



Etude de l'ingestion et
de l'assimilation chez *P. stylirostris*
à l'aide d'un marqueur formaldéhyde C14
Essai de modélisation

AQUACOP, J.M. AMOUROUX et G. CUZON

- Avril 1994 -



IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL09998

E 131
AQU-E

Centre Océanologique du Pacifique

B.P. 7004 TARAFAO - TAHITI - Polynésie Française
Tél. 57.12.74 - Télécopie : (689) 57.24.77

Etude de l'ingestion et
de l'assimilation chez *P. stylirostris*
à l'aide d'un marqueur formaldéhyde C14
Essai de modélisation

AQUACOP, J.M. AMOUROUX et G. CUZON

- Avril 1994 -

**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE
POUR L'EXPLOITATION DE LA MER**

Adresse : IFREMER
BP 7004
TARAVAO
Tahiti-Polynésie Française

**DIRECTION DES RESSOURCES
VIVANTES**
DEPARTEMENT RESSOURCES AQUICOLES
STATION/LABORATOIRE TAHITI

AUTEUR (S): AQUACOP, G. CUZON et J.M. AMOUROUX	CODE: <u>DRV/AQ/TAH 94.75</u>
TITRE : Etude de l'ingestion et de l'assimilation chez P. stylirostris à l'aide d'un marqueur formaldéhyde ¹⁴C - Essai de modélisation.	date : 13 Juin 1994 Tirage : 20
	Nb pages : 30 Nb figures : 16 Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° :	DIFFUSION : Libre <input type="checkbox"/> Restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME : L'utilisation d'éléments marqués en biologie marine ouvre la voie à l'étude des mécanismes d'ingestion et d'assimilation des aliments par les mollusques et les crustacés. En associant expérimentation et modélisation, ces recherches apportent une contribution importante à la connaissance des échanges entre l'animal et son milieu (aliment, substances dissoutes, gaz carbonique, bactéries). Les modèles analogiques utilisés comme outil de simulation et de calcul permettent de mieux comprendre les mécanismes d'ingestion et d'assimilation chez les crevettes en élevage expérimental.

ABSTRACT : Labelled compounds open the way to the study of feed intake mechanisms and assimilation by mollusks and crustacean. When coupling bioassay and modelling, those studies will bring consistent input to the knowledge of fluxes between the animal and its environment (feed, dissolved substances, CO₂, bacteria). Analog models are used as tool to better understand feed intake and assimilation in shrimp cultured in tanks.

mots clés : *P. stylirostris* - ingestion - assimilation - ¹⁴C
key words: *P. stylirostris* - feed intake - metabolism - ¹⁴C

Remerciements

L'étude a pu être réalisée grâce à la coopération étroite du Laboratoire d'Etude et de Surveillance de l'Environnement (LESE) et de l'IFREMER.

L'équipe du LESE a mis à notre disposition un laboratoire parfaitement équipé ainsi que ses équipements pour l'analyse des échantillons (comptage en scintillation) . Le personnel du LESE a été d'un grand soutien pendant toute la période d'expérimentation.

L'équipe "milieu" de l'IFREMER Taravao a assuré avec beaucoup d'efficacité la préparation des crevettes nécessaires aux expérimentations permettant de réduire au minimum les aléas dûs aux essais sur les animaux vivants.

Enfin la Logistique, lourde pour ce type d'étude, les deux Centres étant distants de 52 km, a été réglée très efficacement par le service de roulage de l'IFREMER.

DIFFUSION

Interne

- COP/D
- COP/AQ
- AQUACOP
- Bibliothèque
- Minute

- IPSN/LESE (M. POLETIKO - Mme LANGOMAZINO)
- ORSTOM
- U.F.P. (C. PAYRI, A. PAYRE)

Extérieur

- IFREMER/BREST (R. METAILLER, A. DOSDAT)
- CREMA L'HOUMEAU (J.L. MARTIN)
- LABORATOIRE ARAGO (Banyuls sur mer - France)

SOMMAIRE

- Diffusion

- Remerciements

- Résumé

- Objectifs

I - Préparation de la nourriture

II - Protocole expérimental

III - Résultats

III-1 Comportement

III-2 Etude de la perte de radioactivité par les granulés

III-3 Etude de l'utilisation de la nourriture par les crevettes

IV - Discussion

IV-1 Expérimentation préliminaire

IV-2 Etude de la cinétique: durées 6h, 24h et 48h

V - Conclusions

VI - Programme 1995

Annexes

- Courbes de quenching
- Poids granulés à 1.7 μ Ci
- Poids granulés à 5.6 μ Ci
- Résultats brut des comptages
- Références bibliographiques

Liste des tableaux et figures

- Figure 1 Dispositif expérimental
- Figure 2 Analyse compartimentale - organigramme
- Figure 3 Perte de radioactivité des granulés simples dans l'eau
- Figure 4 Perte de radioactivité des granulés chauffés, dans l'eau
- Figure 5 Modèle ingestion/assimilation

- Tableau 1 Perte de radioactivité des granulés simples dans l'eau
- Tableau 2 Perte de radioactivité des granulés chauffés, dans l'eau
- Tableau 3 Expérimentation préliminaire: durée 5 heures
Données exprimées en radioactivité
- Tableau 4 Expérimentation préliminaire: durée 5 heures
Données exprimées en pourcentage
- Tableau 5 Manip 6 heures
Données exprimées en radioactivité
- Tableau 6 Manip 6 heures
Données exprimées en pourcentage
- Tableau 7 Manip 24 heures
Données exprimées en radioactivité
- Tableau 8 Manip 24 heures
Données exprimées en pourcentage
- Tableau 9 Manip 48 heures
Données exprimées en radioactivité
- Tableau 10 Manip 48 heures
Données exprimées en pourcentage
- Tableau 11 Cinétique des productions

RESUME

Communiqué de presse à l'occasion de la conférence de Mr Amouroux

Le Docteur J.M. AMOUROUX, chercheur au CNRS au Laboratoire Arago (Banyuls sur mer - FRANCE), en séjour de recherche à IFREMER pendant trois semaines, a présenté le Jeudi 17 Avril 1994 au Laboratoire d'Etude et de Surveillance de l'Environnement (LESE) à Mahina, une conférence sur l'utilisation des éléments marqués en biologie marine, afin d'étudier les mécanismes d'ingestion et d'assimilation des aliments par les mollusques et les crustacés. En associant expérimentation et modélisation, ces recherches apportent une contribution importante à la connaissance des échanges entre l'animal et son milieu (aliment, substances dissoutes, gaz carbonique, bactéries). Les modèles analogiques utilisés comme outil de simulation et de calcul permettent de mieux comprendre les mécanismes de filtration des mollusques comme la nacre ou l'ingestion et l'assimilation chez les crevettes en élevage expérimental. Une discussion suivra la conférence.

OBJECTIFS

Optimisation de la prise de nourriture par *Penaeus stylirostris*.

Les crevettes d'élevage consomment des granulés préparés industriellement. Ces granulés ne sont pas ingérés immédiatement mais sont manipulés par les crevettes avant ingestion. Cette manipulation provoque une perte de matière qui, n'étant pas ingérée par la crevette, sera perdue et contribuera donc à l'accumulation de matière organique au fond des bassins d'élevage. En étudiant d'une part la prise de nourriture et la perte de matière qui l'accompagne et d'autre part l'utilisation de la nourriture par les crevettes il est possible d'optimiser la qualité et la quantité de nourriture mise à la disposition des crevettes au cours de leur élevage.

Nous avons donc préparé des granulés de composition identique à ceux utilisés pour les élevages intensifs. Après marquage au ^{14}C nous les avons fournis aux crevettes afin de suivre l'ingestion et l'assimilation. Un bilan des pertes est possible à partir des mesures directes et de la modélisation des échanges dans le système crevettes-bac d'expérimentation.

I - Préparation de la nourriture

La nourriture se présente sous forme de granulés préparés industriellement. Ces granulés sont ingérés in toto par les crevettes. Il s'agit donc de reconstituer un granulé de taille et de composition identique mais auquel un marqueur radioactif a été incorporé.

Composition du granulé:

Mélange de 3,1 g d'eau + 2,5 g de poudre

Eau : eau déminéralisée + formaldéhyde C14

Poudre : farine de moule + farine de poisson + farine de calmar

Le mélange eau-poudre est réalisé dans un mortier jusqu'à obtention d'une pâte molle homogène. La pâte est introduite dans une seringue de 250 ml puis extrudée. Le cordon extrudé est posé sur un papier aluminium. Des morceaux de 1 cm de longueur sont coupés au scalpel. Les morceaux sont numérotés puis pesés et 10 sont conservés pour la mesure de radioactivité.

Deux types de granulés ont été préparés suivant ce protocole. Pour le premier essai la quantité de Formaldéhyde ^{14}C introduit a été différente: $250 \mu\text{Ci}$ et le séchage a été effectué à l'aide d'un ventilateur à air chaud à 50°C , dans premier essai, $500 \mu\text{Ci}$ et un séchage à l'air libre pendant 17 heures dans le deuxième essai.

II - Protocole expérimental

a)- Dispositif expérimental (Fig 1)

Le système expérimental comprend une série de 3 Erlen-Meyer de 5 litres de capacité, contenant chacun 5 litres d'eau de mer filtrée ($0,2\mu\text{m}$). Chaque flacon est fermé hermétiquement par un bouchon à 2 trous. L'aération est assurée par bullage léger, l'air sortant est conduit sur un piège à CO_2 contenant de l'éthanolamine.

b)- Durée des expériences

Les expériences durent 6, 24 et 48 heures.

c)- Les granulés

Une estimation de la radioactivité moyenne des granulés en fonction de leur poids est obtenue en hydrolysant des granulés de poids connu dans 10 ml d'eau filtrée, suivant la méthode citée plus haut. Deux aliquotes de 1 ml sont prélevés et analysés.

La mesure de la stabilité de la radioactivité de la nourriture (des granulés) est effectuée en plaçant des granulés dans de l'eau de mer filtrée. Une mesure de la radioactivité de l'eau de mer est effectuée à intervalles de temps définis: 2, 5, 10, 15 et 20 minutes. En fin d'expérience la totalité de l'eau est filtrée et les granulés sont collectés sur les filtres et analysés à partir d'aliquotes de 1ml après hydrolyse.

d)- Les animaux

Les crevettes de taille connue (8-10g), sont placées individuellement dans des récipients de 1 litre de capacité à raison de un individu par récipient, 17 heures avant le début de l'expérience. Elles sont nourries avec 1 seul granulé juste avant le début de l'expérience.

Les crevettes sont introduites par 3 dans chacun des Erlens.

Les crevettes ont été sélectionnées dans un élevage et conditionnée préalablement aux manipulations après isolement dans un bassin de faible capacité (500 litres). Un essai réalisé avec des crevettes de taille plus petite (2 grammes) mais non conditionnées n'a pas eu de succès. ces animaux stressés par les manipulations ont refusé de se nourrir.

e)- Analyses (Figure 2)

En fin d'expérience les compartiments suivants sont analysés: Crevettes, Eau, Particulaire, et CO₂. L'eau des Erlen est homogénéisée par agitation puis filtrée par aliquote de 1 litre. Le filtre et le filtrat sont analysés séparément. Les crevettes sont analysés après dissection.

Les crevettes

Elles sont découpées en deux parties (Thorax et Abdomen) et analysées individu par individu. Chaque partie est hachée et hydrolysée à la soude à 60°C pendant 24 heures. L'analyse de la radioactivité est faite sur 2 aliquotes de 1 ml.

L'eau

Après agitation vigoureuse de l'Erlen-Meyer les feces sont remis en suspension et peuvent être considérés comme répartis uniformément dans l'eau. Un aliquote de 1 litre est filtré sur 0,2µm.

200ml d'eau filtré sont acidifiés afin de déterminer la radioactivité perdu sous forme gaseuse (CO₂ des Bicarbonates et carbonates dissous).

Le particulaire

Le filtre est récupéré et hydrolysé à 60°C pendant 24 heures. Le filtrat est analysé à partir de deux aliquotes de 5 ml.

Le CO₂

Il est analysé à partir de deux aliquotes de 1 ml d'éthanolamine prélevés dans les pièges à CO₂

Deux séries d'expérimentations ont été réalisées: la première a duré quelques minutes et a permis de mesurer l'ingestion des granulés par les crevettes, la deuxième a duré 6, 24 et 48 heures afin de suivre la diffusion de la radioactivité dans le système Crevettes- eau de mer en fonction du temps.

La première série a été réalisée avec des granulés contenant 1,7 µC chacun tandis que pour la deuxième série les granulés contiennent 5,6 µC

III Résultats

III-1 Comportement

1er essai

Au cours du 1er essai, les crevettes sont nourries à l'aide des granulés introduits 1 par 1 dans chaque enceinte. Observation : dans tous les bacs A, B et C, 1 crevette prend 2 granulés, 1 crevette prend 1 granulé et 1 crevette ne prend pas de granulé, soit un poids moyen de 17 mg par granulé.

2ème essai : le choix de crevettes plus petites (taille 2 g) semblait plus approprié mais il y a eu refus de prise de nourriture car ces animaux étaient stressés par le transport et les manipulations diverses récentes.

3ème essai : les crevettes de taille 8-10 g ont été sélectionnées placées 17 avant dans des Erlen contenant 1 litre d'eau, séparées à raison de 1 crevette par Erlen, l'eau est aérée par bullage. Les granulés sont fournis 1 par 1 à chaque crevette. Seules les crevettes ayant ingéré le granulé en moins de 30 secondes sont retenues. Chaque granulé a un poids commun de l'ordre de 25 mg-30 mg/bac de 3 crevettes). Elles sont ensuite placées dans le bac expérimental par lot de 3.

III-2 Etude de la perte de radioactivité des granulés (Tableaux 1 et 2, Fig 3 et 4)

Les granulés utilisés ont été les suivants :

- n°69, 63, 42 dans erlen meyer A soit 81,2 mg de granulés fabriqués à partir de la dose initiale, $250 \mu\text{Ci} \times 2 = 500 \mu\text{Ci}$.

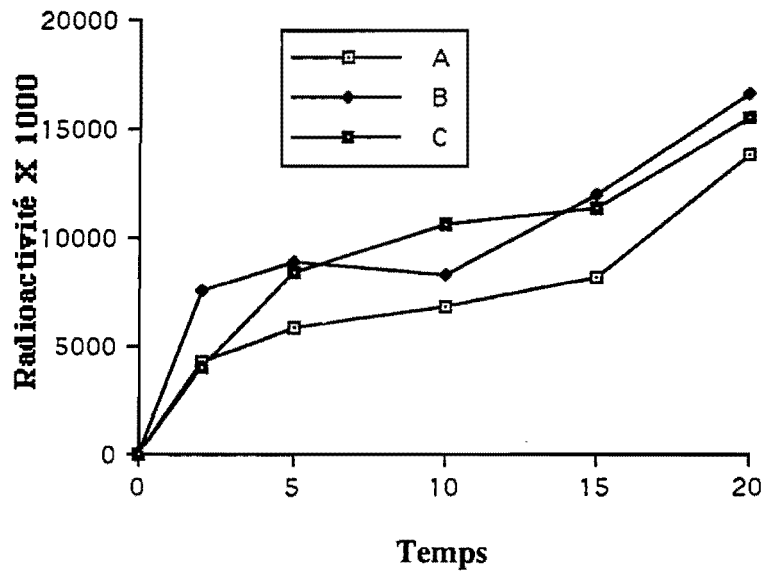
- n° 36, 50, 70 dans erlenmeyer B soit 79,9 mg de granulés

- n° 10, 28, 59 dans erlenmeyer C soit 81,3 mg de granulés

Tableau 1 représentant la perte de radioactivité des granulés simples en fonction du temps dans les trois erlen-meyer.

Temps	A	B	C
0	0	0	0
2	4300	7600	4000
5	5800	8900	8400
10	6800	8300	10600
15	8200	12000	11300
20	13800	16600	15500

Figure 3 Perte de radioactivité par les granulés simples
Granulés simples

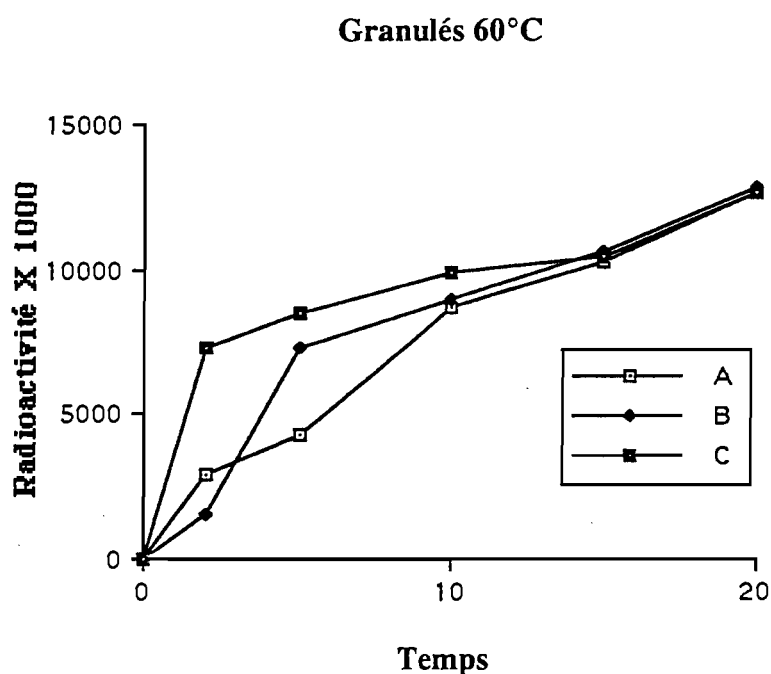


La courbe de perte d'activité des granulés en fonction du temps est présentée Figure 3. La diffusion du formaldéhyde au travers du granulé est un phénomène très rapide

Tableau 2 Perte de radioactivité en fonction du temps, des granulés chauffés à 60°C, dans les trois erlen-meyer.

Temps	A	B	C
0	0	0	0
2	2900	1600	7300
5	4300	7300	8500
10	8650	9000	9900
15	10200	10600	10450
20	12600	12800	12600

Figure 4 Perte de radioactivité en fonction du temps, par les granulés chauffés à 60°C



La perte de radioactivité sous forme dissoute représente de 4 à 25% en 2 minutes et de 44 à 51% en 20 minutes, de la radioactivité totale des granulés. Cette perte sous forme dissoute montre combien les molécules les plus petites peuvent diffuser rapidement au travers d'un granulé durci par la chaleur. Cela suppose a priori que d'autres molécules sont capables de passer en solution lorsqu'il s'agit de granulés industriels.

III 3 Etude de l'utilisation de la nourriture marquée par les crevettes

TABLEAU 3

Expérimentation préliminaire: durée 5 minutes
Données exprimées en radioactivité

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevette 1			
Abdomen	1.512	189.040	178.883
Thorax	2.706	5.124.595	5.696.474
Total	4.218	5.313.635	5.875.357
Crevette 2			
Abdomen	191.400	3.071	2.880
Thorax	2.697.870	7.140	26.587
Total	2.889.270	10.211	29.567
Crevette 3			
Abdomen	296.514	158.365	89.817
Thorax	5.408.153	2.459.180	2.611.917
Total	5.704.667	2.612.545	2.701.734
Total Crevettes	8.598.155	7.936.891	8.606.658
Eau Filtrée	1.050.000	1.050.000	1.474.000
Total enceinte	9.648.158	8.986.391	10.080.658

TABLEAU 4

Expérimentation préliminaire: durée 5 minutes
Données exprimées en pourcentage

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevettes	89,0 %	88,3 %	85,4 %
Eau filtrée	11,0 %	11,7 %	14,6 %

Etude de la cinétique du système

TABLEAU 5 :

Durée 6 heures: données exprimées en radioactivité

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevette 1			
Abdomen	1.381.067	1.179.046	1.038.517
Thorax	5.965.559	4.899.281	5.337.900
Total	7.346.626	6.078.327	6.376.417
Crevette 2			
Abdomen	1.140.869	1.212.584	932.063
Thorax	5.470.889	6.044.224	6.121.474
Total	6.671.758	7.256.808	7.053.357
Crevette 3			
Abdomen	1.038.801	625.408	939.177
Thorax	5.258.887	2.459.180	2.611.917
Total	5.704.667	4.100.885	4.843.130
Total Crevettes	20.255.972	18.061.428	19.212.081
Eau Filtrée	4.757.000	4.300.000	5.349.000
CO2 gaz	104.194	131.207	217.882
Filtres	15.305	37.475	35.300
Total enceinte	9.648.158	8.986.391	10.080.658
Eau décarbonatée	3.734.000	4.034.000	5.074.000
CO2 Dissous	1.023.000	131.207	217.882

TABLEAU 6 :

Durée 6 heures: données exprimées en pourcentage

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevettes 1			
A	5,5	5,2	4,2
T	23,7	21,7	21,5
Crevettes 2			
A	4,5	5,4	3,7
T	21,7	26,8	24,7
Crevettes 3			
A	4,1	2,8	3,8
T	20,9	18,2	19,5
Total Crevettes	80,6	80,2	77,4
Eau filtrée	18,9	19,1	21,6
CO2 gaz	0,4	0,6	0,9
Filtres	ξ	ξ	ξ
Total	100	100	100
Eau Décarbonatée	14,9	17,9	20,4
CO2 Dissous	4,0	1,2	1,1

TABLEAU 7 :

Durée 24 heures: données exprimées en radioactivité

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevette 1			
Abdomen	1.014.481	1.056.518	1.098.778
Thorax	5.375.989	5.145.162	4.829.165
Total	6.390.470	6.201.680	5.927.943
Crevette 2			
Abdomen	1.001.792	1.300.066	966.081
Thorax	4.513.222	5.395.464	4.581.798
Total	5.515.014	6.695.530	5.547.879
Crevette 3			
Abdomen	917.271	1.032.677	1.145.328
Thorax	4.103.960	4.377.632	4.896.272
Total	5.021.231	5.410.309	6.041.600
Total Crevettes	16.926.715	18.307.519	17.517.422
Eau Filtrée	8.969.000	8.225.000	8.967.000
CO2 gaz	987.675	1.344.202	1.282.905
Filtres	57.820	47.196	50.086
Total enceinte	26.941.210	27.923.917	27.817.413
Eau décarbonatée	7.974.000	7.717.000	8.238.000
CO2 Dissous	995.000	508.000	729.000

TABLEAU 8 :

Durée 24 heures: données exprimées en pourcentage

Enceinte expérimentale	A	B	C
Compartiment			
Crevettes 1			
A	3,8	3,7	3,9
T	20,0	18,4	17,4
Crevettes 2			
A	3,7	4,7	3,5
T	16,8	19,3	16,5
Crevettes 3			
A	3,4	3,7	4,1
T	15,2	15,7	17,6
Total Crevettes	62,8	65,6	63,0
Eau filtrée	33,3	29,5	32,2
CO2 gaz	3,2	4,8	4,6
Filtres	0,2	0,2	0,2
Total	100	100	100
Eau Décarbonatée	29,5	27,6	29,6
CO2 Dissous	3,7	1,8	2,6

TABLEAU 9 :

Durée 48 heures: données exprimées en radioactivité

Enceinte expérimentale	A	B
Compartiment		
Crevette 1		
Abdomen	637.776	679.391
Thorax	3.946.820	3.160.209
Total	4.484.595	6.201.680
Crevette 2		
Abdomen	607.060	529.928
Thorax	3.959.033	4.644.553
Total	4.566.093	5.174.481
Crevette 3		
Abdomen	665.337	4125.961
Thorax	4.196.063	3.409.551
Total	4.861.400	3.825.512
Total Crevettes	14.012.088	12.859.593
Eau Filtrée	9.292.000	8.848.000
CO2 gaz	3.253.278	3.461.464
Filtres	40.669	71.614
Total enceinte	26.598.035	25.220.671
Eau décarbonatée	8.751.000	8.510.000
CO2 Dissous	541.000	388.000

TABLEAU10:

Durée 48 heures: données exprimées en pourcentage

Enceinte expérimentale	A	B
Compartiment		
Crevettes 1		
A	2,4	2,7
T	14,8	12,5
Crevettes 2		
A	2,3	2,1
T	14,9	15,7
Crevettes 3		
A	2,5	1,6
T	15,8	13,5
<hr/>		
Total Crevettes	52,7	50,9
Eau filtrée	34,9	35,1
CO2 gaz	12,2	13,7
Filtres	0,2	0,3
Total	100	100
<hr/>		
Eau Décarbonatée	32,9	33,7
CO2 Dissous	2,0	1,4

IV - Discussion

a) Expérimentation préliminaire

Les résultats obtenus sont homogènes dans les 3 enceintes. On peut considérer que le phénomène observé est identique au-delà des différences individuelles d'ingestion. En effet les crevettes n'ont pas consommé les mêmes quantités cependant globalement on observe aucune influence sur le résultat. De 11 à 15 % de la radioactivité introduite dans les granulés se retrouve dans l'eau. Ce phénomène a lieu pendant la période de manipulation puis d'ingestion.

b) Etude de la cinétique: durée de 6, 24 et 48 heures

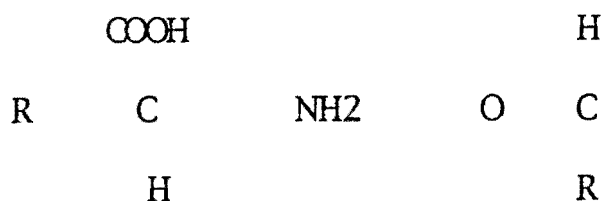
L'ingestion a lieu très rapidement puisque en moins de 30 secondes, la totalité du granulé est ingérée. La radioactivité diffuse entre le thorax et l'abdomen des crevettes en fonction du temps. La quasi totalité de la radioactivité est contenue dans le thorax (partie bucco oesophagienne du tube digestif), après ingestion soit de 85 à 90%. Ensuite elle diminue régulièrement: entre 18 et 27% après 6 heures, entre 15 et 20% à 24 heures et entre 12,5 et 16% après 48 heures. L'essentiel de la radioactivité se retrouve sous forme dissoute soit 11 à 15% en 5 minutes, 15 à 20% en 6 heures, 27 à 30% en 24 heures et 33% en 48 heures. Le CO₂ représente de 2 à 4% en 6 heures, de 5,5 à 7,2% en 24 heures et de 14 à 15% en 48 heures. Le CO₂ dissous représente moins de 2%

Le fait le plus marquant est l'absence de feces. Deux hypothèses peuvent être émises: soit la quantité de nourriture est insuffisante pour permettre la production de feces soit les crevettes consomment leurs feces à mesure de leur production.

Cette cinétique montre une diffusion rapide sous forme dissoute malgré l'ingestion du granulé. Cela suppose que la perte de radioactivité est due à un défaut de fixation du marqueur sur la matière organique du granulé. La méthode d'imprégnation s'avère donc peu fiable. Cependant le formaldéhyde est métabolisé par la crevette, que ce soit sous forme libre ou adsorbée sur la matière organique en effet la quantité de CO₂ produit en 48 heures est importante.

Il convient donc de reprendre le protocole de Lopez, cependant son défaut majeur réside dans le lessivage forcé de la matière organique testée donc la perte de composés faisant partie de la nourriture fournie. Le principe du marquage au formaldéhyde réside dans la capacité du formaldéhyde à se fixer sur les protéines et quelques autres molécules possédant des sites équivalents

L'attachement du formaldéhyde aux protéines du granulé peut être expliqué par l'équation suivante :



Ce type de réaction a lieu progressivement et il est possible que le rassisement du granulé entraîne une bien meilleure fixation du formaldéhyde aux extrémités NH₂ des protéines. Des essais complémentaires devraient permettre de vérifier cette hypothèse :

1) à Banyuls, sur des granulés passés à l'étuve à 60°C pendant 24 heures

2) à Tahiti, sur des granulés fabriqués et conservés plusieurs semaines

Ces granulés sont ensuite testés dans les mêmes conditions que précédemment c'est-à-dire placés dans de l'eau de mer dont on analyse la radioactivité en fonction du temps.

Tableau 11 : Cinétique des productions - Radioactivité mesurée, rapportée en %

	0	6	24	48
µCi "ingérés"/3 crevettes	5	16	16	16
Total crevettes	87.6	79	64	51
Eau	12.4	20	32	35
CO ₂	-	0.6	4	12.5
Filtres	-		0.2	0.3
Total manip.	100	100	100	100
Eau décarbonatée	-	18	29	33
CO ₂ dissous	-	2.1	2.7	1.8

Notons que dans l'essai réalisé sur granulés "frais" (fraîchement préparés, donc avec faible action d'attachement aux protéines), au bout de 20 minutes, la radioactivité mesurée dans l'eau indique une perte de l'ordre de 90% de la quantité introduite. Ceci représente toutefois une situation extrême car en général les granulés sont ingérés dans les quelques minutes qui suivent la distribution.

Les essais suivants : étude de l'assimilation de la partie protéique des granulés qui a fixé le formaldéhyde, ont été réalisés à 6, 24 et 48 heures. Les granulés distribués provenaient d'une seconde fabrication à partir de 2,5 g de poudre auxquels sont rajoutées deux doses de 250 μCi , ce qui donne 5.6 μCi par granulé avec une activité mesurée d'environ 10.000.000 coups. Les cinétiques sont rapportées au Tableau ci-dessus.

La décroissance d'activité dans les crevettes est importante, de 88 % à 51 % en 48 heures, ce qui traduit un passage du compartiment cephalothorax, à celui d'abdomen, avec catabolisme d'une fraction protéique à laquelle est attaché le formaldéhyde.

Cependant, l'observation de l'évolution du compartiment eau (qui mesure le dissous) : 12 à 35 % d'augmentation, traduit une diffusion de radioactivité peut être, à partir des fecès rejetés, en effet le compartiment "filtres" donne une indication sur ce point. Or ce compartiment (particulaire dans le modèle) reste très faible : les fecès doivent donc se disloquer dans l'eau ou être recyclés aussitôt par les crevettes.

Le CO₂ récupéré dans l'ethanolamine, augmente graduellement pour atteindre un maximum (13 %) à 48 heures. Dans l'eau, la part du CO₂ dissous reste faible (inférieure à 3 %) et traduit à 48 heures une acidification du milieu. Donc, la baisse du compartiment crevette s'explique par une incorporation faible de la fraction protéique par l'accrochage insuffisant du formaldéhyde C¹⁴ aux protéines. Le dissous présente une activité trop importante en fin d'essai ce qui traduit une élimination importante par les fecès et peut être par les branchies ?

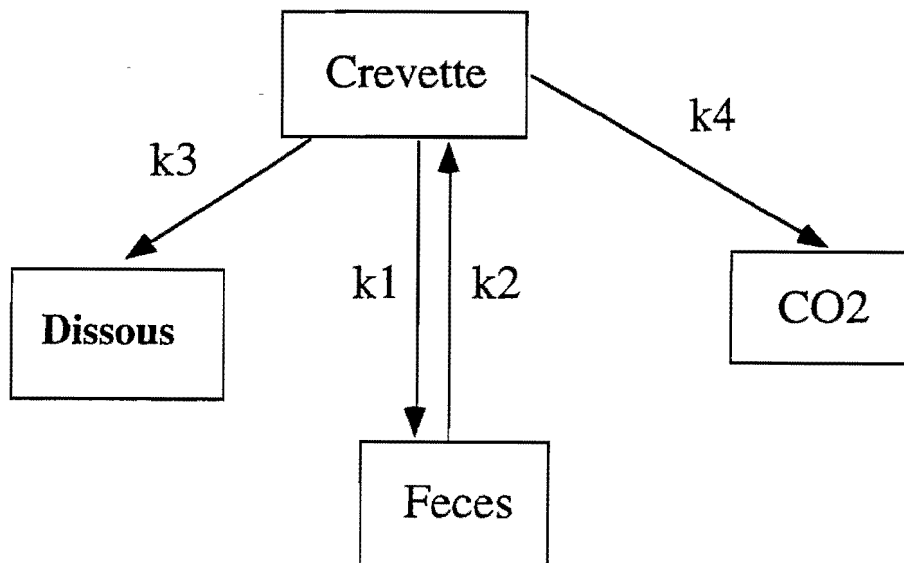
Il faudra reprendre un type d'expérimentations à partir de protéines qui auront été marquées au préalable selon une procédure qui fera l'objet du programme défini pour 1995 (voir partie programme).

Modélisation

La modélisation sera réalisée par le calcul analogique sur Logiciel Stella fonctionnant sur ordinateur MacIntosh. L'ajustement des constantes permettra de définir les vitesses de transfert entre les différents compartiments mais aussi les vitesses d'assimilation. Ce modèle sera amélioré de toute façon lors du prochain cycle d'expérimentation. Le marquage sera réalisé différemment: son efficacité sera améliorée en utilisant une autre technique donnant une fixation du marqueur sur la matière organique du granulé lui-même.

L'ajustement des constantes du modèle tiré des présentes expérimentations n'est réalisé qu'à titre d'exercice pour cette phase préliminaire du programme (Figure 5).

Figure 5: Modèle des échanges animal-eau chez *P. stylirostris* (Poids moyen 8 grammes)



$$\frac{d(\text{Crevettes})}{dt} = +k2.(\text{Feces}) - k1.(\text{Crevettes}) - k3.(\text{Crevettes}) - k4.(\text{Crevettes})$$

$$\frac{d(\text{Feces})}{dt} = +k1(\text{Crevettes})$$

$$\frac{d(\text{Dissous})}{dt} = +k3.(\text{Crevettes})$$

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = +k4. \text{Crevettes}$$

5 - Conclusion

L'étude menée en collaboration avec un chercheur du CNRS spécialisé en modélisation de microécosystème a permis de définir plusieurs points essentiels permettant de mesurer la consommation et l'utilisation des granulés par les crevettes, de rendre possible l'établissement d'un bilan de la matière organique utilisée et rejetée et a permis de jeter les bases d'un travail plus important sur les deux ou trois années à venir.

Ces différents points sont les suivants :

- observation précise du comportement alimentaire de la crevette vis-à-vis du granulé ;
- mesure de la vitesse d'ingestion et possibilité de calcul des pertes de matière par le brossage avant ingestion (trituration et perte de substances) ;
- acquisition de méthodes de marquage de la matière organique du granulé ;
- réalisation d'un modèle du bilan carbone dans le microsystème de l'expérimentation ;
- mesure de l'assimilation des protéines suivie par la cinétique de production du CO₂ ;
- difficulté de traiter correctement le compartiment fèces avec l'aliment utilisé hautement digestible.

Le travail plus important intégrera des essais en petits volumes avec marquage intime de la matière organique et des bilans carbone sans marqueur en bacs de 500 litres ou en bassins de 100 m² pour intégrer la composante bactéries et phytoplancton.

Toute cette approche au niveau de la mécanique de la prise de nourriture (ingestion) et de l'assimilation des protéines (indicateur CO₂ marqué) vise à terme des applications très pratiques touchant à la définition d'aliments (forme, texture, appétence, digestibilité) toujours mieux adaptés à l'animal et au système d'élevage, et à la contrainte de plus en plus forte de réduire au mieux les déchets résultant de ces élevages, déchets dans lesquels l'apport de l'aliment est pour l'instant trop grand.

Reste à étudier :

- La capacité des différentes espèces de pénéides (les 4 étudiées au COP) à ingérer un granulé en fonction de la morphologie de leurs appendices buccaux : il peut y avoir des différences d'une espèce à l'autre induisant au niveau du granulé des variations de diamètre, de texture et de dureté.
- La comparaison, au niveau de la gestion, d'aliments commerciaux pelletés et extrudés
- Une approche pour tests en laboratoire d'aliments hautement digestibles (amidon + CPSP + huile de poisson).

Ces études amèneront à clarifier des points tels :

- contribution de la productivité naturelle dans la croissance des crevettes. Les essais à Noirmoutier, en associant les isotopes N15 et C13 avaient montré que dans les marais, la crevette japonaise dérivait l'essentiel de sa nourriture de la productivité naturelle du bassin et non pas du granulé distribué. Il serait intéressant de voir le même type d'approche dans des bassins type Sodacal de 10 hectares, avec le fond réduit et une productivité naturelle très limitée : la contribution de l'aliment doit très probablement être importante et une insuffisance de qualité nutritive de ce granulé peut expliquer, en partie, certains faibles rendements que l'on observe actuellement. L'équilibre en apport de nutriments dû au granulé et apport complémentaire par la productivité du milieu n'existant plus, la "carrying capacity" du bassin se réduit et les rendements de bassins en fonctionnement depuis des années ont tendance à chuter .

Cela conduit à s'interroger sur deux stratégies :

- 1 - pour des bassins âgés ;
- 2 - pour des bassins neufs.

en ce qui concerne le rationnement, les caractéristiques physiques et nutritionnelles de l'aliment granulé, les densités d'élevage et la gestion de la masse d'eau.

La stratégie nutritionnelle allant de pair avec la gestion des déchets d'aquaculture, semble être celle d'une utilisation d'aliments peu polluants comme cela se fait en salmoniculture ou en pisciculture plus généralement. Il s'agit de trouver des présentations d'aliment qui limitent le broyage par la crevette (aspect technologique) et le réaliser des formulations d'aliments hautement digestibles donc permettant de

réduire la production de fecès, tout en maintenant des performances de croissance optimales. Ainsi, une combinaison de CPSP, d'amidon de blé et d'huile de poisson, représenterait une solution possible. Cependant, si l'attraction vis-à-vis d'un tel mélange semble garantie, il reste le problème de la stabilité à l'eau.

La stabilité à l'eau représente un autre facteur important d'équilibre du système. Si en élevage intensif, l'éleveur se contente d'une tenue moyenne en raison de la préhension quasi immédiate du granulé distribué, il n'en est pas de même pour les crevettes élevées en semi-intensif dans un bassin de 10 ha. Il faut dans ce cas, fractionner les distributions d'aliment, rester sur l'ad libitum, disposer d'un granulé stable 30' à 1 heure dans l'eau et enfin donner suffisamment de phagostimulation grâce à des substances attractantes qui réduiront le temps de séjour du granulé dans l'eau.

Il découle, de l'ensemble de cette étude, des vérifications, essais et protocoles qui peuvent faire l'objet d'un ou plusieurs stages. Ainsi, les caractères morphologiques des appendices masticateurs des pénéides peuvent-ils être examinés d'une espèce à l'autre ; la texture des granulés sur la vitesse d'ingestion et les perspectives d'une fabrication industrielle d'aliments extrudés à défaut d'aliments pellets de petit diamètre (1 mm) ; la restructuration des fonds de bassins d'élevage en jouant sur les équilibres de la formule, par exemple par ajout de minéraux, enfin la réalisation d'aliments hautement digestibles (CPSP, amidon, huile de capelan,...) et procurant à la crevette les acides aminés essentiels en quantité appropriée et l'énergie digestible.

Toutes ces informations, associées à des études fines à l'aide de marqueurs devraient aboutir à proposer de nouvelles stratégies nutritionnelles, visant à préserver l'environnement et l'équilibre du bassin d'élevage lui-même.

6 - Programme 1995 : Ingestion/métabolisme

Le travail que nous avons commencé sera continué et complété. Il est nécessaire d'envisager d'une part la comparaison de plusieurs espèces entre elles et d'autre part de définir des nourritures mieux adaptées tant du point de vue qualitatif que quantitatif. La présentation sous forme de granulés n'est pas remise en cause mais les dimensions de ces granulés devront être différentes.

Le marquage de la nourriture testée sera réalisé à partir du formaldéhyde ^{14}C et à partir de chair de moule marquée au ^{14}C . Les expérimentations menées au laboratoire seront traitées à l'aide d'un modèle analogique (cinétique) afin de mieux connaître les vitesses d'assimilation de la nourriture et la production des rejets du métabolisme. L'étude simultanée des bilans carbone et azote de 4 bacs d'élevage intensif permettra de suivre l'évolution des apports de nourriture et de la croissance des crevettes ainsi que la production des rejets particulaire et dissous et des suspensions vivantes dans les mésocosmes que constituent ces enceintes.

1) Espèces étudiées

	<i>P. stylirostris</i>	<i>P. vannamei</i>	<i>P. monodon</i>
Ingestion	totale	-	-
Lessivage	nul	-	-
Assimilation par CO_2 rejeté	-	-	-
Bilan	ok	-	-

- 2 Caractérisation des aliments:

Texture des aliments : secs, semi-humides

- Taille: diamètre : 0.8 - 1.2 mm
 longueur : 1 cm

-3) Composition et marquage des Granulés

A) (formaldehyde C¹⁴ (Méthode de Lopez)

Après broyage de granulés du commerce ou mieux des ingrédients de base sans les adjuvants (liants, vitamines) , puis marquage au formaldéhyde (48 heures) et rinçage (Charles, 1994) les granulés sont reconstitués à la presse à pastiller, après ajout de liant, vitamines. L'attractant est ajouté directement sur le granulé.

B) Chair de moule

Le marquage de la chair de moule est réalisé en utilisant une microchaîne alimentaire constituée d'algues unicellulaires et de moules. Les algues unicellulaires (genre Pavlova) sont cultivées en milieu de culture enrichi au ¹⁴C bicarbonate de Sodium. Après centrifugation les algues sont remises en suspension et fournies aux moules (Moules de Nouvelle-Zélande). Après 15 jours à 1 mois d'élevage dans ces conditions de nutrition exclusives, les moules sont sacrifiées. La chair des moules peut alors être lyophilisée puis broyée. L'utilisation de la chair de moules en poudre peut être faite soit sous forme de granulés de chair de moules seule soit intégrée en remplacement de la chair de moules dans les granulés identiques aux granulés industriels. Après alimentation des crevettes à l'aide de granulés marqués au ¹⁴C il est possible d'établir un bilan complet de l'utilisation des granulés à partir de la modélisation du système expérimental.

-4) Bilan carbone/Azote des bacs d'élevage intensif

Quatre bacs d'élevage intensif sont mis en service simultanément dans des conditions identiques (capacité, débit d'eau, exposition, oxygénation...). Les crevettes introduites dans chacun des bacs sont identiques en taille et en nombre (biomasse). La nourriture introduite chaque jour dans chacun des bacs est la même en qualité et en quantité réunis. Chaque mois un bac est vidé. Les crevettes dénombrées, pesées, l'eau analysée (dissous et particulaire vivant), les dépôts au fond du bac sont homogénéisés puis analysés. A la fin du quatrième mois une cinétique de la variation des bacs est possible compte-tenu de la connaissance de quantités de matière organique introduite sous forme vivante (crevettes) et inerte (nourriture), des pertes sous forme dissoute (rejets et minéralisation des débris) et particulaire (cadavres, feces et sédimentation des particules en suspension vivante). Le rôle des particules vivantes en suspension devra être mis en évidence et mesuré. La modélisation du système permettra d'établir le bilan matière en fonction du temps.

Des expérimentations de 0 - 4 - 10 - 24 et 48 heures, identiques à celles que nous avons déjà réalisées permettront de suivre cette cinétique et de pouvoir modéliser les échanges dans le système expérimental. Il faut compter de 10 jours à 20 jours d'expérimentation à Banyuls. Les travaux de modélisation nécessiteront de 2 à 3 semaines de travail à Paris et l'équivalent à Banyuls afin de réaliser ce travail et d'en tirer les conclusions.

ANNEXES

Matériel

Eprouvettes de 1 et 2 litres
Bouchons à 2 trous
Tubes verres
Tuyaux plastique
Erlen-Meyer de 300 ml (6)
Erlen-Meyer de 1 litre (9)
Erlen-Meyer de 5 litres (3)
Gants XL (2 boîtes)
Tubes à hémolyse avec bouchons (100)
Feutres verres à pointe fine
Piluliers à scintillation liquide de 20ml(1000)
Piluliers verres de 200 ml (80)
Pompes à air et bulleurs (6)
Pompes à vide et postes de filtration (3)
Unités de filtration Millipore (pour filtres de 47 mm) (3)
Fioles à vide Millipore de 1 litre (3)
Filtres Nucléopore (Diamètre 47mm et 0,2 μ m de porosité) 200
Outres d'eau de mer de 10 litres pour transport crevettes (20)
Sacs poubelles renforcés (5)

Produits

Eau de mer Filtrée (0,2 mm) 100 litres
Ethanolamine (1 litre)
NaOH (en pastilles) 1kg
Liquide scintillant Instagel (ou équivalent) 5 litres

- Découpage des granulés en 1 cm de longueur à 500 μ Ci dans le mélange des poudres

n° 1 : 0,0274 g
2 : 0,0300 g
3 : 0,0287
4 : 0,0316
5 : 0,0274
6 : 0,0269
10 : 0,0289
8 : 0,0298
7 : 0,0299
9 : 0,0241

16 : 0,0248
27 : 0,0268
25 : 0,0252
19 : 0,0282
18 : 0,0239
23 : 0,0258
20 : 0,0256
21 : 0,0257
24 : 0,0228
22 : 0,0266
14 : 0,0219
13 : 0,0282
15 : 0,0270
17 : 0,0237
11 : 0,0264
12 : 0,0297

28 : 0,0256
29 : 0,0285
30 : 0,0282
31 : 0,0276
32 : 0,0298
33 : 0,0290
34 : 0,0275
35 : 0,0283
36 : 0,0287
37 : 0,0267

38 : 0,0252
39 : 0,0285
40 : 0,0266
41 : 0,0294
42 : 0,0268
43 : 0,0271
44 : 0,0260
45 : 0,0251
46 : 0,0289
47 : 0,0276
48 : 0,0254
49 : 0,0297
50 : 0,0265
51 : 0,0246
52 : 0,0253
53 : 0,0270
54 : 0,0268
55 : 0,0270
56 : 0,0294
57 : 0,0283
58 : 0,0291
59 : 0,0268
60 : 0,0279
61 : 0,0260
62 : 0,0276
63 : 0,0259
64 : 0,0270
65 : 0,0263
66 : 0,0286
67 : 0,0288
68 : 0,0254
69 : 0,0285
70 : 0,0247

- Pesée granulés chauds (250 μ Ci au mélange) sur Mettler AE200

Poids vial + granulé	6.6611 g
Poids vial vide	7.1146 g
Poids vial vide	7.1114 g
Poids vial vide	6.4851 g
Poids de granulés	0.1760 g 176 mg
Poids d'un granulé sec (n = 10)	176 : 10 = 17.6 mg

0.0177 g
0.0183
0.0167
0.0174
0.0180
0.0192
0.0192
0.0147
0.0191
0.0188

M = 0,0179

Ecart type : 0,0013

CV 7,42 %

Courbes de quenching et d'efficacité

Résultats bruts des comptages
en scintillation

(archivage)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tenore K.R. and W.M. Dunstan (1973). Comparison of feeding and biodeposition of three bivalves at different food levels. *Mar. Biol.* 21, 190-195.
- Amouroux J.M., A. Grémare and J. Amouroux (1989). Modelling of consumption and assimilation in *Abra alba* (Mollusca : Bivalvia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51 : 87-97.
- Conover R.J. and V. Francis (1973). The use of radioactive isotopes to measure the transfer of materials in aquatic food chains. *Mar. Biol.* 18 : 272-283.
- Goldstein R.A. and J.W. Elwood (1971). A two-compartment, three parameter model for the absorption and retention of ingested elements by animals. *Ecology* 42 : 935-939.
- Baylor E.R. and J.W.H. Sutcliffe (1963). Dissolved organic matter in the sea water as a source of particulate food. *Limnol. Oceanogr.* 3, 369-371.
- Castille F.L. and L.L. Addison (1979). The role of bacteria in the uptake of hexoses from seawater by post larval penaeid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A, 41-48.
- Dring M. J. and D.H. Jewson (1982). What does ¹⁴C uptake by phytoplankton really measure ? A theoretical modelling approach. *Proc. R. Soc., Lond, ser. B*, 214, 351-368.
- Grémare A. and J.M. Amouroux (1988). Etude expérimentale des taux d'ingestion et de métabolisme de *Eupolyornia nebulosa* : influence de l'état de maturation sexuelle. *Oceanologica Acta*, 11, 299-305.

- Lopez G.R. and M.A. Crenshaw (1982). Radiolabelling of sedimentary organic matter with C14 Formaldehyde : preliminary evaluation of a new technique for use in deposit-feeding studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 8, 283-289.
- Tenore K.R. (1975). Detrital utilization by the polychaete *Capitella capitata*. *J. Mar. Res.*, 33, 261-274.
- Tenore K.R. and R.B. Hanson (1980). Availability of detritus of different types and ages to a polychaete macroconsumer, *Capitella capitata*. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 553-558.
- Tenore K.R., L.M. Cammen, S.E.G. Findlay and N. Philips (1982). Perspectives of research on detritus : do factors controlling the availability of detritus to macroconsumers depend on its source ? *J. Mar. Res.*, 40, 473-490.

Annexes bis

Manip. 6H, 24H, 48H

Il s'agit d'un cinétique permettant de trouver les coefficients qui seront appliqués au modèle décrivant l'assimilation de la fraction protéique du granulé malgré au formaldéhyde C¹⁴.

quantité de poudre	2500 mg
source formaldéhyde C ¹⁴	500 μ Ci
granulés (poids moyen)	28 mg
dose moyenne/granulé	5.6 μ Ci
nb approx. de coups	10.000.000

3 erlenmeyers de 5 l sont mis en jeu, sont mis en jeu, couplés à 1 fiole d'ethanolamine pour récupérer le CO₂ marqué. L'essai à 6 heures, les crevettes (8-9 g) sont nourries sont nourries séparément et ingèrent leur granulé chacun en moins d'une minute (un essai sur des crevettes de 2-3 g s'est révélé infructueux : aucune prise alimentaire n'ayant pu être observée).

Cependant dans l'erlen A6 : nourrissage correct

B6 : 2 crevettes ont ingéré le granulé

1 crevette a dépecé le granulé

C6 : nourrissage correct

L'essai à 24 heures s'est bien déroulé quant à la prise alimentaire. L'essai à 48 heures a été le plus laborieux, les crevettes ayant dû être changées en raison d'une mortalité accidentelle.

Détail des comportements :

A24 : consommation immédiate pour les trois crevettes

B24 : difficultés à faire ingérer l'aliment, une crevette doit être remplacée

C24 : aucune consommation immédiate dans les erlens de 1 litre. Finalement le dispositif C est supprimé purement et simplement.

Les coups dénombrés dans chaque compartiment sont indiqués aux tableaux 1, 2, 3 et 4.