litopenaeus vannamei.

**Acknowledgements:** The authors thank Mr Christian GALINIE (Blue Lagoon Farm manager) and Mr Hervé SCHNEIDER (Ecloserie du Nord manager) for their kind support and all of the zootechnical staff of Saint-Vincent hatchery.



## References

- AQUACOP, 1979. Penaeid reared Brood Stock : closing the cycle of P. monodon, P. stylirostris and P. vannamei. Proc. World Maricul. Soc. 10, 445-452.
- AQUACOP, 1983. Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Océanologique du Pacifique. In: , Mc Vey, J.P. (Editor), Handbook of MaricultureCrustacean Aquaculture vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 105–121.
- Beard, T.W., Wickins, J.F., 1980. Breeding of Penaeus monodon Fabricius in laboratory recirculation systems. Aquaculture 20, 103-118.
- Browdy, C.L., 1992. A review of the reproductive biology of Penaeus species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. J. Wyban, ed. Proceedings of the special session on shrimp farming, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp 25-51.
- Browdy, C.L., 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies : improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture, 164, 3-21.
- Burtin, B., Massabuau, J.-C., 1988. Switch from metabolic to ventilatory regulation of extracellular pH in crayfish. J. Exp. Biol. 137, 411-420.
- Chamberlain, G.W., Lawrence, A.L., 1981. Effect of light intensity and male and female eyestalk ablation on reproduction of Penaeus stylirostris and Penaeus vannamei. J. World Maric. Soc. 12 (2), 357-372.
- Charmantier-Daurez, M., Thuet, P., Charmantier, G., Trilles, J.-P., 1988. Tolérance à la salinité et osmorégulation chez les post-larves de Penaeus japonicus et P. chinensis. Effet de la température. Aquat. Living Resource 1, 267-276
- Charniaux-Cotton, H., 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. American Zoologist 2, 197-206.
- Crococ P.J., Coman, G.J., 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of Penaeus semisulcatus broodstock: optimizing broodstock selection. Aquaculture 155, 55-67
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie Milieu 18, 596-609.
- Emmerson, W.D., 1980. Induced maturation of prawn Penaeus indicus. Marine Ecology and Progress Series 2, 121-131.



- Forgue, J., Truchot, J.P., Massabuau, J.-C., 1992. Low arterial PO<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood oxygen-affinity. *J. Exp. Biol.* 170: 257-264.
- Galinié, C., 1989. Shrimp aquaculture in New Caledonia. *Advances in tropical aquaculture Tahiti*, Feb 20-March 4. AQUACOP IFREMER Actes de Colloque 9, 45-50.
- Guadagnoli, J.A., Reiber, C.L., 2005. Changes in cardiac output and hemolymph flow during hypoxic exposure in the gravid grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *J. Comp.Physiol. B.* 175, 313-322.
- Jeckel, W.H., Aizpun de Moreno, J.E., Moreno, V.J., 1989. Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 271-276.
- Legeay, A., Massabuau, J.-C., 1999. Blood oxygen requirement in resting crab *Carcinus maenas* 24 hours after feeding. *Canad. J. Zool.* 77, 784-794.
- Legeay, A., Massabuau, J.-C., 2000. Effect of water salinity on resistance to hypoxia in resting green crab *Carcinus maenas* after feeding. *Marine Biol.* 136, 387-396.
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.-A., Chim, L., 2002. Combined effects of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub-adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209, 307-317.
- Lignot J.-H., Cochard J.C., Soyez C., Lemaire P., Charmantier G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 79-92.
- Massabuau, J.C., Forgue, J., 1996. A field versus laboratory study of blood oxygen status in normoxic crabs at different temperatures. *Can J Zool.* 74, 423-430.
- Mourente, G., Rodriguez, A., 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110, 21-28.
- Ottogalli, L., Galinie, C., Goxe, D., 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia. *J. Aquac. Trop.* 3, 111-125.
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A., Rosas C., 1998. Effect of temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquaculture Soc.* 29, 447-484.
- Peixoto S., Cavammo, R.O., Wasielesky, W., D’Incao, F., Krummenauer, D., Milach, Â.M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. *Aquaculture* 238, 173-182.



- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp Farfentepenaeus paulensis submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Pérez Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Mémoires du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle*, tome 175, 233p.
- Primavera, H., 1983. Broodstock of Sugpo, Penaeus monodon Fabricius. Extension Manual n°7, 3<sup>rd</sup> ed. Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Philippines.
- Quakenbush, L.S., 2001. Yolk synthesis in the marine shrimp, Penaeus vannamei. *Amer. Zool.* 41, 458-464.
- Rosas, C., Fernandez, I., Brito, R., Diaz-Iglesia, E., 1993. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp, Penaeus notialis. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A(1), 183-187.
- Truchot, J.P., 1987. Comparative aspects of extracellular acid-base balance. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 248p.
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.-C., 2004. Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide Litopenaeus stylirostris à 20 °C. *Styli* 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Ed. Ifremer. Actes Colloq. 38, 75-84.
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture* 202, 1-21.
- Wood, C.M., 1989. The physiological problems of fish in acid waters. *Soc. For Exp. Biology Sem. Series* 34, 125-151.



## CONCLUSIONS

Nous avons testé dans ce chapitre trois protocoles, ou parades, destinés à limiter au maximum les problèmes de mortalité liés à la manipulation des crevettes *L. stylirostris* en période hivernale.

Nous avons d'abord étudié en conditions expérimentales avec des animaux sub-adultes l'effet d'une eau de mer diluée à une valeur proche du point iso-osmotique de la crevette ( $\approx 26$  ‰, Lemaire *et al.* 2002). Ensuite les effets cumulés d'une élévation de la température de l'eau puis de la suppression de nourriture sur plusieurs jours aux phases critiques des manipulations ont été testés. Ces expérimentations préliminaires ont permis de définir des conditions de transfert que nous avons nommé « **protocole LSD OT** » pour : **Low Salt and Diet, Optimal Temperature**. L'application de ce protocole LSD OT combine donc l'utilisation des trois paramètres clés que sont

- la salinité (diminution au point iso-osmotique),
- la température (augmentation jusqu'à 28 °C) et
- le jeûne (absence totale d'apport d'aliment).

L'application du protocole LSD OT a été ensuite testée dans le cas des géniteurs après détermination de leur point iso-osmotique (nous avons mis en évidence un point iso-osmotique de 26.9 ‰, très proche de celui des animaux plus jeunes rapporté par Lemaire *et al.*, 2002). Nous avons appliqué ce protocole lors des deux phases de manipulation des géniteurs pour leur reproduction (transfert du bassin à l'écloserie et épédonculation des femelles). Dans le cas rapporté, nous avons ainsi pu réduire les mortalités de 61 à 15 % lors transfert et de 78 à 44 % après le cumul des 2 stress (transfert plus épédonculation).

Les conséquences de ce nouveau protocole sur les performances de reproduction des géniteurs ont été ensuite vérifiées préalablement à son application en écloserie privée. La reproduction des femelles manipulées en confort physiologique a permis d'accélérer la maturation et de multiplier par 4 la production d'œufs. Les femelles manipulées selon le protocole LSD OT ont réalisé jusqu'à 4 pontes successives alors que les témoins ont pondu au maximum 2 fois. **Au bilan, l'amélioration des survies et de la reproduction des géniteurs avec le protocole LSD OT a donc engendré une augmentation de la productivité de nauplii de 60 à 170 % dans nos conditions d'écloserie expérimentale.**



L'application de notre protocole en éclosion commerciale (2003-2004) a confirmé ces résultats et montré toute son efficacité et son potentiel. Il est aujourd'hui appliqué en routine et contribue à la fiabilité de la production et à une économie de coûts des post-larves destinées aux fermes.



## **CHAPITRE VI**

### **CONCLUSIONS GENERALES**



**CHAPITRE VI****CONCLUSIONS GENERALES**

<b>1. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS .....</b>	<b>287</b>
<b>2. AVANCEES MAJEURES EN ECOPHYSIOLOGIE.....</b>	<b>295</b>
<b>Implications dans le domaine de la distribution géographique de l'espèce .....</b>	<b>295</b>
<b>Renforcement de la théorie des faibles PO<sub>2</sub> dans le sang et les tissus.....</b>	<b>297</b>
<b>3. AVANCEES MAJEURES DANS LE DOMAINE DE L'AQUACULTURE.....</b>	<b>299</b>
<b>Un scénario physiologique du déclenchement du syndrome 93 .....</b>	<b>299</b>
<b>La notion de pression partielle d'oxygène en aquaculture .....</b>	<b>303</b>
<b>4. PERSPECTIVES.....</b>	<b>305</b>
<b>Développement en écophysiologie.....</b>	<b>305</b>
<b>Méthode d'échantillonnage sanguin .....</b>	<b>305</b>
<b>Avancées technologiques pour la crevetticulture : .....</b>	<b>305</b>



Notre travail est une étude de l'écophysiologie de la crevette pénéidé *Litopenaeus stylirostris* réalisée dans le contexte de la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Cette crevette est originaire de la zone équatoriale Pacifique, du nord du Mexique au nord du Pérou, où sa zone de répartition géographique correspond à des valeurs de températures minimales de 20 °C. Le problème que nous avons abordé est la recherche, chez ce crustacé sélectionné pour sa croissance rapide, des causes qui participent à l'apparition de mortalités massives dans les élevages. Une des questions principales sous-jacentes était celle du syndrome 93, épizootie attribuée au *Vibrio penaeicida*, apparu pour la 1<sup>ère</sup> fois en hiver de l'année 1993 (Costa *et al.* 1998) et récurrent dans différents élevages, en période hivernale, depuis cette date. En fait, d'une façon plus large, dans ce mémoire nous avons cherché à caractériser la nature des troubles physiologiques apparaissant à partir de 20-22 °C chez *L. stylirostris*. Pour répondre à cette question, nous avons replacé le problème (i), dans le contexte du niveau métabolique exceptionnel de cet animal et (ii), de l'impact de son fonctionnement dans la gamme basse de sa plage thermique (20 °C) sur sa physiologie.

Dans un premier temps nous avons donc caractérisé ces crevettes en terme de métabolisme respiratoire et nutritionnel. Nous avons en particulier défini leurs niveaux métaboliques pré- et post-prandial à 20 et 28 °C (pris comme référence proche de l'état de confort de l'animal) ainsi que leurs besoins en apport nutritif (Chapitre III). Dans les élevages, on savait depuis longtemps que les animaux sont généralement plus fragiles en période froide et que toute manipulation à cette époque est associée à des mortalités massives pouvant parfois atteindre jusqu'à 80 % des lots manipulés. Dans un second temps, nous avons donc utilisé cette hyper-sensibilité à la manipulation comme un outil pour mieux comprendre les phénomènes de fragilisation à cette température (Chapitre IV). L'analyse et la compréhension de ces mécanismes nous a permis de proposer des solutions et un protocole qui permet maintenant de manipuler des animaux, aussi bien en période hivernal qu'estival, avec des améliorations de la survie allant de 30-40 % à plus de 90 % (Chapitre V).

## 1. Résumé des principaux résultats

En travaillant sur de jeunes animaux adultes, nous avons tout d'abord déterminé le niveau métabolique de *Litopenaeus stylirostris* par la mesure de la consommation d'oxygène avant et après un repas. Les mesures ont été réalisées à 20 et 28 °C (Chapitre III). Un des résultats originaux de ce mémoire est de montrer que la consommation d'oxygène à jeun



d'une crevette *Litopenaeus stylirostris* est excessivement élevée par rapport aux autres crustacés connus et du même ordre de grandeur que la consommation d'oxygène de tunidés. Un autre fait important est que la crevette *L. stylirostris*, malgré ce métabolisme oxydatif très élevé, fonctionne comme un très grand nombre d'animaux aquatiques étudiés à ce jour avec des pressions partielles d'oxygène (PO<sub>2</sub>) très basses dans le sang. Les valeurs de PO<sub>2</sub> dans le sang artériel sont de l'ordre de 2 kPa (Chapitre IV) alors que pour rappel, PO<sub>2</sub> dans une eau équilibrée à l'air au niveau de la mer est égale à 21 kPa.

Notre analyse permet ainsi de mieux appréhender les causes de la dépendance de l'animal vis à vis du manque d'oxygène en bassin d'élevage. Il est clair qu'un apport suffisant, dont on peut maintenant comprendre les causes d'une manière plus tangible suite à nos mesures, doit lui être assuré en permanence à partir du milieu. A l'heure actuelle, nous n'avons pas abordé les problèmes des valeurs minimums d'oxygénation de l'eau permettant un tel niveau métabolique chez cette espèce mais la question devra être résolue dans les prochains temps.

L'analyse du métabolisme oxydatif après la prise de nourriture a montré, en la quantifiant, l'existence de valeurs particulièrement importante du métabolisme de l'animal. En hiver (20°C) comme en été (28 °C), la consommation d'O<sub>2</sub> est multipliée par 2 (voire 2.5 pendant le pic post-prandial). Le niveau de consommation d'oxygène atteint permet de mieux comprendre l'importance des chutes de concentration d'oxygène rapportées dans les bassins d'élevage après la distribution de nourriture.

En parallèle de ces mesures de consommation d'oxygène, nous avons appliqué à *L. stylirostris* la méthode, développée chez les poissons (Brett *et al.* 1979). Cette méthode étudie la relation croissance-ration et permet véritablement de chiffrer et d'exprimer les besoins nutritionnels journaliers en terme de quantités nécessaires par animal ou par unité de biomasse. Dans ce domaine très peu d'études ont été réalisées sur les crevettes pénéides par manque d'un outil méthodologique adapté. C'est un outil qui se révèle également extrêmement précieux pour étudier l'influence des conditions environnementales (température, apport trophique du bassin,...) et de la zootechnie (fréquence des repas, densités d'élevage..) sur la nutrition et la croissance des crevettes à différents stades de leur développement.

Nous avons ainsi caractérisé les apports indispensables pour le métabolisme d'entretien et la croissance optimale des juvéniles en été et des sub-adultes aux deux saisons. Nous avons déterminé que 25 à 35 % de l'énergie brute ingérée sont alloués à l'entretien et 40-50 % à la croissance.



La croissance et le rendement énergétique chez les juvéniles sont deux fois plus élevés que chez les crevettes sub-adultes. Ce résultat est extrêmement révélateur de la nécessité dans nos futures études en nutrition de distinguer la phase juvénile (<10g) de la phase sub-adulte (10g jusqu'à la taille commerciale). La priorité devra être portée sur les animaux sub-adultes afin d'ajuster au mieux l'apport nutritif à leur faible rendement anabolique.

La température également est un facteur qui influe considérablement sur l'appétit et la croissance des crevettes. En été, les besoins nutritifs sont 50 à 60 % plus élevés qu'en hiver avec une évolution parallèle de la croissance. Ces résultats sont démonstratifs de la nécessité de dissocier les saisons d'élevage dans les études de nutrition. Nous montrons en effet que les besoins nutritifs sont température dépendante et par conséquent l'application d'un aliment unique aux deux saisons d'élevage apparaît être une aberration. L'illustration de ce fait est donnée par les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont le besoin est augmenté chez *L. stylirostris* qui doit s'adapter aux températures hivernales. Ce besoin exacerbé en saison froide est en opposition avec d'une part la baisse de l'appétit de l'animal et d'autre part le sous-dosage en AGPI de l'aliment formulé à la base pour des températures estivales. La méthode croissance-ration nous permettra à terme de quantifier les besoins en AGPI des animaux élevés en saison froide et d'enrichir l'aliment en conséquence.

Les résultats que nous avons obtenus avec la relation croissance-ration apparaissent précises. Nous avons ainsi pu déduire des niveaux énergétiques du métabolisme d'entretien cohérents avec ceux du métabolisme mesurés par respirométrie. En outre, les deux approches montrent des changements d'amplitudes comparables ( $\pm$  50-60 %) de la demande métabolique avec la saison et/ou température d'élevage.

Les rares données de la littérature sur la répartition de l'énergie ingérée entre le métabolisme et la croissance des crevettes sont obtenus dans des conditions très différentes (méthodologie, taille des animaux, températures d'étude) des nôtres et ne sont donc pas comparables. La comparaison avec les poissons et notamment les salmonidés qui offrent un nombre de données plus important, montre qu'en terme d'énergie dédiée à la croissance exprimée par unité de gain de poids (g), la crevette *L. stylirostris* avec de 15 à 23 kJ.g<sup>-1</sup> (variable avec la température et la taille de l'animal) se positionne au niveau de la truite (18°C, poids de 37g) avec 17,5 kJ.g<sup>-1</sup> (Kim et Kaushik, 1992). Finalement la précision de notre méthode croissance-ration nous a également permis de mettre en évidence, dès le stade sub-adulte, une croissance significativement plus rapide des femelles, par rapport aux mâles.



Après avoir ainsi analysé l'importance du métabolisme de *L. stylirostris* et ses besoins alimentaires, nous avons abordé dans le Chapitre IV les problèmes de fragilité de l'animal apparaissant à certaines périodes de l'année.

Notre angle d'attaque a été l'analyse des causes de mortalités qui apparaissent, avec un pic à 48 h, à la suite de manipulations simples et usuelles dans les fermes d'élevage et les écloséries. Un fait important est que généralement ces mortalités sont beaucoup plus fréquentes en périodes hivernales qu'en période estivale. Nous suggérons que l'observation de cette saisonnalité soit à rapprocher de celle du déclenchement du syndrome 93. En effet, bien que le *Vibrio* responsable de cette épizootie soit présent toute l'année (Mermoud *et al.* 1998), son aspect pathogène ne se révèle aussi que préférentiellement en période hivernale. Dans ce cas, c'est ce qui a amené l'hypothèse de phénomènes déclencheurs liés à l'environnement.

Nos résultats montrent qu'en hiver, lorsqu'on manipule *L. stylirostris* pour le transférer des bassins d'élevage vers les bacs d'un bâtiment expérimental ou de l'éclosérie, on provoque deux stress en parallèle qu'on peut mettre en évidence chez les animaux survivants. Le premier est caractérisé par une incapacité à maintenir une pression osmotique dans le sang plus faible que dans l'eau de mer<sup>1</sup>. Cette perturbation est très profonde, présente un maximum dans la première heure, et est particulièrement prolongée dans le temps puisqu'il faut pratiquement une semaine à l'animal pour retrouver son état de référence. Le deuxième stress est une augmentation transitoire de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel qui revient à sa valeur de référence après 24 h. Nous avons montré que chez *L. stylirostris*, comme chez tous les crustacés étudiés, l'augmentation transitoire de la pression osmotique sanguine s'accompagne d'une chute de la capacité oxyphorique dans le sang qui se prolonge donc aussi dans le temps. Nous avons montré que c'est la coïncidence, 48 h après la manipulation, entre cette diminution de capacité oxyphorique et le retour de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel à des valeurs faibles qui est à l'origine des mortalités. En effet si on augmente transitoirement la valeur de PO<sub>2</sub> dans le sang artériel à ce moment, on diminue de façon dramatique l'importance de cette mortalité (Chapitre IV).

L'analyse et la compréhension de ces mécanismes nous a permis de proposer dans le Chapitre V des solutions et un protocole qui permet maintenant de manipuler des animaux,

---

<sup>1</sup> En été, on observe aussi une perturbation de l'osmorégulation, mais moins importante et plus brève, en terme de maintien de la capacité osmorégulatrice



aussi bien en période hivernal qu'estival, avec des améliorations de la survie allant de 30-40 % à plus de 90 %.

En combinant nos observations et les acquis de la littérature, nous avons proposé quatre gestes pour contrecarrer ces phénomènes de mortalité:

- 1 - placer les animaux dans une eau à 26/1000 (point iso-osmotique) pour réduire ou bloquer l'augmentation de la pression osmotique sanguine, de façon à limiter à l'origine la cause de la diminution d'affinité du pigment respiratoire pour O<sub>2</sub>,
- 2 - interrompre l'apport d'aliment car en période post prandial, (i), une acidification du sang - qui diminue l'affinité - a été rapportée chez le crabe (Legeay et al., 1999) et (ii), la demande en oxygène est multipliée par un facteur 3-4 (Chapitre III),
- 3 - élever la température afin d'accélérer les mécanismes de pompage ionique permettant de rétablir la pression osmotique originelle.
- 4 - sur-oxygéner le milieu, avec un mélange enrichi en oxygène pur, dans les cas extrêmes. Cet acte peut être limité à la période 24-48 h qui correspond à la phase aiguë du symptôme.

Cette technique a été validée, en ce qui concerne les points 1 à 4, en laboratoire et 1 à 3 dans une éclosérie (Éclosérie du Nord). Nous avons qualifié cette approche de « technologie douce » car elle permet de traiter les animaux sans apport de produit vétérinaire.

## **2. Avancées majeures en écophysiologie**

### *Implications dans le domaine de la distribution géographique de l'espèce*

Comme nous l'avons déjà dit, la crevette *Litopenaeus stylirostris* est originaire de la zone équatoriale Pacifique, du nord du Mexique au nord du Pérou, où sa zone de répartition géographique correspond à des valeurs de températures supérieures ou égales à 20 °C.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un des mécanismes physiologiques sous jacents qui peut participer à la distribution géographique de l'espèce. En effet, nous



montrons que si en condition stationnaire, *L. stylirostris* est parfaitement capable de maintenir l'équilibre de son milieu intérieur, lors d'un stress (matérialisé dans nos expériences par une pêche et un transfert en laboratoire) le maintien de cet équilibre devient impossible. L'animal présente transitoirement des caractéristiques d'insuffisance respiratoire qui aboutissent à une issue fatale dans la majorité des cas.

Sur le terrain on peut proposer que l'attaque d'un prédateur, et la fuite associée, peut déclencher un tel syndrome. On comprend donc bien que la présence de *L. stylirostris* dans des eaux où la température est égale ou inférieure à 20-22 °C devient alors très improbable.

#### *Renforcement de la théorie des faibles PO<sub>2</sub> dans le sang et les tissus*

Les résultats présentés dans ce mémoire, et en particulier dans le Chapitre IV, renforcent la valeur généraliste de la stratégie des faibles PO<sub>2</sub> (Massabuau, 2001 ; 2003).

En effet, ils démontrent qu'un animal aquatique à très fort niveau métabolique, comparable en fait à celui de tunidés, peut fonctionner avec des pressions partielles d'oxygène dans le sang artériel très faible. Ces données étendent donc la portée des observations faites à ce jour principalement sur des animaux à métabolisme faible (écrevisse, crabe, silure, carpe, mollusques bivalves, vers, larves d'insectes) vers le cas d'animaux à métabolisme oxydatif très élevés. Les informations que nous apportons ici sont d'autant plus importantes que des poissons comme les tunidés sont et seront toujours très difficiles à appréhender d'un point de vue expérimental.

De plus, nos observations montrent de façon inattendue que la stratégie des faibles PO<sub>2</sub> peut être si forte dans la hiérarchie des régulations que l'animal peut, face à un problème qui est finalement respiratoire, mourir parce qu'il est incapable d'hyperventiler pour améliorer l'état d'oxygénation de son sang artériel. Pourquoi ? En fait, on est dans une situation où c'est la concentration en oxygène qui diminue et non pas la pression partielle. Si on accepte, comme c'est couramment admis dans la littérature, que la grandeur réglée est bien la pression partielle du gaz et non pas sa concentration, l'observation apparaît logique. On considère d'ailleurs classiquement que les chémorécepteurs à oxygène sont sensibles aux variations de pression et non de concentration. La crevette *Litopenaeus stylirostris* serait donc soit incapable de détecter une diminution de concentration d'oxygène dans son sang, soit incapable de transmettre cette information à ses centres respiratoires.

Dans cette optique, l'observation d'un lot d'animaux ne mourant pas suite à une



pêche-manipulation-transfert, car il augmente sa pression partielle d'oxygène dans son sang artériel (chapitre III ; Wabete et al, soumis), reste tout à fait exceptionnelle par rapport à toute notre expérience de pêche – transfert. Nous n'avons, comme nous l'avons dit, aucune explication rationnelle pour expliquer ce phénomène. C'est bien sur une piste qu'il faudra continuer à explorer dans le futur.

### **3. Avancées majeures dans le domaine de l'aquaculture**

Ce travail est un exemple de transfert technologique de la recherche fondamentale vers la recherche appliquée et l'industrie de la crevette.

#### *Un scénario physiologique du déclenchement du syndrome 93*

La crevette est extrêmement sensible aux variations thermiques dès lors que celles-ci se situent aux marges basses de la zone de son confort physiologique (22 °C à 30 °C).

Les mortalités massives en relation avec le syndrome 93 apparaissent généralement en entrée de saison froide lorsque les variations thermiques passent en dessous du seuil des 22°C. Une chute de température autour du seuil des 22°C induit une baisse de la capacité osmorégulatrice de la crevette et des déplacements d'eau entre compartiments intérieur et ambiant parfaitement mesurables.

Ces fuites sont « colmatées » très lentement (6-7 jours) en saison froide lorsque la crevette est exposée à des températures de 20 °C. Comme nous l'avons écrit ci-dessus, ce phénomène a de nombreuses répercussions sur la physiologie respiratoire de l'animal dont une baisse notable de l'affinité du pigment respiratoire (hémocyanine) pour l'oxygène conduisant à un abaissement du pouvoir oxyphorique du sang (capacité du sang à pouvoir transporter de l'oxygène par unité de volume).

Dans cette situation il y aurait déficit d'oxygène au niveau des tissus de la crevette dont la survie reposerait alors sur sa capacité à compenser cette pénurie. L'animal dispose en théorie de trois voies pour augmenter l'apport d'oxygène au niveau de ses tissus :

✓ La première voie est la ventilation dans ses cavités branchiales (hyperventilation) pour y augmenter l'état d'oxygénation de l'eau au contact des branchies et faciliter ainsi le passage



de l'oxygène dans le sang. Sur la Figure 8 (Chapitre IV) on observe que la valeur de base de la PaO<sub>2</sub> est égale à 2 kPa et que cette valeur augmente à 5 kPa juste après que le stress soit appliqué aux crevettes. Cette augmentation de la PaO<sub>2</sub> du sang traduit une hyperventilation des animaux. Cependant cette hyperventilation compensatrice ne dure que 24h et le relais doit être pris par les deux voies exposées ci après,

✓ la deuxième voie est d'accroître le flux sanguin en augmentant le débit cardiaque. Des mesures sont en cours au DAC afin de montrer ce phénomène qui a par ailleurs été décrit chez la crevette *Litopenaeus vannamei*. Chez cette espèce, l'augmentation du flux sanguin est en outre associée à un accroissement du volume cardiaque. Une composante physiologique explicative des mortalités du S93 serait donc des complications cardiaques faisant suite à une baisse du pouvoir oxyphorique sanguin conséquence d'une perturbation de l'équilibre ionique des crevettes stressées en saison froide. Chez *L. stylirostris*, en minimisant expérimentalement les perturbations ioniques associées à un stress en hiver, et en accélérant la vitesse de récupération des animaux on évite les mortalités caractéristiques du « syndrome 93 induit ».

✓ la troisième voie est d'augmenter le pouvoir oxyphorique du sang par amplification de la synthèse d'hémocyanine (protéine contenant du cuivre = pigment respiratoire chez la crevette). Ce phénomène a été décrit chez quelques décapodes et deux facteurs pourraient limiter l'utilisation de cette voie chez *L. stylirostris*. Le premier serait une carence en cuivre des animaux. Cette carence serait le résultat d'un trop faible apport de ce métal conséquence d'un sous dosage dans l'aliment commercial et/ou d'une baisse de la prise de nourriture chez les crevettes élevées aux températures hivernales. Le deuxième facteur serait un ralentissement de la synthèse de l'hémocyanine conséquence également de la baisse de la température.

Connaissant les causes physiologiques conduisant à la mort des animaux en saison froide il a été possible de développer une méthode pour prévenir cette mortalité chez les géniteurs au cours de leur transfert en écloserie (Chapitre V). Cette méthode n'est cependant pas applicable en bassin d'élevage où les volumes d'eau mis en jeu ne permettent pas le contrôle de la température et de la salinité. Par contre, en bassin d'élevage, la solution au syndrome 93 pourrait passer par l'alimentation. Cette solution engloberait (1) une gestion adaptée des repas aux périodes de grandes variations thermiques autour du seuil des 22°C, (2) un enrichissement de l'aliment en cuivre qui permettrait aux animaux de répondre à une augmentation de leurs besoins en oxygène et (3) un enrichissement en acides gras essentiels



afin de permettre aux crevettes de s'adapter aux températures hivernales. Le Cuivre présentant un haut pouvoir oxydant, notamment pour les acides gras polyinsaturés, son incorporation dans l'aliment doit se faire avec beaucoup de précaution au risque de provoquer une peroxydation des lipides membranaires. L'apport en cuivre doit donc être bien dosé et associé à celui des vitamines antioxydantes (vitamines C, vitamines E et caroténoïdes). L'enrichissement des granulés en ces différents éléments devrait également compenser la baisse de l'appétit des animaux élevés en saison froide.

#### *La notion de pression partielle d'oxygène en aquaculture*

Finalement ces observations renforcent l'idée que lorsqu'on veut raisonner en terme de physiologie respiratoire, de régulation des échanges gazeux dans un contexte d'environnement aquatique (ou zootechnique comme dans ce travail), la parfaite connaissance et manipulation des termes de « concentration » et de « pression » est fondamentale. Rappelons encore une fois que l'oxygène diffuse d'un compartiment à un autre en suivant des gradients de pression et en aucun cas des gradients de concentrations. Ce rappel est à nos yeux totalement fondamental dans un monde de l'aquaculture où on ne raisonne encore que trop souvent en utilisant exclusivement la notion de concentration d'oxygène (exprimées en mg/L ou en ml/L) alors que les électrodes polarographiques qui servent pour ces mesures, mesurent d'abord des pressions.

#### *Application du protocole de transfert des géniteurs dans les écloseries.*

Nous avons déjà discuté des aspects pratiques de ce protocole dans un paragraphe situé plus haut, à la fin du résumé des principaux résultats. On doit simplement noter qu'à ce jour il est appliqué avec succès dans une ferme de production de larves (ou écloserie) située à Koné, dans la Province Nord de Nouvelle Calédonie. C'est dans cette écloserie que nous avons pu analyser les résultats de ce protocole. Le tableau VI.1 présente le protocole envoyé à l'Écloserie du Nord en octobre 2004.

Temps jours	0	1 et 2	3	4	5	6	7
	Pêche						
Femelles	26 °C 26 ‰ Jeûne	26 °C 26 ‰ Jeûne	26 °C 26 ‰ Nourrissage	Epédon- culation 26 °C 26 ‰ Jeûne	26 °C 26 ‰ Nourrissage (PM)	26 °C Remontée S ‰ Jeûne	Montée T °C →29°C 35 ‰ Nourrissage
Mâles	26 °C 26 ‰ Jeûne	26 °C 26 ‰ Jeûne	26 °C 26 ‰ Nourrissage (13h)	26 °C Remontée S ‰ (AM) Jeûne	26 °C 35 ‰ Nourrissage	26 °C 35 ‰ Nourrissage	26 °C 35 ‰ Nourrissage

Tableau VI 1 : Fiche protocole envoyée à l'Écloserie du Nord en octobre 2004.

A notre connaissance l'Écloserie du Nord qui était à cette époque en phase de réorganisation a équipé ses bacs de géniteurs de façon à pouvoir appliquer notre protocole intégralement. Nous savons que le protocole a également été testé dans deux autres écloseries commerciales mais les résultats n'étaient pas disponibles au moment de la rédaction de ce document.

#### 4. Perspectives

##### *Développement en écophysiologie*

Nous prévoyons de tester l'hypothèse de la crise cardiaque pour confirmer la phase finale aboutissant à la mort suite à une pêche-manipulation-transfert en période hivernale.

Il sera intéressant pour le futur d'explorer le comportement physiologique des animaux pour des expositions à des températures supérieures à 30 °C. En effet, en Nouvelle Calédonie, pendant la période estivale l'observation de telles températures est de plus en plus fréquente.

##### *Méthode d'échantillonnage sanguin*

Du point de vue de la recherche et des expérimentations, nos résultats doivent clairement alerter sur les possibles biais des protocoles de mesures de l'état de stress des pénéides. Il est évident que le simple fait de manipuler l'animal, même avec le plus grand soin, peut avoir un impact énorme sur sa réponse physiologique. Les prélèvements doivent être réalisés de façon « ultra-rapide » et/ou après acclimatation aux nouvelles conditions expérimentales.

##### *Avancées technologiques pour la crevetticulture :*

L'outil croissance – ration va permettre de quantifier les besoins nutritifs des animaux en fonction des conditions d'élevages. Il permettra, outre une formulation ciblée des aliments, de définir des rations et une stratégie d'alimentation optimisés pour chaque saison et chaque phase de la production. Ces évolutions devraient entraîner à terme une meilleure transformation de l'aliment avec pour corollaire une diminution des déchets responsables de la pollution des élevages. Quand on sait qu'en Nouvelle-Calédonie l'aliment représente jusqu'à 40% du prix de revient de la crevette une économie sur ce poste de coût doit être



clairement affichée comme une priorité de la recherche et l'outil que nous avons développé devrait y contribuer.

Une meilleure connaissance des valeurs de consommation d'oxygène des animaux devrait permettre de mieux comprendre et évaluer les besoins en oxygène des bassins en fonction de leur charge. L'outil chambre à métabolisme mis en place à la station de St Vincent va permettre de mesurer avec une très grande précision les effets sur le métabolisme de l'animal de différentes compositions d'aliments et des variations de quelques paramètres fondamentaux de l'environnement (oxygène, pH, salinité).

Les techniques d'écophysiologie et physiologie respiratoire développées dans ce travail, et en particulier le développement méthodologique réalisé sous la forme "laboratoire de terrain" en utilisant la technologie des optodes, rend maintenant possible la réalisation d'un véritable bilan de santé sur site de type « exploration fonctionnelle ». Le développement d'un tel service sera bien sûr toujours très lourd et coûteux (matériel sophistiqué, nombre de personnel spécialisé important), mais nous avons démontré qu'il est réalisable. Grâce aux techniques mises en jeu, un tel bilan peut être accompli sur une journée. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle possibilité est offerte de façon réaliste en aquaculture. Dans les cas d'élevage comme celui des pénéidés, à très forte valeur ajoutée, c'est évidemment un plus pour les fermiers qui en demanderait l'application.

L'ensemble de ces technologies correspond donc à un renforcement du potentiel de recherche et d'analyse dans le domaine de la crevetticulture des pénéidés sur le territoire Néo-Calédonien. Il devrait donc participer à conférer à la Nouvelle Calédonie des avantages tout à fait intéressants pour la gestion des fermes d'élevage de crevettes dans le futur. C'est ce qui a déjà été démontré dans le cas de la gestion des géniteurs en écloserie.



## **BIBLIOGRAPHIE**



BIBLIOGRAPHIE

*Pour les références citées dans les articles, se rapporter à la bibliographie de chacun d'eux.*



- Alday de Graindorge et Flegel (1999) Les étapes du cycle de vie des crevettes Pénéides. (illustration d'après : Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) CD-rom, FAO et Multimedia Asia Co., Ltd. éditeur)
- Arudpragasam, K. and Naylor, E. (1964). Gill ventilation and the role of reversed respiratory currents in *Carcinus maenas*. J. Exp. Biol. 41: 299-307.
- Brett, J.R., (1979). Environmental factors and growth. In: Fish Physiology (Eds. Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, JR.), Vol. 8, pp. 599-675. Academic Press, New York., NY.
- Bridges, C.R., (1983) PO<sub>2</sub> and oxygen content measurements in blood samples using polarographic oxygen sensor. In Polarographic Oxygen Sensors (Eds. by Gnaiger, E. and Forstner, H.), pp. 219-233. Heidelberg Springer.
- Bridges, C.R. (2001). Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. J. Exp. Biol. 204: 1021–1032.
- Brunson, J.F., Romaine, R.P., Reigh, R.C. (1997). Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. Aquaculture nutrition 3: 9-16.
- Catacutan, M.R. (1991). Apparent digestibility of diets with various carbohydrate levels and the growth response of *Penaeus monodon*. Aquaculture 95 (1-2): 89-96.
- Ceccaldi, H.J. (1997). Anatomy and physiology of the digestive system. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6 (Eds. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 261-291. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Charmantier, G. (1979). L'ionorégulation et l'osmorégulation chez les Crustacés : généralités, influences écologiques et physiologiques. Océanis, 5, fasc.5: 753-768.
- Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J.-P. (1989). Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. European Aquaculture Society special Publication 10: 65-66.
- Charniaux-Cotton H. (1985). Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. American Zoologist 2: 197-206.
- Charniaux-Cotton, H. and Payen, G. (1988). Crustacean reproduction. In: Endocrinology of selected invertebrate types (Eds. by Laufer, H. and Downer, R.G.H.), pp 279-304. Alan R. Liss, Inc. New York.



- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Lemoullac, G., Galois, R., Martin J.L.M. (2001). Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeids prawns to environmental stress ? *Aquaculture Research* 32: 91-94.
- Chim, L.; Lucien-Brun, H.; LeMoullac G. (2002). Marine shrimp farming. Fisheries and Aquaculture: Towards Sustainable Aquatic Living Resources Management, in Knowledge for sustainable development. *An Insight into the ENCYCLOPEDIA OF LIFE SUPPORT SYSTEMS* Volumes II, 1059p. UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, UK.
- Clemens, S., Massabuau, J.-C., Legeay, A., Meyrand, P., Simmers, J. (1998). *In vivo* modulation of interacting central pattern generators in lobster stomatogastric ganglion : influence of feeding and partial pressure of oxygen. *J. Neurosciences*. 18 (7): 2788-2799
- Clemens, S., Massabuau, J.C., Meyrand, P., Simmers, J. (1999). Changes in motor network expression related to moulting behaviour in lobster: role of moult induced deep hypoxia. *J. Exp. Biol.* 202: 817-827
- Corbari, L (2004). Physiologie respiratoire, comportementale et morpho-fonctionnelle des ostracodes Podocopes et Mydocopes et d'un amphipode caprellidé profond. Stratégies adaptatives et implications évolutives. Thèse de Doctorat. Université Bordeaux 1. 134 p.
- Corbari, L., Carbonel P., Massabuau J.-C. (2004). How was the low tissue O<sub>2</sub> strategy maintained in early crustaceans ? The example of the podocopid ostracods. *J. Exp. Biol.* 207: 4415-4425.
- Corbari, L., Carbonel P., Massabuau J.-C. (2005) The early life history of tissue oxygenation in crustaceans: the strategy of the mydocopid ostracod *Cylindroleberis mariae*. *J. Exp. Biol.* 208: 661-670.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legourmellec, M., Grimont, P. (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164: 297-309.
- Cuzon G., Guillaume J. (1997). Energy and protein: energy ratio. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6 (Eds. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 51-70. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Dejours, P. 1981. Principles of comparative respiratory physiology. (Ed. Elsevier), 265p, Amsterdam, New-York, Oxford.



- Della Patrona, L., Brun, P., Capo, S., Chim, L., Martin, J.L.M. Contribution de la productivité naturelle du milieu d'élevage à la production de la crevette *P. stylirostris* : influence de la saison et de quelques pratiques zootechniques, *en préparation*.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Eclancher, (1972). Action des changements rapides de PO<sub>2</sub> de l'eau sur la ventilation de la truite et de la tanche. *J. Physiol.* 65: 397-402A
- Forgue, J., Burtin, B., Massabuau J.-C. (1989). Maintenance of oxygen consumption in resting teleost *Silure glanis* at various levels of oxygenation. *J. Exp. Biol.* 143: 305-319.
- Forgue, J., Truchot, J.-P., Massabuau, J.-C. (1992). Low arterial Po<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood O<sub>2</sub> affinity. *J. exp. Biol.* 170: 257-264.
- Glencross, B.D., Smith D.M., Thomas, M.R., Williams K.C. (2002). The effects of dietary lipid amount and fatty-acid composition on the digestibility of lipids by the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 205: 157-169.
- Goarant, C., Herlin, J., Ansquer, D., Brizard, R., Marteau, A.L. (2004). *Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives. In : Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003 (Ed. Ifremer), pp 203-209. Actes Colloq., 38.
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A.L., Martin, C., Martin, B. (2000). Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 40: 101-107.
- Godin, D. M., Carr, W.H., Hagino, G., Segura, F., Sweeney, J.N., Blankenship, L. (1995). Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 139: 243-248.
- Grassé, P.P. (1994). *Traité de zoologie. Morphologie, physiologie, reproduction, systématique*, vol. VII (Ed. Masson), 917p. Paris, Milan, Barcelone.
- Houlihan, D.F., Waring, C.P., Mathers, E., Gray, C. (1990). Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiol. Zool.* 63: 735-756.
- INRA, (1989). *Alimentation des monogastriques*, 2<sup>ème</sup> éd., 160p.



- Ishii, K., Massabuau, J.C., Dejours, P. (1989). Oxygen-sensitive chemo-receptors in the branchio-cardiac veins of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Respir. Physiol.*, 78: 73-81.
- Jobling, M. (1981). The influence of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. *J. Fish Biol.* 18: 345-400.
- Keller, R., Sedlmeier, D. (1988). A metabolic hormone in crustaceans: the hyperglycemic neuropeptide. In: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, vol. II (ed. Laufer H. and Downer R.G.H.), pp. 315-326. New York.
- Kim, J.D. and Kaushik, S.J. (1992). Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106:161-169.
- Krogh, A. (1939). *Osmotic regulation in aquatic animals*. Cambridge University Press, Cambridge, 242 p.
- Lallier, F., and Truchot, J.P. (1989) Modulation of hemocyanin oxygen-affinity by L-Lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus*. *J Exp. Biol.* 147: 133-146
- Le Moullac G., Haffner P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191:121-131.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L. (1997). Digestibility. In: *Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6* (Ed. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 194-260. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Lee, P.G., Meyers, S.P. (1997). Chemoattraction and feeding stimulation. In: *Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6* (Ed. by L.R. D'Abramo, D.E. Conklin & D.M. Akiyama), pp 292-352. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Legeay, A. and Massabuau, J.-C. (1999). Blood oxygen requirement in resting crab *Carcinus maenas* 24 hours after feeding. *Canad. J. Zool.* 77: 784-794
- Legeay, A. and Massabuau, J.-C. (2000a). The ability to feed in hypoxia follows a seasonally dependent pattern in shore crab *Carcinus maenas*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 247:113-129
- Legeay, A. and Massabuau, J.-C. (2000b). Effect of water salinity on resistance to hypoxia in resting green crab *Carcinus maenas* after feeding. *Marine Biol.* 136: 387-396
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.-A., Chim, L. (2002). Combined effects of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub-adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209: 307-317.



- Lignot, J.-H. (1995). La capacité osmoréglatrice chez *Penaeus stylirostris* et *Penaeus vannamei*. Rapport interne Ifremer à diffusion limitée, 30p.
- Lin H.ZZ., Guo Z., Yang Y., Zheng, W., Zhuojia J.L. (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boon. *Aquaculture Research*, 35: 1441-1447.
- Mason, R.P., Mangum, C.P., Godette, G. (1983). The influence of inorganic ions and acclimation salinity on hemocyanin-oxygen binding in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biol.Bull.* 164: 104-123.
- Massabuau, J.-C. (1984). Etude des mécanismes de la régulation respiratoire chez l'écrevisse. Thèse d'Etat, 181 p., Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Massabuau, J.-C. (2001). From a low blood- to low tissue-oxygenation strategy, an evolutionary theory. *Respir. Physiol.* 128 (3): 249-262.
- Massabuau J.-C. (2003). Primitive, and protective, our cellular oxygenation status ?, *Mech. Ageing Develop.*, 124: 857-863.
- Massabuau, J.-C. and Burtin, B. (1984). Regulation of the oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* : role of the peripheral O<sub>2</sub> chemoreception. *J. Comp. Physiol. B.* 155: 43-49.
- Massabuau, J.-C. and Forgue, J. (1996). A field vs laboratory study of blood O<sub>2</sub>-status in normoxic crabs at different temperatures. *Canad. J. Zool.* 74 (3): 423-430.
- Massabuau, J.-C., Eclancher, B., Dejourn, P. (1980). Ventilatory reflex response to hyperoxia in the crayfish, *Astacus pallipes*. *J. Comp. Physiol.* 140: 193-198.
- Massabuau J.-C., Burtin B., Weathly M., (1991). How is O<sub>2</sub> consumption maintained independent of ambient oxygen in mussel *Anodonta cygnea* ? *Respir. Physiol.* 83: 103-114.
- McGaw, I.J. (2005) Does feeding limit cardiovascular modulation in the Dungeness crab *Cancer magister* during hypoxia? *J. Exp. Biol.* 208: 83-91.
- Mente, E., Legeay, A., Houlihan, D. and Massabuau, J.-C. (2003). Influence of oxygen partial pressures on protein synthesis in feeding crabs. *Am. J. Physiol. : Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 284: R500 -R510
- Mermoud, I., Costa, R., Mari, J., Bonami, J.R., Hasson, K., Lightener D.V. (1998). Investigations of *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New caledonia, exploring a viral hypothesis. *Aquaculture* 164: 311-322.



- Millero, F.J., Pierrot, D., Lee, K., Wanninkhof, R.F., Sabine, C.L., Key, R.M., Takahashi, T. (2002). Dissociation constants for carbonic acid determined from field measurements. *Deep-Sea Research I* 49: 1705-1723.
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A., Rosas, C. (1998). Effect of temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquaculture Soc.* 29: 447-484.
- Péqueux, A., Gilles R., Marshall W.S. (1988). NaCl transport in gills and related structures. 1- invertebrates, 2- Vertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology, Vol1 : NaCl transport in epithelia.* (Ed. by Greger, R.), pp.1-73. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Robertson, J.D. (1960). Osmotic and ionic regulation. In: *The Physiology of Crustacea, Vol.1: Metabolism and Growth* (Ed. By Waterman T.H.), pp. 317-339. Academic Press, New York, London .
- McNeil, R. (2005). Shrimp behaviour 101. *Shrimp News International.* <http://www.shrimpnews.com/McNeil.html>.
- Rosenberry, R. (2004). *World Shrimp Farming 2004.* Shrimp News International, San Diego, CA, USA, 276 p.
- Santos, E.A., Nery, L.E.M., Keller, R, Goncalves, A.A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol. Zool.* 70: 415-420.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J Exp Biol* 206: 979-988.
- Shigueno, K. (1975). *Shrimp culture in Japan.* Ed. by Association for International Technical Promotion.
- Spanings-Pierrot, C., Soyez, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., Charmantier, G. (2000). Involvement of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 340-350.



- Spanopoulos-Hernandez, M., Martinez-Palacios, C.A., Vanegaz-Perez, R.C., Rosas, C., Rosse, L.G. (2005). The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture* 244: 341-348.
- Sumule, O., Koshio S., Teshima, S.-I., Ishikawa, M. (2003). Energy budget of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae fed highly unsaturated fatty aci-enriched and non-enriched *Artemia nauplii*. *Fisheries science*, 69: 706-7015.
- Tacon, A.G.J. (1996). Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming sytems. *Aquaculture Nutrition* 1: 165-174.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster,.I.P., Decamp O.E. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8: 121-137.
- Taylor, A.C., Morris, S., Bridges, C.R. (1985). Modulation of haemocyanin oxygen affinity in the prawn, *Palaemon elegans* (Rathke) under environmental salinity stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol 94, Issues 1-3: 167-180
- Thuet, P. (1979). L'ionorégulation et l'osmorégulation chez les Crustacés: aspects physiologiques. *Océanis*, 5, Fasc. 5 : 769-797.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C. (2000). Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* 78: 2027-2036.
- Truchot, J.P. (1978). Variations de la concentration sanguine d'hémocyanine fonctionnelle au cours du cycle d'intermue chez le crabe *Carcinus maenas*. *Arch. Zool. exp. gén.* 119: 265-282.
- Truchot, J.P. (1971). Fixation de l'oxygène par le serum de *Carcinus maenas*. *C. R. Acad. Sci Paris* 272: 984-987.
- Truchot, J.P. (1973). Fixation et transport de l'oxygène par le sang de *Carcinus maenas* : variations en rapport avec diverses conditions de température et de salinité. *Neth. J. of Sea Res.* 7: 482-495.
- Truchot, J.P. (1975). Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affitnity of the hemocyanin in the *Carcinus maenas*. *J. Physiol.* 24: 173-189.



- Truchot, J.P. (1980). Lactate increases of the oxygen affinity of crab hemocyanin. *J. Exp.Zool.* 214: 205-208.
- Truchot, J.P., Duhamel-Jouve, A. (1980). Oxygen and carbon dioxide in the marine intertidal environment : diurnal and tidal changes in rockpools. *Respir. Physiol.* 39: 241-254.
- Truchot, J.P. and Lallier, F.H. (1992) .Modulation of the oxygen-carrying function of hemocyanin in the Crustaceans. *News Physiol. Sci.* 7: 49–52.
- Vanderkooi, J.M., Erecinska, M., Silver, I.A. (1991). Oxygen in mammalian tissue: methods of measurements and affinities of various reactions. *Am. J. Physopl.* 260: C1131-C1150.
- Wyban J., Walsh W.A., Godin D.M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138: 267-279



**Etude physiologique du métabolisme respiratoire et nutritionnel chez la crevette pénéidée *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie.**

**RESUME.** La crevetticulture est la 2<sup>ème</sup> production d'élevage en Nouvelle Calédonie et le 2<sup>ème</sup> secteur à l'exportation. Par l'analyse sous-jacente des caractéristiques physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris*, nous avons étudié les caractéristiques remarquables de son métabolisme (nutrition et respiration) afin d'améliorer les pratiques d'élevage et de rechercher les causes de la fragilité de l'espèce en dessous de 20-22°C. Nous avons développé un outil de gestion d'apport de l'aliment pour optimiser sa consommation par l'animal et sa gestion par les fermiers. Cette gestion est particulièrement importante pour mieux maîtriser la tendance à l'eutrophisation des bassins. Une analyse des besoins métaboliques et des mécanismes de transport d'O<sub>2</sub> aux limites du preferendum thermique de l'espèce a mis en évidence l'étape limitant ses capacités de résistance au stress à 20 °C. La stratégie des faibles états d'oxygénation dans le sang et les tissus connue chez les poïkilothermes joue ici un rôle qui apparaît mortel. La compréhension de ces mécanismes et leur application dans le cadre d'un protocole de type « technologie douce » dans les écloséries, a permis de diminuer la mortalité des géniteurs de 70 à 2-5 % et d'augmenter la quantité de larves produites.

Mots clés: *Litopenaeus stylirostris*, crustacé, pénéidé, oxygène, osmorégulation, nutrition, aquaculture.

**Ecophysiological study of respiratory and nutritional metabolism of penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Application to shrimp aquaculture in New Caledonia.**

**ABSTRACT.** In New Caledonia, shrimp farming is the second farmed production and the second export of the country. By underlying analysis of the physiological characteristics of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*, we studied the highlighted features of its metabolism (nutrition and respiration) in order to improve rearing practices and to search for the causes of the species weakness below 20-22°C. We have developed a feeding strategy to optimize meals intake by the shrimp, and feed management by the farmer. Feed management is crucially important to better control the risk for pond eutrophication. An analysis of metabolic requirements and O<sub>2</sub> transport mechanisms, at the temperature preferendum limits of the species, underlined the stage where the shrimp capability to resist stress at 20°C was reduced. The strategy of low oxygenation state in blood and tissues, well known in poikilotherms, played in that case a lethal role. The understanding of these mechanisms and their application within a newly developed method called "soft technology", in commercial hatcheries lowered dramatically broodstock mortality from 70 to 2-5% and increased the number of produced larvae.

Key words: *Litopenaeus stylirostris*, crustacean, penaeid, oxygen, osmoregulation, nutrition, aquaculture.

