

THESE de DOCTORAT d'UNIVERSITE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE LA POLYNESIE FRANCAISE

ECOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE

« OCEANOLOGIE BIOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENT MARIN »

Par **Dominique PHAM**

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

SPECIALITE : Physiologie des crustacés

Les capacités osmorégulatrices chez la crevette bleue
***Litopenaeus stylirostris*, au cours de l'ontogenèse.**

Soutenue le 20 octobre 2011 à l'IRD, Nouméa.

Directeur de thèse : Marcel Le Pennec

Etude réalisée à l'UR LEAD de l'Ifremer, Nouvelle-Calédonie

Devant le jury composé de :

M. Benoît BELIAEFF	Président
M. Jean BRUN-BELLUT	Rapporteur
M. Michel MATHIEU	Rapporteur
M. Marcel LE PENNEC	Examineur
Mlle Viviane BOULO	Examineur
Mlle Nelly WABETE	Examineur

REMERCIEMENTS

La recherche est un apprentissage de tous les jours basé non seulement sur les résultats d'expériences en laboratoire mais également de ceux acquis sur le terrain et dans les rencontres professionnelles qui sont parfois devenues amicales. Les différents aspects de mon travail durant ces 23 années à l'Ifremer ont entretenu ma curiosité scientifique jusqu'à vouloir démarrer cette thèse sur le tard. Je tiens donc à saluer toutes celles et ceux que j'ai croisés un jour ou l'autre le chemin et je m'excuse d'avance auprès de ceux que j'aurai involontairement oubliés dans les remerciements.

Je commencerai par remercier l'Ifremer de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans le cadre de mon travail. Egalement, les Collectivités Territoriales et Provinciales de Nouvelle-Calédonie qui ont assuré le financement du fonctionnement des programmes crevetticoles du laboratoire LEAD.

Je voudrais remercier Le Professeur Marcel Le Pennec qui a assuré la direction de cette thèse à distance, l'éloignement n'a pas facilité les échanges.

Mes sincères remerciements aux deux rapporteurs, le Professeur Michel Mathieu et le Professeur Jean Brun-Bellut pour avoir consacré du temps à l'analyse de ce travail.

Merci à Monsieur Benoît Beliaeff, Mademoiselle Viviane Boulo et Mademoiselle Nelly Wabete qui m'ont fait l'honneur de compléter ce jury de thèse. Aux membres du jury qui ont fait le déplacement depuis la Métropole ou de Tahiti, je souhaite qu'ils gardent un bon souvenir de leur court séjour dans ce pays.

Je remercie le délégué Ifremer NC Lionel Loubersac d'avoir concouru à ce que cette thèse puisse se réaliser dans le cadre de mon activité.

Au laboratoire, je voudrais montrer toute ma gratitude à mes collègues qui ont contribué de près ou de loin afin que ce travail puisse être mené à terme :

- les responsables de projet qui se sont succédés pendant ces quatre ans : Benoît qui a su me motiver à nouveau dans les moments difficiles et Thierry, pour avoir pris le relais; je les remercie pour leur rôle dans la cohésion de la recherche au sein de ce laboratoire ;
- Nelly, qui a dû assurer à la fois le rôle d'animateur de la station et m'épauler sur les aspects physiologiques de cette thèse; j'ai beaucoup apprécié ses caches secrètes qui recèlent de petits matériels indispensables aux différentes expérimentations ;

- L'équipe éclosion, Anne-Laure, François, Jean-Marie et Jean-René, qui a su prendre de la hauteur ces dernières années pour me délester d'une grande partie de la charge des productions d'éclosion et fournir les larves nécessaires aux testages. Elle a été d'une aide précieuse tout au long de cette thèse ;
- L'équipe PIE, Yannick et Dominique, qui a suscité de l'intérêt pour mon travail et qui a proposé d'élargir mes connaissances en abordant les aspects biomoléculaires. Je lui suis reconnaissante.
- L'équipe zootechnie bassin composée de Pierre, Christian, Etienne et Matehau, qui doit gérer au quotidien les besoins- parfois irraisonnables- en animaux des différentes thématiques et qui travaille en étroite concertation avec l'équipe éclosion afin d'assurer la bonne gestion de l'animalerie à Saint-Vincent ;
- Jacky pour les divers conseils dans la mise en forme des documents et la mise en page finale de ce manuscrit ;
- Benoît, Denis, Hugues, José, Liêt, Luc et Pierrette avec qui j'ai eue l'occasion de travailler sur des thématiques sortant du cadre de cette thèse mais qui ne sont pas pour autant inintéressantes ;
- Au personnel administratif et logistique du laboratoire, Maryline, Eugénie, Evelyne, Karen, Jean-Louis, Henri, Jean-Marc et Jean-Sébastien que je n'oublie pas et sans qui, les équipes scientifiques auraient du mal à travailler efficacement;

Je tiens également à remercier toute l'équipe d'AEO de l'UMR2 à l'Université de Montpellier qui m'a accueilli à plusieurs reprises au sein de son laboratoire. Un chaleureux remerciement :

- au professeur Guy Charmantier qui m'a reçu avec beaucoup de sympathie et qui a favorisé cette fructueuse collaboration entre les deux laboratoires; les remarques pertinentes sur les résultats ainsi que les conseils avisés en microscopie et en microponction de l'hémolymphe des larves m'ont été d'une grande aide ;
- à Mireille Charmantier-Daures qui a assuré la gestion au quotidien de mes différents séjours en me procurant les éléments intellectuels mais aussi matériels pour avancer dans mes recherches; son enthousiasme pour les crustacés me faisait attendre avec impatience ses suggestions matinales ;
- à Viviane et Jehan-Hervé pour le temps que nous avons passé ensemble à observer les coupes et capturer les images et à Evelyse pour son expérience et sa patience dans la

confection des coupes sur des échantillons parfois récalcitrants ; je vous témoigne ma sympathie ;

- à Eva, Elliot et Maryline qui m'ont apporté leur aide lorsque les techniques de laboratoire m'étaient inconnues ; je vous souhaite bonne continuation dans vos projets.

Je remercie Marcel, Nelly et Yannick pour leurs conseils avisés dans la rédaction. Un grand merci à Nelly pour les longues heures passées ensemble les derniers jours afin d'améliorer la présentation de ce document.

Une petite pensée pour les aquaculteurs calédoniens dont les attentes ne semblent pas toujours coïncider avec les objectifs de la recherche menée au sein du laboratoire, mais qui tôt ou tard, arrivent à tirer parti des résultats de ces investigations.

Sans oublier cette chère crevette calédonienne qui continue à fournir des angoisses à toute la filière mais également des prétextes pour que nous nous intéressions intimement à sa vie.

Bien sûr, je dédie ce travail à toute ma famille et mes proches qui ont dû consentir quelques sacrifices pour me permettre d'arriver au terme de ce projet. Ma plus profonde affection.

Au moment, où je mets ce manuscrit sous presse, Etienne, collègue de travail et ami qui s'était investi dans les aspects sociaux de l'entreprise, vient de nous quitter brusquement. Une pensée particulière à toute sa famille.

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information ».

Albert Einstein (1879-1955)

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
I.1 La production mondiale des produits aquatiques	2
I.1.1 La production de crevettes de mer dans le monde	2
I.1.2 Les principaux pays producteurs de crevettes d'élevage.....	5
I.2 L'aquaculture de crevette en Nouvelle-Calédonie	5
I.2.1 Son développement.....	5
I.2.2 Problèmes rencontrés au cours du développement de la filière aquacole calédonienne.....	6
I.3 Implication de l'Ifremer dans l'aquaculture en Nouvelle-Calédonie	8
I.4 Objectifs de l'étude	10
CHAPITRE II : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
II.1 Modèle biologique	13
II.1.1 Les principales étapes du cycle biologique.....	13
II.1.2 La reproduction.....	14
II.1.3 Le développement larvaire et post-larvaire.....	17
II.1.4 Les juvéniles et adultes	22
II.2 L'osmorégulation	24
II.2.1 Les différents types de régulation.....	24
II.2.2 Les tissus impliqués	27
II.2.3 La régulation au niveau cellulaire	29
CHAPITRE III : DETERMINATION DES ORGANES DE LA CAVITE BRANCHIALE IMPLIQUES DANS L'OSMOREGULATION	36
III.1 Introduction	37
III.2 Matériels et méthodes	37
III.2.1 Acclimatation des animaux.....	37
III.2.2 Prélèvements	38
III.2.3 Histologie.....	38
III.2.4 Microscopie électronique.....	39
III.2.5 Immunohistochimie.....	39
III.2.6 Analyses statistiques	41
III.3 Résultats	41
III.3.1 Paramètres physico-chimiques et biologiques.....	41
III.3.2 Capacité-osmorégulatrice.....	42
III.3.3 Dénombrement et localisation topographique des organes osmorégulateurs	43

III.3.4	Ultrastructure des tissus osmorégulateurs.....	44
III.3.5	Immlocalisation de la NKA, du CFTR et du NKCC1	48
III.4	Discussion	53
III.5	Conclusion	57
CHAPITRE IV : ONTOGENESE DE L'OSMOREGULATION ET IMPLICATION SUR LA TOLERANCE A LA SALINITE		59
IV.1	Introduction	60
IV.2	Matériels et méthodes	61
IV.2.1	Obtention des larves et post-larves.....	61
IV.2.2	Tolérance aux chocs de salinité.....	62
IV.2.3	Mesure de la capacité osmorégulatrice	63
IV.2.4	Spécificité de l'anticorps	64
IV.2.5	Immunohistochimie.....	66
IV.2.6	Microscopie électronique.....	67
IV.2.7	Analyses statistiques	67
IV.3	Résultats	67
IV.3.1	Tolérance aux chocs de salinité chez <i>L. stylirostris</i>	67
IV.3.2	Capacité osmorégulatrice.....	70
IV.3.3	Spécificité de l'anticorps Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α (H-300).....	72
IV.3.4	Mise en place des tissus et immunolocalisation de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	72
IV.3.5	Ultrastructure des organes de la cavité branchiale.....	74
IV.4	Discussion	77
IV.5	Conclusion	80
CHAPITRE V : NA⁺/K⁺ ATPASE CHEZ LITOPENAEUS STYLIROSTRIS : EXPRESSION DE L'ARNM DE LA SOUS-UNITE α SELON LES TISSUS, LE STADE DE DEVELOPPEMENT ET LA SALINITE		82
V.1	Introduction	83
V.2	Matériels et méthodes	84
V.2.1	Recherche d'un gène candidat.....	84
V.2.2	Etude du profil d'expression du gène candidat.....	88
V.2.3	Analyses statistiques	92
V.3	Résultats	93
V.3.1	Caractérisation du gène codant la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	93
V.3.2	Expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase en fonction du tissu.....	97

V.3.3	Expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase en fonction de la salinité.....	98
V.3.4	Expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase au cours du développement larvaire .	101
V.4	Discussion	102
V.5	Conclusion	107
CHAPITRE VI : SALINITE ET CONFORT PHYSIOLOGIQUE : APPLICATION PRATIQUE EN ELEVAGE LARVAIRE		108
VI.1	Introduction	109
VI.2	Matériels et méthodes	109
VI.2.1	Elevage larvaire	109
VI.2.2	Influence de la salinité en élevage en phase larvaire.	111
VI.2.3	Influence de la salinité en élevage en phase post-larvaire.....	111
VI.2.4	Analyses statistiques	113
VI.3	Résultats	115
VI.3.1	Influence de la salinité en élevage entre le stade nauplius (Nii) et post-larve.....	115
VI.3.2	Influence de la salinité sur le développement des PL en élevage.....	116
VI.3.3	Phase post-larvaire en condition isotonique	118
VI.4	Discussion	120
VI.5	Conclusion	122
CHAPITRE VII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		124
VII.1	Principaux résultats obtenus	125
VII.2	Vers un modèle des mécanismes d'osmorégulation chez <i>L. stylirostris</i>...	127
VII.3	Perspectives	129

Chapitre I : Introduction

I.1	La production mondiale des produits aquatiques	2
I.1.1	La production de crevettes de mer dans le monde	2
I.1.2	Les principaux pays producteurs de crevettes d'élevage.....	5
I.2	L'aquaculture de crevette en Nouvelle-Calédonie	5
I.2.1	Son développement.....	5
I.2.2	Problèmes rencontrés au cours du développement de la filière aquacole calédonienne.....	6
I.2.2.1	Deux bactérioses	6
I.2.2.2	Une pénurie des post-larves (PL) en écloséries	7
I.3	Implication de l'Ifremer dans l'aquaculture en Nouvelle-Calédonie	8
I.4	Objectifs de l'étude.....	10

I.1 La production mondiale des produits aquatiques

Avec plus de 142 millions de tonnes en 2008, les produits aquatiques ont progressé de 13 % en 9 ans (Tableau I.1). Cette augmentation est principalement le fait d'une plus grande offre de l'aquaculture qui a fait un bond de 58 % sur la même période alors que la pêche connaît une relative stagnation depuis près de 20 ans. L'aquaculture représente 46 % de la disponibilité des produits aquatiques en 2008. Plusieurs raisons peuvent être citées pour expliquer cet accroissement de la production aquacole parmi lesquelles la baisse des rendements de la pêche, les améliorations zootechniques, l'intensification des élevages, l'augmentation de la population mondiale, l'élévation générale du niveau de vie ou encore les changements des habitudes alimentaires.

Tableau I.1 : Quantités mondiales de produits aquatiques (hors algues) et parts de l'aquaculture et de la pêche en 1990, 1999 et 2008 (source : FAO Fisheries, 2010).

Quantité (tonnes) toutes espèces (sauf algues)	1990	1999	2008	Evolution 1999/1990	Evolution 2008/1999
Aquaculture	13 084 270	33 310 349	52 546 205	+155 %	+ 58 %
Pêche	85 542 730	92 866 553	89 740 919	9 %	- 3 %
Total	98 627 000	126 176 902	142 287 124	118 %	+ 13 %

I.1.1 La production de crevettes de mer dans le monde

Parmi les produits de la mer, la crevette de mer (essentiellement des pénéidés) connaît un intérêt croissant puisque sa production est passée de 3 millions de tonnes en 1992 à plus de 6,5 millions de tonnes en 2008 (Fig. I.1 et Tableau I.2).

En valeur, elle est au premier rang des produits aquatiques soumis au commerce international avec 15% de la valeur total des produits de la pêche. Trois périodes peuvent être distinguées dans l'évolution de l'industrie de la crevetticulture (Wyban, 2008) :

- une phase de démarrage dans les années 70 et 80 : Les premiers résultats d'élevage de crevettes laissaient présager un développement prometteur de la crevetticulture dans le monde qui a atteint 620 000 tonnes en 1989 et qui représentait à ce moment-là près de 30 % de l'offre globale.

une phase d'écloserie dans les années 90 : mais également une période d'émergence des maladies. Avec l'intensification des pratiques culturales et la nécessité de produire des juvéniles en écloserie, à partir de géniteurs sauvages au statut sanitaire incertain, un

ralentissement notable de la croissance est observé jusqu'en 2000. De 5 pathogènes connus en 1990, 9 sont maintenant listés en 2008. Ainsi, le Monodon BaculoVirus (MBV), le Yellow Head Disease (YHD) et le White Spot Syndrom Virus (WSSV) ont provoqué des pertes considérables en Asie (Chine, Thaïlande, Indonésie, Philippines, Taïwan). En Amérique latine (Pérou, Colombie, Equateur, Panama), ce sont l'Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), le Taura Syndrome Virus (TSV) et le White Spot Syndrom Virus (WSSV), qui entraînent des effondrements de la production aquacole. En conséquence, c'était essentiellement la capture en mer de crevettes qui avait permis cette progression et la crevette d'aquaculture représentait toujours moins de 1/3 de la production totale en 2000.

- une phase de domestication reposant essentiellement sur l'espèce *Litopenaeus vannamei* : avec le déploiement de cette espèce dans le monde et notamment en Asie, le volume de production des crevettes d'élevage est reparti à la hausse, en passant le cap des 2 millions de tonnes en 2003 puis 3 millions de tonnes en 2006.

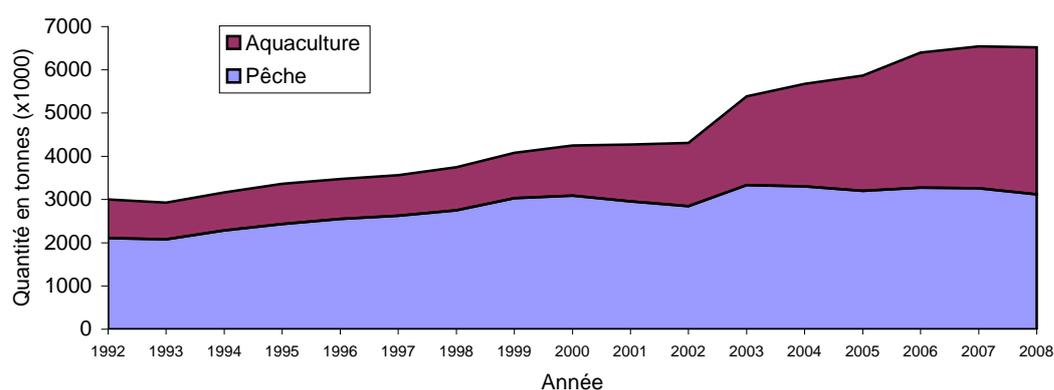


Figure I.1 : Quantités mondiales de crevettes de mer et parts de l'aquaculture et de la pêche entre 1992 et 2008 (source : FAO Fisheries, 2010).

Tableau I.2 : Quantités mondiales de crevettes de mer et parts de l'aquaculture et de la pêche en 1992, 1999 et 2008 (source : FAO Fisheries, 2010).

Quantité (tonnes) crevettes de mer	1992	1999	2008	Evolution 1999/1992	Evolution 2008/1999
Aquaculture	889 678	1 049 855	3 399 105	+18 %	+ 224 %
Pêche	2 112 607	3 026 265	3 120 566	+133 %	+ 3 %
Total	3 002 285	4 076 120	6 519 671	+36 %	+ 60 %

Ainsi en 2008, plus de la moitié de l'offre concernait les crevettes d'élevage et cette inversion des tendances s'explique notamment par :

- une application accrue des mesures de biosécurité (utilisation de souches Specific Pathogen Free (SPF) et/ou Specific Pathogen Resistant (SPR), traitement de l'eau, élevage en conditions contrôlées...),
- une meilleure gestion de l'intensification (assec et aération optimisée, utilisation de probiotiques...),
- l'utilisation d'espèces moins sensibles aux maladies présentes dans le milieu environnant (99 % de la production thaïlandaise est constituée de *L. vannamei* au détriment de *Penaeus monodon*),
- l'amélioration des souches de crevettes (sélection génétique),
- l'émergence de nouveaux pays producteurs de crevettes (Brésil notamment avec plus de 90 000 tonnes en 2003).

La valeur marchande de la crevette de mer s'est maintenue entre 6 et 7 dollars le kilo jusqu'en 2000, puis le cours a chuté les 3 années suivantes pour atteindre 4 dollars et s'est stabilisé à ce niveau depuis lors. Le cours de la crevette a subi les répercussions de la crise de 2009 dans un volume de l'offre stable. Les espèces de pénéides les plus cultivées à l'heure actuelle sont *L. vannamei* et *Penaeus monodon* avec respectivement 67 % et 21 % du volume de production mondiale en 2008 (Fig. I.2, source FAO¹, 2010). La *Litopenaeus stylirostris* avec 2568 tonnes ne représente que 0,08% du total mais son prix sur le marché est 2 fois plus élevé que les autres espèces de pénéidés (10 dollars US le kilo).

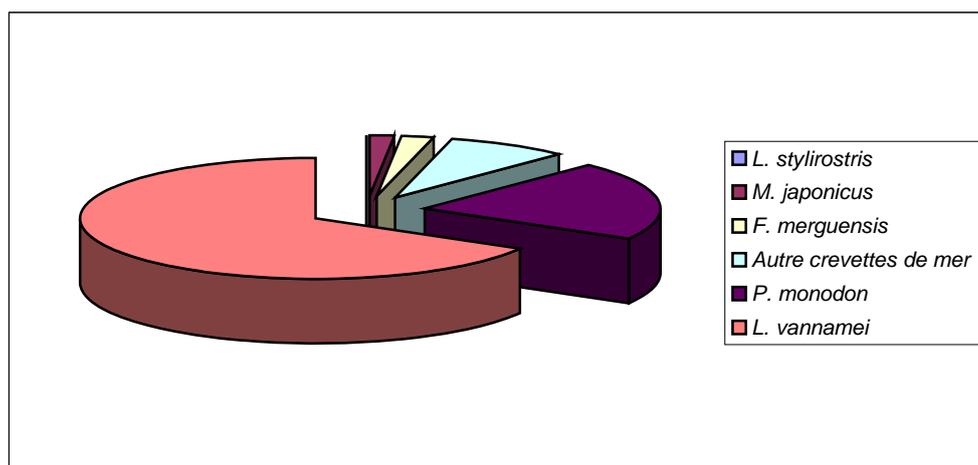


Figure I.2 : Part relative des différentes espèces dans la production mondiale des crevettes de mer en 2008 (FAO, 2010).

¹ Food and Agriculture Organization, www.fao.org

I.1.2 Les principaux pays producteurs de crevettes d'élevage

En 2008, l'Asie a été le principal fournisseur de crevettes d'élevage avec 85 % des 3,4 millions de tonnes : la Chine a produit à elle seule 37% du volume, viennent ensuite les autres pays asiatiques tels que Thaïlande, Vietnam, Indonésie et Bangladesh. Le continent américain a participé à 13% de la production mondiale. Les 2% restants proviennent de l'Afrique et du Moyen-Orient essentiellement.

I.2 L'aquaculture de crevette en Nouvelle-Calédonie

I.2.1 Son développement

L'aquaculture calédonienne est essentiellement de la crevetticulture. C'est au début des années 70 que les premières recherches en crevetticulture en Nouvelle-Calédonie ont démarré sous la forme d'un projet NUPD-FAO. La création d'une station de terrain nommée « AQUACAL » dans la baie de Saint-Vincent à Boulouparis, ainsi que le soutien du Centre Océanologique du Pacifique (COP) de Tahiti, ont permis dans un premier temps le testage de grossissement de crevettes indigènes et aliènes. En 1978, le choix s'est porté sur une espèce originaire du Panama, la crevette bleue *L. stylirostris*. Cette espèce est très peu élevée dans le monde aujourd'hui (moins de 0,1% de la production mondiale des crevettes de mer). Les principaux avantages de l'élevage de cette espèce en Nouvelle-Calédonie sont :

- la tolérance aux températures de la saison fraîche calédonienne (températures de l'eau pouvant descendre en dessous de 20°C),
- la relative facilité de reproduction,
- l'offre mondiale très faible,
- la qualité gustative de l'animal.

Suite à la maîtrise de la totalité du cycle biologique de *L. stylirostris*, l'industrie aquacole calédonienne s'est développée progressivement à partir de 1983 avec l'appui scientifique et technique d'Ifremer et l'aide financière des institutions locales. Ce développement a été aussi facilité par la présence de grandes surfaces naturellement plates en arrière des mangroves du côté terre, appelées tannes, dont une partie rarement atteinte par les marées hautes constitue une zone potentiellement aménageable pour l'aquaculture.

Le nombre de fermes commerciales est passé de 3 en 1990, à 10 en 1998 et 19 en 2010 avec respectivement 174, 437 et 667 hectares. Les éclosiers sont actuellement au nombre de 4 avec une capacité d'élevage de 580 m³. La filière est également soutenue par deux provendiers locaux pour la fabrication d'aliments et deux ateliers de conditionnement.

La crevette d'élevage est en valeur le deuxième produit à l'exportation calédonienne, avec 20 millions d'euros en 2005 mais seulement 10,9 millions en 2009 (2% de la valeur des exportations), loin derrière le nickel qui représente 56 millions d'euros (rapport IEOM² 2009). Les emplois permanents et occasionnels engendrés par la filière crevette calédonienne étaient environ de 900 en 2010 (ERPA³, 2010). Par ailleurs, la Nouvelle-Calédonie est au 2^{ème} rang mondial de la consommation de crevettes par habitant.

D'autres formes d'élevages aquacoles ont été développées sur le Territoire ces dernières années mais restent pour l'instant confidentielles (astaciculture, pisciculture...).

I.2.2 Problèmes rencontrés au cours du développement de la filière aquacole calédonienne

Jusqu'en 2005, la production calédonienne de crevettes a réussi à maintenir des rendements autour de 3,5-4 tonnes/ha, permettant une production de 2400 tonnes, le plus gros tonnage obtenu à ce jour sur le Territoire. Depuis cette date, la production a connu un net recul (-13%) au cours des 3 années suivantes, associé à une chute de 24% des volumes à l'exportation (rapport IEOM, Novembre 2010). Les principales difficultés rencontrées par la filière ont été l'apparition de deux bactérioses puis une pénurie de post-larves.

I.2.2.1 Deux bactérioses

Depuis deux décennies, la production de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie est confrontée à deux bactérioses à caractère septicémique, qui freinent le développement économique de cette filière, ramenant la production à des niveaux bien en deçà des prévisions initiales. La première, désignée « syndrome 93 » ou « syndrome d'hiver », est apparue en 1993 de façon simultanée sur deux sites de production proches géographiquement (Mermoud *et al.*, 1998). Il s'agit d'une vibriose s'exprimant de façon saisonnière et dont l'agent étiologique est *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998 ; Mermoud *et al.*, 1998 ; Goarant *et al.*, 1999 ; Saulnier *et al.*, 2000). L'épizootie s'est rapidement répandue à l'ensemble des fermes de crevettes, conduisant les éleveurs à changer leurs pratiques zootechniques durant la période à risque, en saison froide (arrêt de la production). Cette pathologie bactérienne ne concerne pas ou peu la phase larvaire, les larves étant résistantes à l'infection expérimentale par *V. penaeicidae* (Goarant *et al.*, 1998a). La seconde, désignée « syndrome d'été », a été diagnostiquée fin 1997 sur un premier site de production au cours de la saison chaude

² Institut d'Emission d'Outre-Mer, www.ieom.fr

³ Etablissement de Régulation des Prix Agricoles de Nouvelle-Calédonie, www.erpa.nc

(Goarant et al, 1998b). Par la suite, deux autres fermes proches géographiquement, ainsi que la station expérimentale de Saint-Vincent, ont été affectées à leur tour, indiquant une extension de ce syndrome. Cette maladie, dont l'agent étiologique est *V. nigripulchritudo*, s'est exprimée sur les cycles de production étudiés après environ 50 jours d'élevage, sous forme de flambées épizootiques brèves devenant chroniques et réapparaissant d'une année sur l'autre. Contrairement à *V. penaeicidae*, *V. nigripulchritudo* a été également détecté en écloserie sans toutefois pouvoir être incriminé dans des mortalités en élevage larvaire (Herlin et Marteau, 2000).

Les différents problèmes pathologiques décrits ci-dessus ont contraint en 2006 à revoir à la baisse, les prévisions optimistes de croissance de la filière (objectif de 5000 tonnes de crevettes en 2010) .

I.2.2.2 Une pénurie des post-larves (PL) en écloséries

La production de juvéniles d'écloserie suivait une progression constante jusqu'à la saison 2005/2006 avec 167 millions de post-larvesensemencées (source ERPA, 2008). Depuis lors, les chiffres montrent une chute de l'ordre de 23% de la production de PL. Plusieurs hypothèses sont fréquemment avancées pour expliquer ce déficit, parmi lesquelles une température élevée de l'eau des bassins (>30°C) entre décembre et mars entraînant une baisse de la fécondité des géniteurs. L'implication du virus IHHNV est également évoquée pour expliquer ces difficultés. En effet, suite à l'introduction d'une autre souche de crevette bleue provenant d'Hawaii (domestiquée et garantie 'Specific Pathogen Free') dans le cadre d'un programme génétique, des charges importantes en IHHNV (parfois supérieures à 10⁹ copies virales/μg), associées à des taux de mortalité élevés et à des phénomènes pathologiques directs ou indirects, ont été détectées sur des crevettes de souches hawaïennes pures et hybrides, révélant une susceptibilité accrue au virus. Des niveaux de charge particulièrement élevés ont également été observés sur des individus issus du cheptel calédonien. Ainsi, bien que la souche calédonienne soit réputée tolérante à ce virus, il semblerait que la souche SPF américaine, sensible, ait joué le rôle de réacteur à virus, constituant une source de contamination de l'environnement et affectant les performances zootechniques des écloséries et des élevages de grossissement. Enfin, l'implication de bactéries de la famille des *Vibrionaceae* comme source de difficultés est parfois évoquée par les écloséries calédoniennes, bien qu'aucun agent pathogène strict n'ait été identifié à ce jour.

I.3 Implication de l'Ifremer dans l'aquaculture en Nouvelle-Calédonie

Même si son rôle dans la recherche aquacole a évolué ces 10 dernières années en Nouvelle-Calédonie, l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) a toujours participé activement au développement de la filière crevetticole calédonienne. Installée en 1970 dans la baie de Saint-Vincent, la station du même nom (SASV) a hébergé le personnel Ifremer qui a évalué et mis au point les techniques d'élevage adaptées au contexte calédonien. Ces recherches ont permis d'aboutir à la création des deux premières fermes commerciales en 1983. La fourniture des juvéniles indispensables à l'ensemencement des bassins était assurée par la SASV jusqu'en 1987, année d'ouverture de la première éclosérie commerciale du Territoire. Si le rôle de soutien technique de l'Ifremer ne pouvait être remis en cause dans la phase de développement de la filière, les crises biologiques successives apparues dans les années 90 ont nécessité la réorganisation et le renforcement du personnel Ifremer en Nouvelle-Calédonie à partir de 2000. L'apport de compétences nouvelles en génétique et physiologie ainsi que le renforcement du volet pathologie et environnement par des collaborations extérieures ont permis d'aboutir à la définition de deux projets de recherche quadriennaux successifs :

DESANS (DEfi SANté *Stylirostris*) de 2002 à 2006 (Herbland et Harache, 2008), articulé autour de deux grands axes :

- la compréhension des processus aboutissant au syndrome 93 et au syndrome d'été dans les bassins d'élevage ;
- l'amélioration des pratiques zootechniques pouvant diminuer l'incidence de ces pathologies bactériennes.

Les conclusions de ce premier projet ont permis de mettre en avant l'aspect multifactoriel des maladies et l'équilibre fragile de la relation hôte-pathogène-environnement représenté par le bassin d'élevage (Herbland et Harache, 2008). La présence des vibrions -associée à des températures en dessous de 24°C dans le cas du syndrome 93 et aux potentialités d'eutrophisation rapide du milieu dans le cas du syndrome d'été- peut provoquer le déclenchement de pics brutaux de mortalité. Les facteurs aggravants de ces phénomènes sont les mauvaises conditions écologiques du bassin, l'état physiologique précaire ou la pauvreté du capital génétique de l'animal. Des solutions pour réduire l'impact de ces pathologies ont été proposées : l'amélioration des pratiques zootechniques afin de rééquilibrer les processus

de dégradation de la matière organique ; l'utilisation de compléments alimentaires (probiotiques, vitamines, acides gras) pour stimuler les défenses de la crevette vis-à-vis du pathogène ; la production de juvéniles de meilleure qualité par diminution de la consanguinité et par sélection génétique.

DEDUCTION (Développement durable de la crevetticulture , traitement de l'information et observatoire du système en Nouvelle-Calédonie) de 2007 à 2010 (Beliaeff, 2009) défini dans la continuité du précédent. Un avenant pour son prolongement en 2011 a été signé avec les collectivités locales qui financent le fonctionnement (hors masse salariale) du projet. Ce dernier avait pour objectifs :

- d'approfondir la connaissance de l'impact des pratiques culturales sur les performances des élevages en bassin par l'exploitation de la base de données Stylog (Soulard, 2009) . Toutes les informations provenant de fermes sont archivées et traitées. Ce travail a permis de confirmer l'importance de la gestion zootechnique sur les résultats des fermes et de prodiguer des conseils sur l'alimentation, les périodes de repos des bassins...

- de définir des bio-indicateurs de la qualité du sédiment d'un bassin (Debenay et Della Patrona, 2009), de décrire l'évolution du phytoplancton durant les épisodes de mortalité d'été (Lemonnier *et al.*, 2009) ou encore de déterminer les mécanismes de virulence de *V. penaeicidae* et *V. nigripulchritudo* (Le Roux *et al.*, 2010).

Les difficultés rencontrées dans les productions d'écloserie associées à l'augmentation du portage et de la sensibilité au virus IHNNV trois ans après l'introduction du sang neuf en Nouvelle-Calédonie, ont induit la définition 2 nouveaux axes dans la programmation DEDUCTION :

- l'application d'une démarche biosécurité : malgré les bons résultats zootechniques issus du croisement de la souche calédonienne et de la souche hawaïenne, cette dernière a été éradiquée en 2008. La sensibilité accrue de la crevette hawaïenne à l'IHHNV et son rôle probable de réacteur à virus ont convaincu les acteurs de la filière de la nécessité de sécuriser les intrants. Un vide sanitaire total du site de Saint-Vincent -qui a hébergé la souche hawaïenne à sa sortie de la quarantaine- a été effectué et une vérification systématique du portage de l'IHHNV par PCR quantitative en temps réel est désormais réalisée sur les géniteurs et leurs descendants à chaque cycle de reproduction. Les différentes étapes de la production sont analysées afin d'y apporter des solutions prophylactiques (Herlin, 2010).

Cette action est un préalable à une éventuelle réintroduction de sang neuf et à la mise en place d'un conservatoire.

- l'amélioration du confort physiologique des animaux en élevage : dans la filière géniteurs comme lors du développement larvaire, l'objectif est de déterminer les conditions environnementales préférentielles de l'animal. Pour les reproducteurs par exemple, une autre méthode de production de géniteurs, en bac flocculent et en intensif, a été expérimentée et comparée à la méthode traditionnelle, extensif en bassin de terre (Huber *et al.*, 2010). Concernant la phase larvaire, la recherche de bio-indicateurs de la santé (Pham *et al.*, 2009a), les aspects nutritionnels (Pham *et al.*, 2009b) et sanitaires (Pham *et al.*, 2008) ont été abordés afin d'apporter des réponses pratiques aux problèmes rencontrés par les écloséries calédoniennes.

I.4 Objectifs de l'étude

L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse s'inscrit dans la dernière partie du programme DEDUCTION qui a trait à l'amélioration des conditions d'élevage chez les stades précoces de *L. stylirostris*. Face à la difficulté persistante de stabiliser la production de juvéniles dans les écloséries privées, il convenait de mieux comprendre d'un point de vue fondamental les besoins physiologiques de l'animal durant les phases larvaires et post-larvaires et d'étudier d'un point de vue pratique les conditions environnementales qui pourraient influencer la survie et la croissance au cours de son développement.

La salinité comme la température influe sur les réponses physiologiques des organismes marins et représente donc un facteur déterminant dans la distribution géographique et la survie des animaux dans le milieu naturel. (Kinne, 1964 ; Kinne, 1971, Kumlu et Jone, 1995 ; Kumlu *et al.*, 2001 ; Zacharia et Kakati, 2004). Or en élevage larvaire, la salinité est rarement considérée comme un paramètre limitant alors que le développement de l'animal sous-entend la mise en place d'organes spécifiques.

Après un rappel bibliographique sur la biologie des pénéides et un focus sur l'osmorégulation, la première partie de ce travail consistera à déterminer par des techniques d'immunofluorescence et de microscopie électronique l'implication des tissus de la cavité branchiale dans la régulation ionique chez *L. stylirostris*. Nous verrons ensuite si la mise en place de ces tissus au cours de l'ontogénèse a une influence sur les fonctions d'osmorégulation. Cette régulation ionique étant étroitement liée à la présence de transporteurs transmembranaires, la partie suivante abordera les aspects moléculaires de l'osmorégulation par la caractérisation du gène codant la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ - enzyme primordiale

pour cette fonction-, associée à des études de son expression spatio-temporelle et à la quantification de son expression en fonction de la salinité.

Dans le dernier chapitre, nous verrons comment une application pratique des connaissances acquises dans cette étude peut améliorer les performances zootechniques en élevage larvaire.

Chapitre II : Rappels bibliographiques

II.1	Modèle biologique	13
II.1.1	Les principales étapes du cycle biologique.....	13
II.1.2	La reproduction.....	14
II.1.3	Le développement larvaire et post-larvaire.....	17
II.1.3.1	Les stades nauplius.....	17
II.1.3.2	Les stades zoés.....	17
II.1.3.3	Les stades mysis.....	19
II.1.3.4	Les stades post-larvaires.....	19
II.1.4	Les juvéniles et adultes.....	22
II.2	L'osmorégulation	24
II.2.1	Les différents types de régulation.....	24
II.2.2	Les tissus impliqués.....	27
II.2.3	La régulation au niveau cellulaire.....	29
II.2.3.1	La Na^+K^+ ATPase (NKA).....	32
II.2.3.2	Le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (NKCC).....	33
II.2.3.3	Le canal à chlore CFTR.....	34

II.1 Modèle biologique

Le modèle biologique a été retenu en raison de son importance économique en Nouvelle-Calédonie. Malgré la présence de 45 espèces de pénéides dans les eaux calédoniennes (Juncker et Poupin, 2009) dont 5 d'intérêt commercial dans le monde (*P. monodon*, *Metapenaeus ensis*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Penaeus semisulcatus* et *Penaeus latisulcatus*), c'est une espèce importée qui a été choisie pour l'aquaculture calédonienne au début des années 80 : *Litopenaeus stylirostris*. Elle a été testée parmi une dizaine d'autres espèces indigènes ou exotiques et elle réunissait à ce moment-là les meilleures caractéristiques pour son exploitation en Nouvelle-Calédonie. Aujourd'hui, avec les problèmes rencontrés en élevage, l'opportunité de domestiquer une autre espèce se pose mais nécessite une étude minutieuse de l'enjeu (collectif DAC, 2007).

En raison de sa couleur bleue, ses noms vernaculaires sont crevette bleue, « blue shrimp » en anglais, ou encore « camarón azul » en espagnol.

Sa classification taxonomique est la suivante :

Embranchement :	Arthropodes
Sous embranchement :	Mandibulates
Classe :	Crustacés
Ordre :	Décapodes
Sous-ordre :	Natantia
Famille :	<i>Penaeidae</i>
Genre :	<i>Litopenaeus</i>
Espèce :	<i>stylirostris</i> (Stimpson, 1874)

L'espèce *stylirostris* est présente de façon endémique dans l'Est de l'Océan Pacifique, sur les côtes mexicaines de l'Amérique Centrale, mais également au Salvador et au Guatemala (Dore et Frimodt, 1987).

II.1.1 Les principales étapes du cycle biologique

Les pénéides sont des animaux dont le cycle biologique a été largement décrit dans la littérature (Dakin, 1938; Linder et Anderson, 1954; Fujinaga, 1955; Mistakidis, 1969; Dall *et al.*, 1990). Les juvéniles vivent plutôt en milieu estuarien alors que les adultes affectionnent la haute mer (Fig. II.1). Trois étapes peuvent être distinguées :

- La phase méroplanctonique et planctonique, comprenant les différents stades larvaires, qui a lieu en milieu océanique.

Les phases post-larvaires et juvéniles qui se passent dans les estuaires et durant lesquelles les animaux passent d'un mode pélagique à un mode benthique.

- La phase de migration durant laquelle les futurs géniteurs vont vers des endroits plus profonds puis au large pour y pondre.

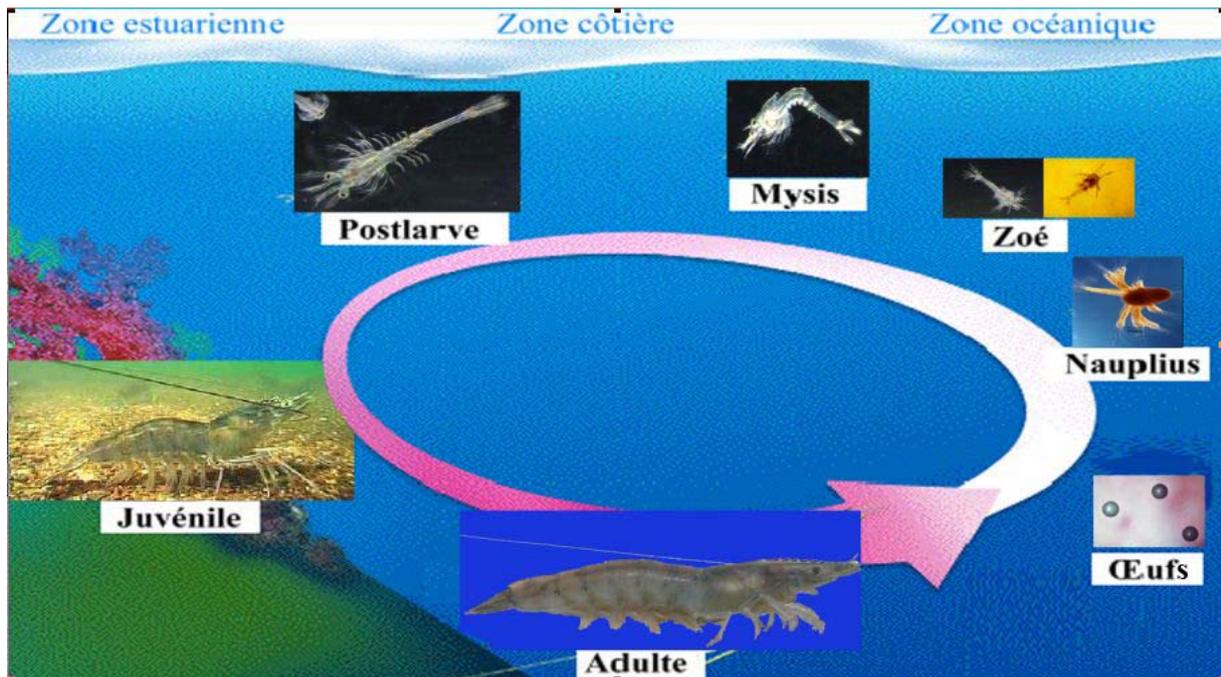


Figure II.1 : Le cycle biologique de la crevette pénéide en milieu naturel.

II.1.2 La reproduction

Chez les pénéides, les sexes sont séparés (Fig. II.2). La femelle possède un réceptacle séminal ouvert appelé thélycum situé ventralement entre la quatrième et la cinquième paire de périopodes. Selon la conformation de ce dernier, deux espèces de crevettes pénéides peuvent être distinguées :

- Les espèces ayant un thélycum fermé (cas de *Penaeus monodon* ou *Marsopenaeus japonicus*) ayant la forme d'un étui plus ou moins développé, ouvert vers l'avant. L'accouplement doit obligatoirement intervenir dans les heures qui suivent une mue, lorsque les téguments des femelles sont encore suffisamment mous, et cela même si la femelle est immature et incapable de pondre. L'accouplement et la ponte peuvent être ainsi séparés par une durée de plusieurs jours, en fait un cycle d'intermue.

- les espèces présentant un thélycum ouvert (cas de *L. stylirostris* ou *L. vannamei*) en forme d'une simple dépression où le mâle vient déposer ses deux spermatophores. L'accouplement a lieu juste avant la ponte c'est-à-dire lorsque l'ovaire est mûr.

Chez les mâles, il existe un organe copulateur, le pétasma, réalisé par la jonction des deux rames internes modifiées de la première paire de pléopodes, qui intervient pour guider le cheminement des spermatophores depuis les orifices génitaux mâles jusqu'au thélycum de la femelle au cours de l'accouplement. Chez tous les crustacés décapodes, le transfert des gamètes mâles intervient au cours d'un véritable accouplement; le mâle dépose sur la femelle des spermatophores, capsules cornées plus ou moins ornementées qui contiennent les spermatozoïdes. Ceux-ci seront disponibles pour la fécondation des ovocytes au moment de la ponte. Thélycum et pétasma sont complètement développés à l'âge de 4 ou 5 mois. L'activité sexuelle chez les mâles est plus précoce que chez les femelles. Chez *L. stylirostris* dans le milieu naturel, la maturation sexuelle des adultes peut intervenir dès le 6^{ème} mois, celle-ci est liée au cycle de mue. La reproduction s'effectue en période chaude lorsque la température de l'eau avoisine 28-29°C.

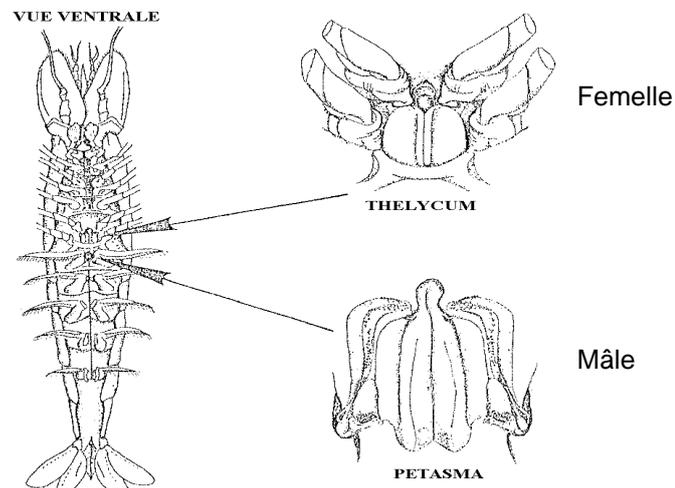


Figure II.2 : Emplacement des organes copulateurs femelle et mâle chez les pénéides.

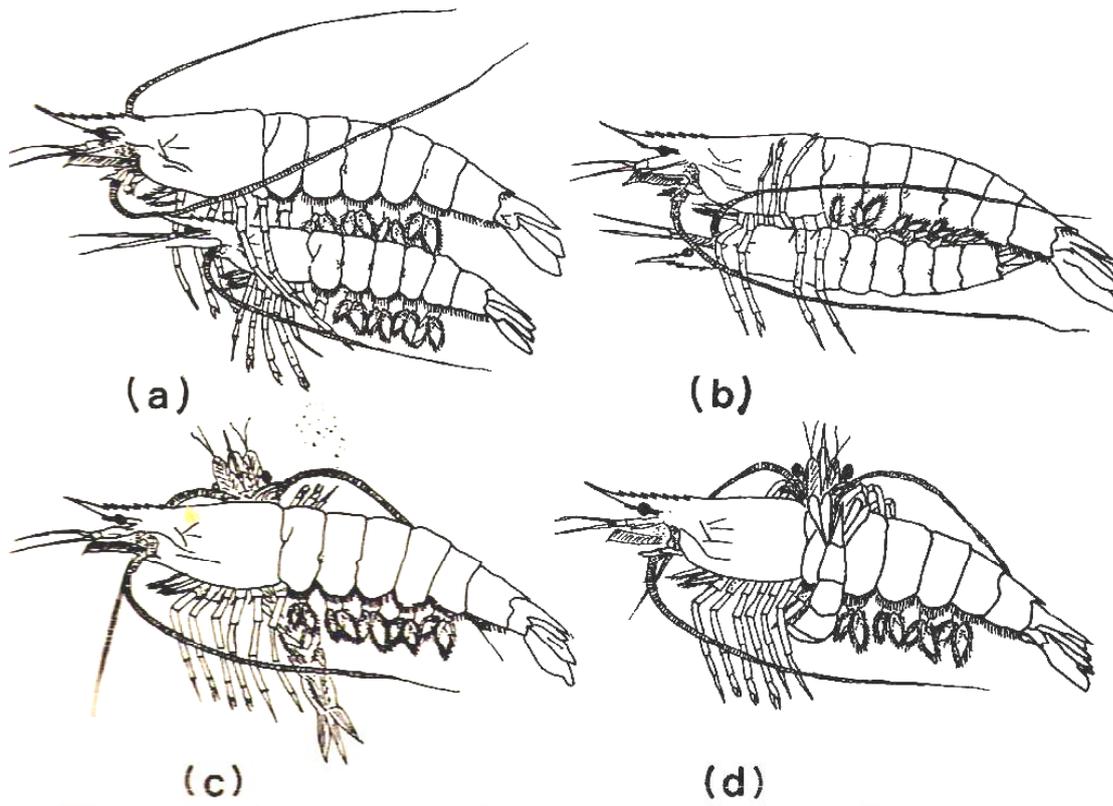


Figure II.3 : Différentes phases de l'accouplement chez *Penaeus monodon* (d'après Primavera, 1979). (a) nage parallèle de la femelle (au dessus) et du mâle(en dessous) ; (b) mâle se retournant et s'accrochant à la femelle ; (c) mâle se mettant perpendiculairement à la femelle (d) mâle enroulé autour de la femelle et donnant des coups de tête et de queue simultanément.

Chez les pénéidés, une femelle peut émettre, dans le milieu, plusieurs centaines de milliers d'œufs par ponte qui se déposent lentement sur le fond. Le développement embryonnaire dure entre 14 et 18 heures en fonction de la température (Fig. II.4).

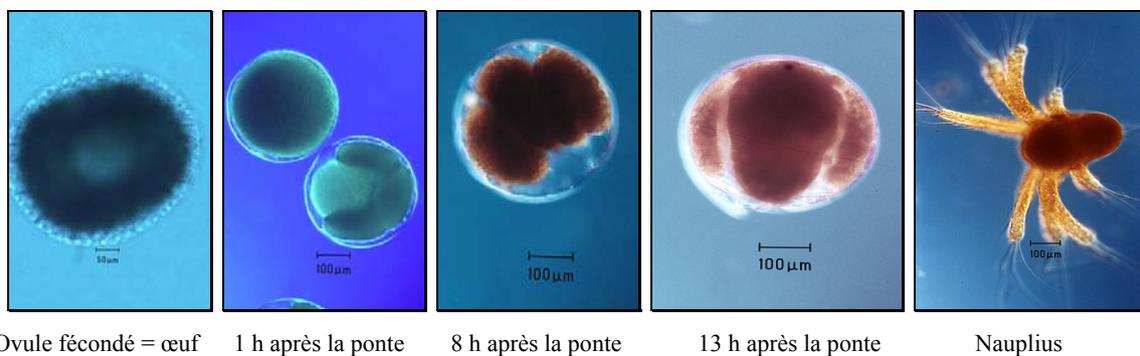


Figure II.4 : Différentes phases lors de l'évolution embryonnaire chez les pénéidés (photos AIMS).

Les larves écloses vont passer par trois stades larvaires eux-mêmes divisés en 3 ou 6 sous-stades et 8 stades post-larvaires :

- Nauplius de 1 à 5-6 (Nii1 à Nii5-6)
- Zoé de 1 à 3 (Z1 à Z3)
- Mysis de 1 à 3 (M1 à M3)
- Post-larve de 1 à 9 (PL1 à PL9)

II.1.3 Le développement larvaire et post-larvaire

II.1.3.1 Les stades nauplius

A l'éclosion, l'oeuf donne naissance à un nauplius, considéré comme la larve primitive de tous les crustacés, caractérisé par la possession de trois paires d'appendices : les antennules, les antennes et les mandibules, et d'un oeil unique médian, l'oeil nauplien. Les trois appendices du nauplius ont une fonction natatoire (Fig. II.5). Cette larve est dépourvue de bouche et se nourrit uniquement des réserves vitellines contenues dans l'oeuf. Il existe cinq ou six stades naupliens successifs, chacun durant entre 8 et 10 heures. Les nauplii ont une taille moyenne de 200 à 250 μm , s'allongeant légèrement au cours des mues successives.

Une des caractéristiques principales de ce stade reste le **phototropisme positif** très marqué, qui permet de les concentrer dans une petite zone éclairée à l'intérieur du bassin d'élevage.

II.1.3.2 Les stades zoés

Le nauplius se métamorphose en une larve zoé capable de s'alimenter. Elle possède une carapace céphalothoracique distincte, un abdomen terminé par un telson garni de longues soies terminales et un tube digestif fonctionnel (Fig. II.6). On distingue trois stades zoé successifs. Le premier, protozoé ou zoé 1, est caractérisé par l'absence de pédoncules oculaires. alors que chez les zoé 2 et 3, les yeux sont pédonculés. Ces trois stades zoé durent chacun plus de 24 heures. Les larves zoé 1 et 2 se nourrissent d'algues dont la taille varie de quelques microns à quelques dizaines de microns de diamètre alors que la zoé 3 a un régime carnivore et peut être nourrie avec des proies vivantes comme des artémies, *Artemia sp.*

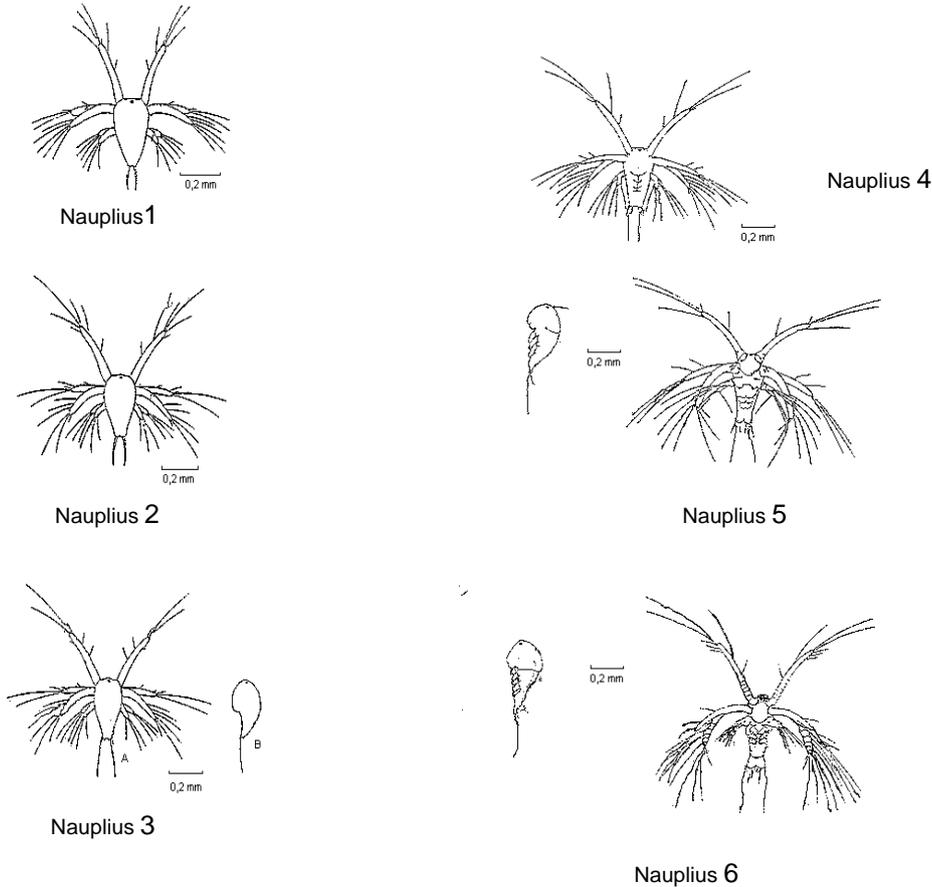


Figure II.5 : Les stades nauplius chez les péneïdes.

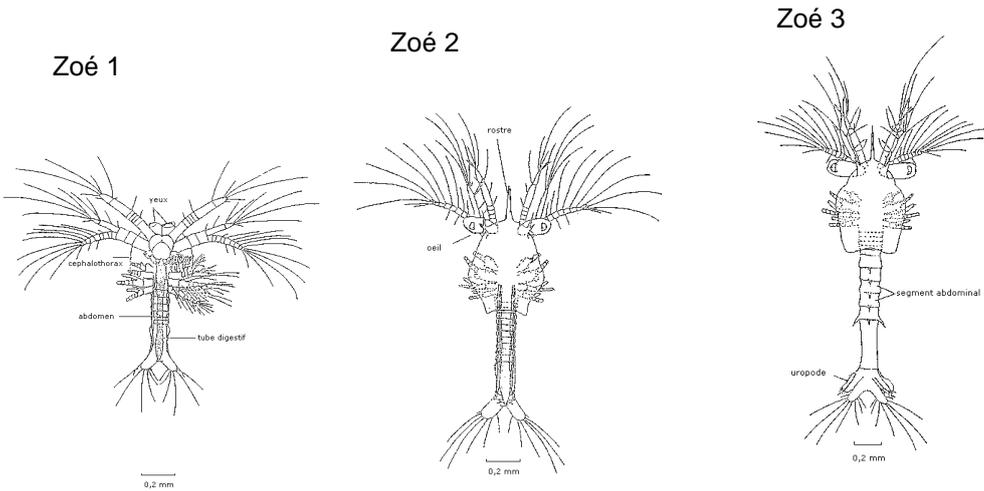


Figure II.6 : Les différents stades zoé chez *L. stylirostris*.

II.1.3.3 Les stades mysis

La phase suivante diffère profondément du dernier stade zoé, elle est dénommée mysis. Cette larve a grossièrement l'apparence d'une petite crevette mais s'en distingue facilement par ses pattes thoraciques démesurées, dépourvues de pinces et servant à la nage, son appendice caudal et son rostre développé (Fig. II.7). Le comportement de la mysis est très différent de celui de la zoé : alors que cette dernière se déplace par saccade et se tient verticalement dans l'eau, la tête orientée vers le haut, la mysis se tient la tête en bas avec, de temps en temps de brusques mouvements de montée. Comme chez les zoés, il existe trois stades mysis successifs, séparés par des mues, qui se distinguent essentiellement par la complexification des appendices. Les mysis ont un régime carnivore assez strict, en particulier pour les M2 et M3 et les nauplii d'artémies constituent alors l'essentiel de la nourriture dans les élevages.

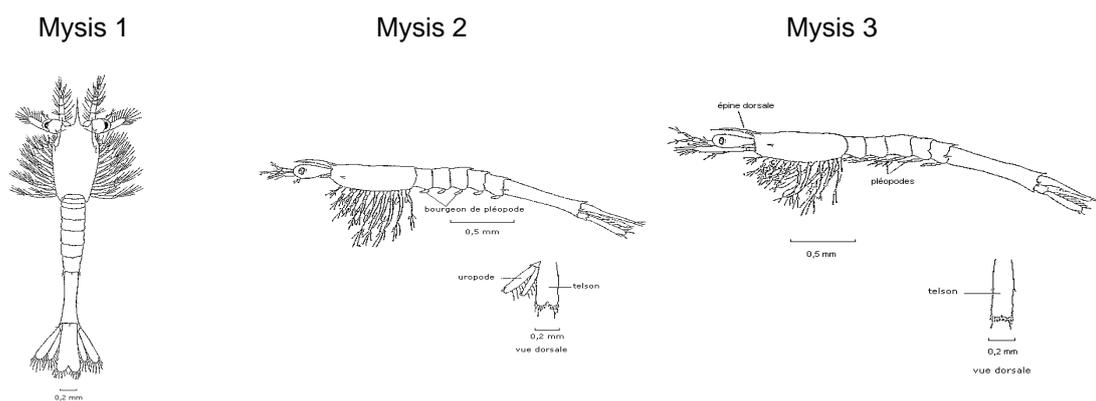


Figure II.7 : Différents stades mysis chez *L. stylirostris*.

II.1.3.4 Les stades post-larvaires

A la suite d'une réelle métamorphose, la mysis 3 donne naissance à une jeune crevette très semblable à l'animal adulte, dénommée post-larve. Celle-ci est caractérisée en particulier par le nombre et la disposition des épines ornant le rostre et les sculptures de la carapace céphalothoracique, ce qui permet de distinguer les différents stades post-larvaires (Fig. II.8). Le principal caractère séparant les mysis des post-larves reste, chez ces dernières, la présence d'appendices abdominaux utilisés pour la nage. La jeune post-larve mène une vie plutôt pélagique mais son comportement se modifie graduellement. Au bout du sixième ou huitième

jour, elle commence à acquérir le comportement des adultes : certaines espèces s'enfouissent mais plus généralement, le comportement se scinde en deux phases distinctes. L'une nocturne est active avec prise de nourriture, mue, déplacement, migration etc.. et l'autre, diurne, est de repos.

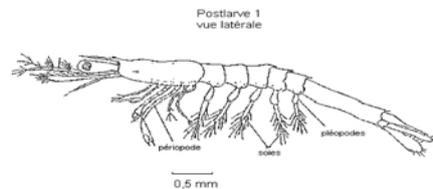


Figure II.8 : Post-larve de *L. stylirostris*.

De manière pratique, les stades post-larvaires peuvent être différenciés aisément sous la loupe binoculaire par comptage du nombre d'épines sur la partie supérieure et sur la partie inférieure du rostre. Il faut distinguer le stade post-larvaire et l'âge des post-larves. Ainsi, dans le tableau II.1 :

- le stade post-larvaire PL_i est caractérisé par sa formule rostrale [x-y] où x est le nombre d'épines supérieures et y, le nombre d'épines inférieures.

- L'âge de la post-larve, sous l'abréviation P_j, où j est le nombre de jours après la métamorphose. Ainsi, des post-larves d'âges différents peuvent avoir un stade post-larvaire équivalent sous l'effet de la température, de la nourriture...

Le comportement des post-larves se modifie graduellement, passant d'une vie pélagique à une vie benthique et se rapprochant des eaux côtières au fur et à mesure de leur développement. L'acquisition de la morphologie définitive est atteinte un mois et demi à plus de deux mois après l'éclosion, selon les espèces et en fonction des facteurs du milieu, à l'exception des caractères sexuels secondaires qui se développent de manière progressive au cours de plusieurs mues successives.

La croissance des crevettes est caractérisée par le phénomène de mue résultant de processus métaboliques et morphologiques qui permettent, avec le rejet de l'exosquelette, la croissance des individus. Cette mue permet, en outre, le rejet des parasites externes, la régénération des appendices ainsi que la reproduction chez certaines espèces.

Les différents stades de développement chez *L. stylirostris* et leurs caractéristiques sont résumés dans le tableau II.2 :

Tableau II.1 : Relation entre formule rostrale, stade post-larvaire et âge de la post-larve à 29°C chez *L. stylirostris* (Le Ball (1989) et Pham, Ifremer, données non publiées).

	Stade post-larvaire (PLi)	Age post-larvaire (Pj) à 29 °C, 35 ppt
Formule Rostrale		
[1-0]	PL1	P1 à P3
[2-0]	PL2 et PL3	P4 à P7
[3-0]	PL4 et PL5	P8 à P12
[4-0] et [4-1]	PL 6	P13 à P14
[5-0], [5-1] et [5-2]	PL 7	P15 à P18
[6-0], [6-1] et [6-2]	PL 8	P19 à P22
[7-2], [7-3] et [7-4] ;	PL 9	> P22
[8-3] et [8-4] ; [9-3] et [9-4]		

Tableau II.2 : Principales caractéristiques des stades larvaires et post-larvaires chez les pénéidés.

Stade	Nauplius	Zoé	Mysis	Post-larve
Nombre de stades	5-6	3	3	8
Durée	2 jours	3 jours	3 jours	~ 30 jours
Caractéristiques	œil médian, trois paires d'appendices phototropisme positif	distinction céphalothorax et abdomen, tube digestif fonctionnel 2 yeux à Z1, pédonculés à Z2	pattes thoraciques, appendice caudale, rostre développé	épines sur le rostre, sculpture céphalothoracique, appendices abdominaux soyeux
Habitat	Pleine eau- Haute mer	pleine eau- Haute mer	pleine eau- Haute mer	pleine eau puis fond Se rapproche des côtes
Nourriture	réserves vitellines	phytoplancton	zooplancton	Zooplancton-détritivore
Mode de déplacement	nage par saccades	nage régulière	nage tête en bas avec mouvements brusques de montée	Nage et marche en avant

II.1.4 Les juvéniles et adultes

Extérieurement, les crevettes pénéides se distinguent d'une part, par le chevauchement du bord antérieur de chaque segment par la carapace du segment précédent et d'autre part, par le sixième et dernier segment abdominal qui est dorsalement caréné (Fig. II.9). La morphologie de *L. stylirostris* est semblable à celle des autres pénéides, mais elle possède toutefois des particularités comme un rostre très développé avec 8 dents sur la partie dorsale et 3 sur la partie ventrale, une cuticule lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert et un dimorphisme sexuel très marqué.

La mue permet aux animaux possédant un exosquelette de se débarrasser de leur carapace pour grandir. Ce phénomène intervient de manière irrégulière et dépend de l'âge, des conditions environnementales, de la disponibilité de la nourriture... Cette particularité chez les crustacés rend les études physiologiques très délicates et peut parfois expliquer les différences de résultats dans des expérimentations similaires. Il est toutefois possible de minimiser son impact en sélectionnant les animaux à un stade donné.

Cinq stades d'intermue entourant la mue sont décrits par Robertson *et al.* (1987) chez l'adulte de *L. stylirostris* à 28°C et sont schématisés dans la figure II.10 et le tableau II.3 :

- Le stade A : il succède immédiatement à la mue et la matrice cellulaire pigmentée enrobe complètement les bases sétales ; il dure 1 jour
- Le stade B : La matrice cellulaire s'est rétractée et laisse un espace clair au niveau de la base des soies ; il dure 2 jours.
- Le stade d'intermue C : La matrice a complètement disparu au niveau de la base des soies et une ligne épidermique pigmentée apparaît à la limite inférieure des boucles sétales ; considéré comme la phase de stabilité physiologique, il dure 2 jours.
- Le stade D0-D1 : Ce stade est identifié par la rétractation de la ligne épidermique de la base des boucles sétales, se séparant ainsi de l'ancienne cuticule. Il dure 3 jours.
- Le stade D2-D3 : Ce stade précède la mue ; le pigment épidermique est de plus en plus éloigné de la base des anciennes soies et le développement de nouvelles soies est visible. Il dure 3-4 jours.

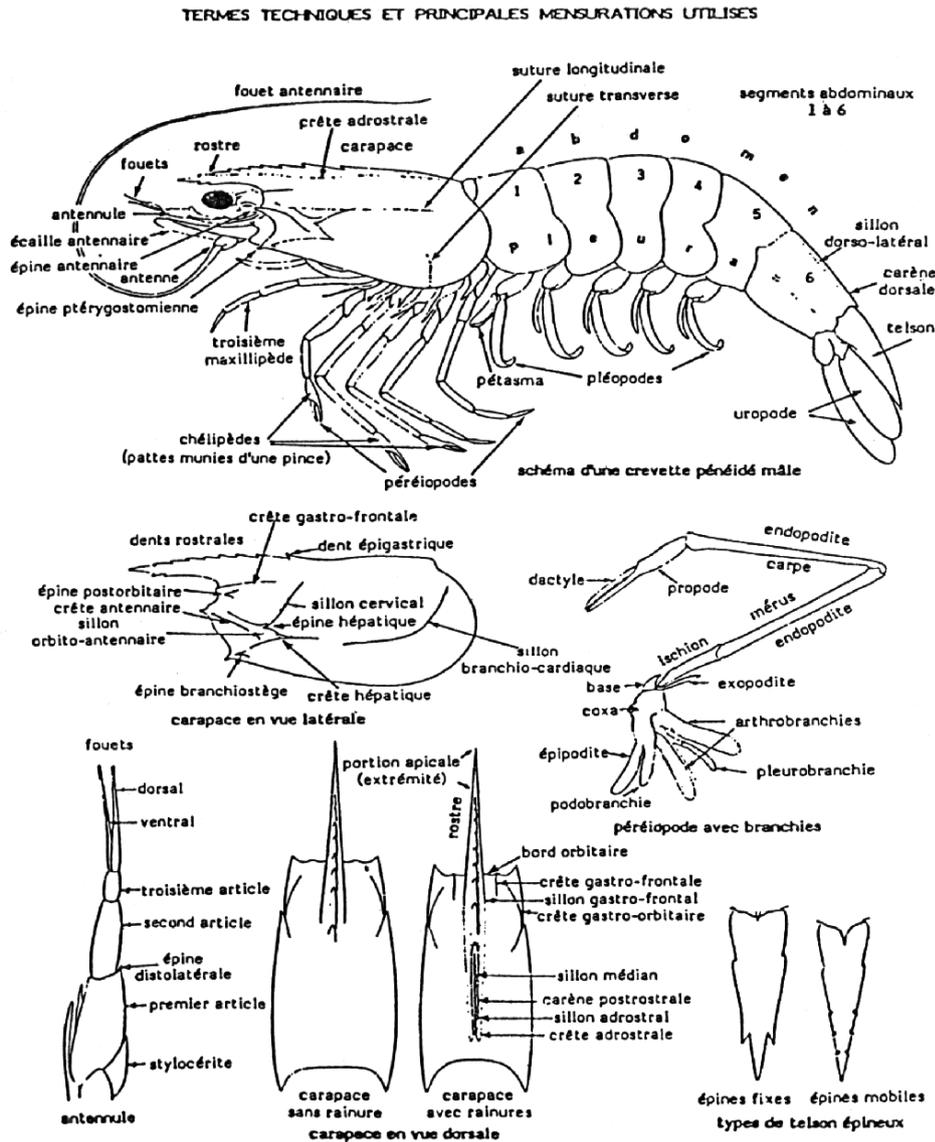


Figure II.9 : Anatomie générale d'une crevette pénéide.

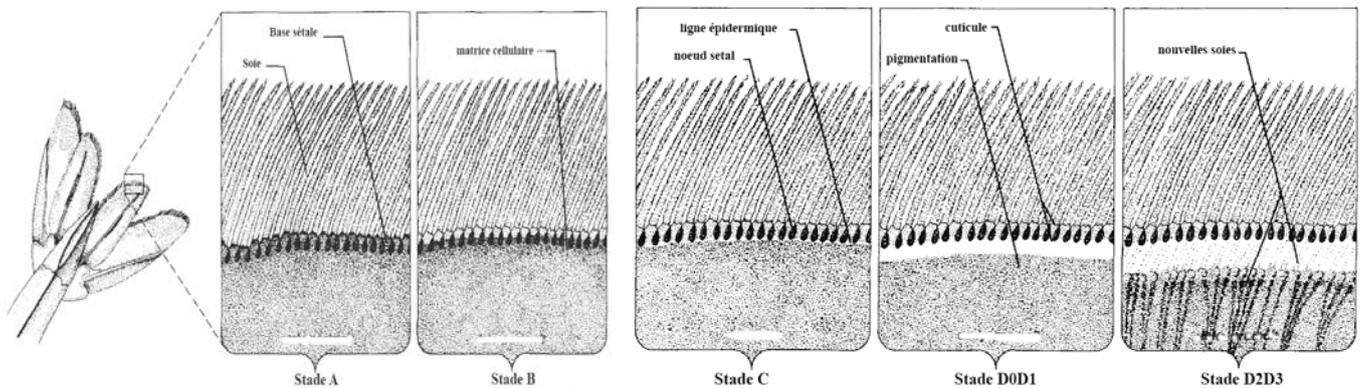


Figure II.10 : Les différents stades du cycle de mue chez *L. stylirostris* déterminés par l'implantation des soies et de leur base au niveau de l'uropode (selon Robertson *et al.*, 1987).

Durant la mue, l'animal effectue des mouvements brusques et saccadés afin de se débarrasser de son ancienne carapace en se dégageant d'abord de la cuticule du céphalothorax, puis de celle de l'abdomen. Cette phase est très rapide et dure généralement moins d'une minute (tableau II.3).

Tableau II.3 : Durée des différents stades d'intermue chez l'adulte de *L. stylirostris* à une température de 27-29°C.

Stade	A	B	C	D0D1	D2D3	Mue
Durée (jours)	1	2	2	3	3-4	< 1 min.

II.2 L'osmorégulation

La salinité est un paramètre important dans le recrutement, la répartition ou la reproduction des animaux aquatiques (Anger, 2003). Les crustacés décapodes sont présents dans tous les types de milieux terrestres, eau douce, eau saumâtre ou milieu océanique. Certaines espèces se cantonnent à un milieu osmotique stable, d'autres peuvent changer de milieu au cours de leur vie, ou migrer de manière épisodique à la recherche de meilleures conditions de nourriture, de température, de sécurité...

Quelque soit le milieu dans lequel l'animal évolue, ce dernier est soumis à des processus physiologiques permettant de maintenir l'équilibre hydrominéral entre son milieu intérieur et le milieu environnant : c'est le phénomène de l'osmorégulation. Cette régulation peut avoir lieu au niveau du tégument en limitant la perméabilité ou par des mécanismes compensatoires qui nécessitent de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

II.2.1 Les différents types de régulation

La capacité osmorégulatrice (CO) est définie comme la différence de pression osmotique entre le milieu intérieur de l'animal et son milieu environnant (Charmantier *et al.*, 1989). On peut ainsi distinguer trois états en fonction de la salinité du milieu dans lequel baigne l'animal (Fig. II.11) :

- l'animal est osmoconforme : la CO est nulle; la pression osmotique de l'hémolymphe est identique à celle du milieu extérieur, c'est le point iso-osmotique;
- l'animal hyper-régule : la CO est positive ; la pression osmotique de l'hémolymphe est au dessus de celle du milieu extérieur;

- l'animal hypo-régule : la CO est négative ; la pression osmotique de l'hémolymphe est en dessous de celle du milieu environnant.

Les pénéidés sont des animaux euryhalins avec une capacité à hyper-réguler ou hypo-réguler en fonction de la salinité du milieu (Castille et Lawrence, 1981a; Mantel et Farmer, 1983; Chen et Lin, 1994; Huong *et al.*, 2010). Il a été montré que chez *L. stylirostris* les juvéniles de 10 g et des adultes de 40 g hyper-régulaient en milieu déssalé et hypo-régulaient en eau de mer et que leur point iso-osmotique respectif se situait à 735 (Lemaire *et al.*, 2002) et 760 mOsm/kg (Wabete *et al.*, 2006) à 27-28°C (Fig. II.12).

L'aptitude à osmoréguler varie en fonction de plusieurs facteurs: l'espèce, le stade de mue, la température, des facteurs de stress ou encore le stade de développement de l'animal (Lignot *et al.*, 2000 ; Lemaire *et al.*, 2002 ; Buckle *et al.*, 2006). A partir de cette caractéristique, Charmantier (1998) a défini trois modèles d'osmorégulation chez les crustacés :

- un premier groupe d'espèces généralement marines et sténohalines, qui sont osmoconformes toute leur vie telles les araignées de mer *Libinia emarginata* (Kalber, 1970) et *Chionoecetes opilio* (Charmantier and Charmantier-Daures, 1995) et les langoustes *Palunirus sp.* (Dall, 1974; Lucu *et al.*, 2000) .

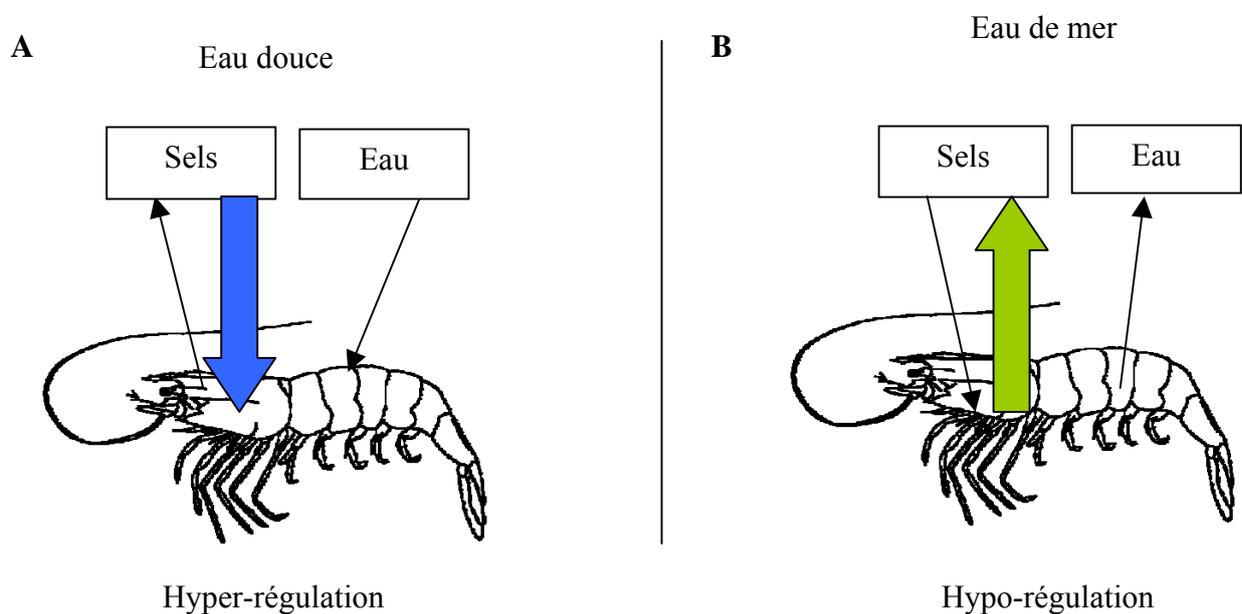


Figure II.11 : A : Hyper-régulation en eau de douce ; entrée d'eau et perte passive de sels (flèches fines). Absorption active de sels (flèche pleine). B : Hypo-régulation en eau de mer ; Perte d'eau et entrée passive de sels (flèches fines). Rejet actif de sels (flèche pleine).

- un deuxième groupe d'animaux montrant une capacité importante à réguler dès les premiers jours de leur vie et qui ont une grande tolérance aux variations de salinité; ils sont essentiellement euryhalins. On retrouve les cladocères (Aladin et Potts, 1995), l'amphipode *Gammarus duebeni* (Morritt et Spicer, 1995) et la chevrette *Macrobrachium petersi* (Read, 1984).

- enfin, le troisième groupe dont la capacité à réguler évolue en fonction du stade de développement ; de faible, lorsque l'animal est sous la forme larvaire, à fort dans les phases juvéniles et adultes. Ces animaux passent donc de la catégorie des sténohalins à euryhalins au cours de leur vie. Beaucoup de crustacés décapodes appartiennent à ce groupe dont les homards *Homarus americanus* (Charmantier *et al.*, 1984; Charmantier *et al.*, 1988a) et *H. gammarus* (Thuet *et al.*, 1988), les crabes *Cancer irroratus* (Charmantier et Charmantier-Daures, 1991) et *Carcinus maenas* (Cieluch *et al.*, 2004) et les crevettes *Marsupenaeus japonicus* (Charmantier, 1986; Charmantier *et al.*, 1988b) et *Crangon crangon* (Cieluch *et al.*, 2005).

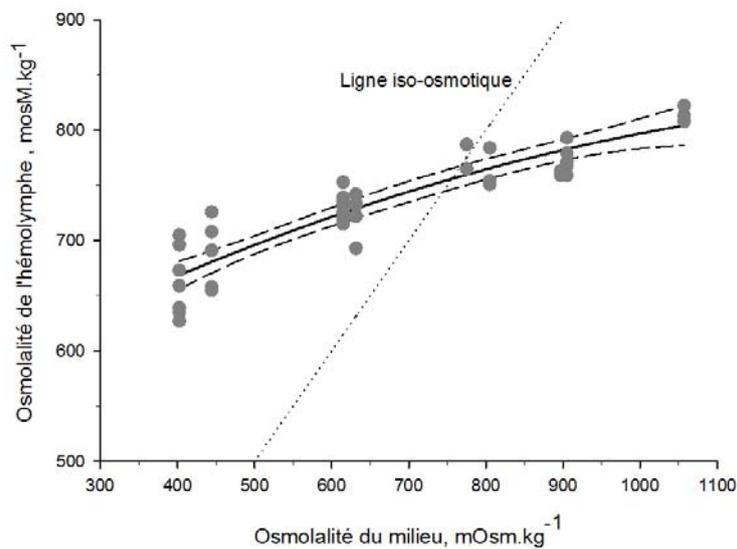


Figure II.12 : Osmolalité de l'hémolymphe chez l'adulte de *L. stylirostris* en fonction de l'osmolalité du milieu (Wabete *et al.*, 2006).

II.2.2 Les tissus impliqués

La glande antennaire, les néphrons, le tube digestif et les branchies sont les organes impliqués dans les activités osmorégulatrices chez les décapodes (Mantel et Farmer, 1983; De Renzis et Bornancin, 1984, Taylor et Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Charmantier, 1998; Charmantier *et al.*, 2001; Lucu et Towle, 2003; Charmantier *et al.*, 2009).

Au niveau de la cavité branchiale, outre leur activité respiratoire, les branchies restent probablement le principal site des échanges ioniques, leur nombre et leurs ramifications augmentant la surface de contact avec le milieu extérieur. Ce tissu multifonctionnel a également un rôle dans l'excrétion des déchets azotés et la régulation acide-base (Burnett *et al.*, 1985; Gilles et Péqueux, 1985; Henry et Wheatly, 1992; Taylor et Taylor, 1992; Péqueux, 1995). Chez certaines espèces, les branchies peuvent avoir des rôles bien distincts en fonction de leur localisation; ainsi, chez les crabes brachyours, les branchies postérieures sont impliquées fortement dans l'osmorégulation alors que les branchies antérieures ont plutôt un rôle dans les phénomènes de respiration (Siebers *et al.*, 1982; Flick et Haond, 2000; Castilho *et al.*, 2001; Lucu et Towle, 2003; Torres *et al.*, 2007).

Selon les espèces, d'autres tissus de la cavité branchiale comme les épipodites et le branchiostégite peuvent également participer à l'osmorégulation. L'implication de ces deux organes n'est pas forcément simultanée ou permanente au cours du développement de l'animal (Bouaricha *et al.*, 1994; Lignot *et al.*, 1999a; Lignot and Charmantier, 2001; Cieluch *et al.*, 2004; Cieluch *et al.*, 2005; Lignot *et al.*, 2005).

Chez *L. stylirsotris*, la chambre branchiale est délimitée par le branchiostégite du côté extérieur et par la pleure du côté intérieur (Fig. II.13). Elle assure la protection des branchies et favorise la circulation d'eau à l'aide notamment du scaphognatite. Un épipodite est parfois attaché au coxopodite de certains appendices. Cette excroissance, qui s'insinue entre les branchies, s'élargit dans la partie distale et se termine par une bifurcation avec des soies. Ces dernières servent probablement à éviter l'encrassement des branchies en assurant une ventilation (Bauer, 1999).

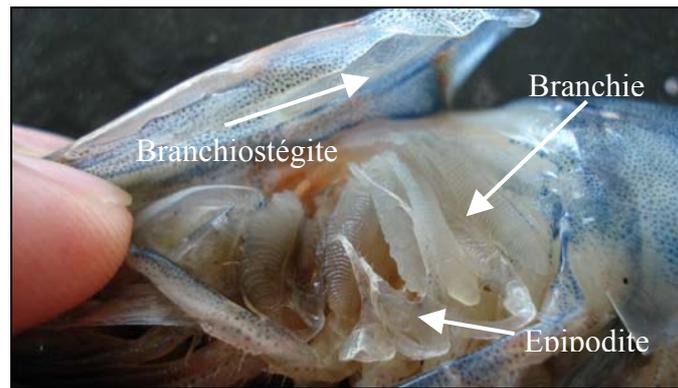


Figure II.13 : Emplacement des différents organes osmorégulateurs dans la cavité branchiale chez *L. stylirostris*.

Trois types de branchies peuvent être distingués au niveau des appendices thoraciques chez les pénéidés (Fig. II.14) :

- les arthrobranchies se situent sur l'articulation du corps et de l'appendice;
- les podobranchies dont l'attache est la plus basse, sur le coxopodite de l'appendice ;
- les pleurobranchies, généralement en arrière des deux autres branchies et fixées sur la pleure.

Tous les types de branchies ne sont pas forcément présentes chez les différentes espèces de crustacés et leur nombre varie en fonction des espèces.

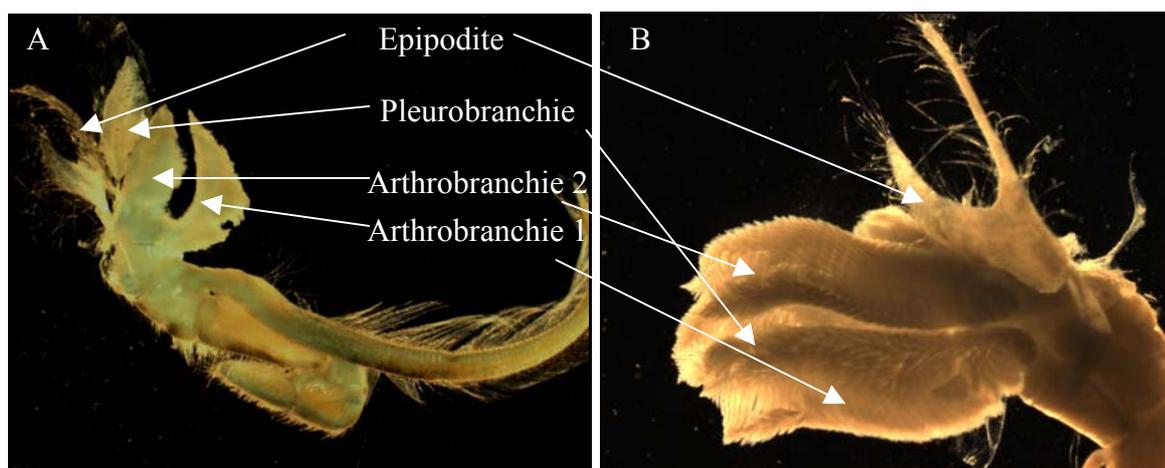


Figure II.14 : Insertion des organes osmorégulateurs au niveau des appendices chez *L. stylirostris*. A : 2^{ème} maxillipède 2 ; B : 1^{ère} périopode.

Dans la taxonomie, les pénéidés font partie du sous-ordre des Dendrobranchiates. Elles sont caractérisées par des branchies avec des ramifications à plusieurs niveaux. Chaque branchie est constituée d'un axe central long appelé rachis, d'où partent des paires de lamelles

branchiales en séries le long de cet axe. La disposition ainsi que l'incurvation des lamelles les unes vers les autres, forment un espace creux longitudinal entre elles. Chaque ramification secondaire est à son tour divisée en filaments, qui peuvent être aussi ramifiés (Fig. II.15). Ces branchies, appelées dendrobranches, contrastent avec les branchies moins ramifiées chez les Trichobranchiates et les Phyllobranchiates.

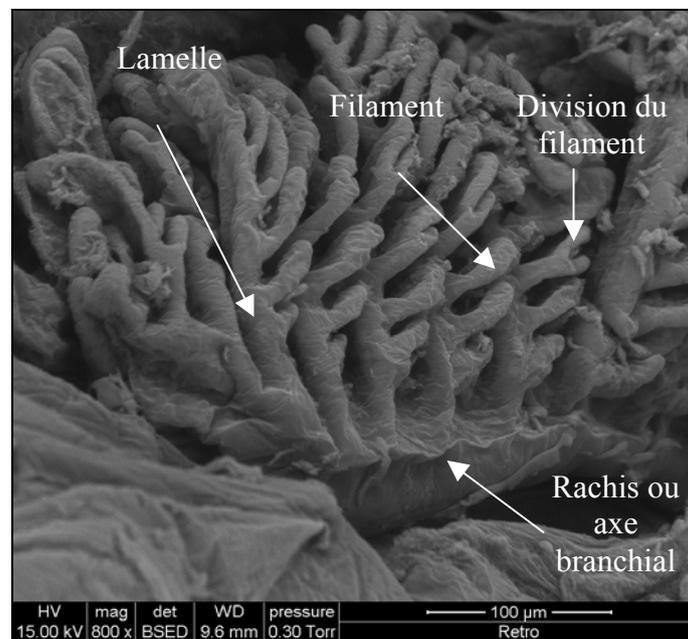


Figure II.15 : Morphologie de la dendrobranchie chez *L. stylirostris* en microscopie à balayage (photo Lignot J.H.).

II.2.3 La régulation au niveau cellulaire

Les organes osmorégulateurs possèdent un épithélium qui abrite des cellules spécialisées dans la régulation ionique, les ionocytes (Taylor et Taylor, 1992). Ces cellules, encore appelées « mitochondria rich cell » (MRC) ou « Chloride Cell » (CC) chez les poissons (Foskett et Scheffey, 1982), sont caractérisées par un nombre élevé de mitochondries associées à des invaginations de la membrane basolatérale ainsi que des microvillosités apicales, augmentant ainsi les surfaces, et typiques des sites d'échanges d'ions (Fig. II.16). Cet épithélium différencié est la barrière qui régie le flux des sels entre le milieu extérieur et les ionocytes (régulation extracellulaire) d'une part et entre les ionocytes et l'hémolymphe (régulation intracellulaire) d'autre part. Elles ont été décrites la première fois en 1932 par Keys et Willmer sur des branchies d'anguille *Anguilla vulgaris*. Chez les téléostéens, elles sont surtout présentes dans la région basale des lamelles secondaires des branchies et dans l'épithélium de l'opercule. Dans les stades précoces, quand les branchies ne sont pas encore présentes, les MRC se trouvent dans le tégument et le sac vitellin. Chez les crustacés, les

ionocytes se retrouvent essentiellement dans les tissus de la cavité branchiale (Bouaricha *et al.*, 1994 ; Lignot *et al.*, 2001; Lignot *et al.*, 2005; Cieluch *et al.*, 2007) et dans la glande antennaire (Khodabandeh *et al.*, 2005).

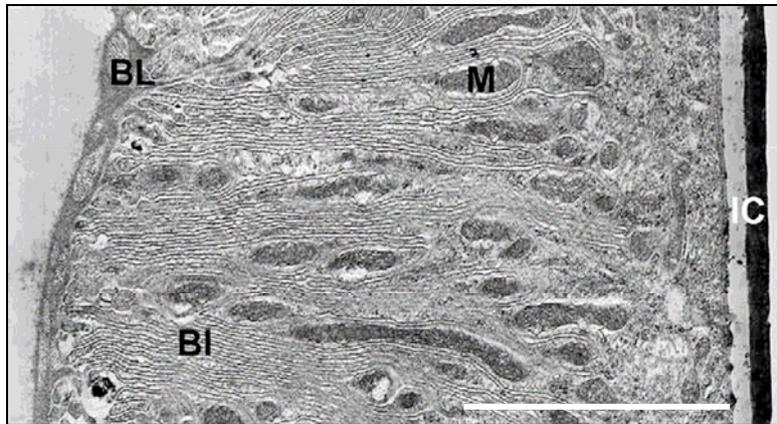


Figure II.16 : Image en microscopie électronique à transmission de l'épithélium de branchiostégite de *Palaemon adspersus*. Echelle = 5 µm. BI : invaginations basales ; IC : Cuticule interne ; BL : Lame Basale ; M : Mitochondrie. (Martinez *et al.*, 2005).

La pression osmotique de l'hémolymphe chez la plupart des crustacés est assurée à plus de 90% par les mouvements d'ions Na^+ et Cl^- au travers de la membrane plasmique des cellules (Prosner, 1973 ; Mantel et Farmer, 1983). Cependant, les processus de diffusion passive au niveau des membranes cellulaires concernent essentiellement les molécules d' O_2 , de CO_2 et les molécules polaires non chargées comme l'urée et l'éthanol. La diffusion passive des ions étant nulle ou trop lente pour qu'il y ait un transfert significatif, les déplacements de ces solutés entre le cytosol et l'hémolymphe d'une part, et le cytosol et le milieu extérieur d'autre part, sont assurés au niveau de la membrane cellulaire par plusieurs transporteurs enzymatiques. Chaque type cellulaire contient un ensemble spécifique de protéines de transport qui assure le passage de certains ions ou molécules. Les processus physiologiques tels que le maintien du pH cytosolique, le flux orienté de l'eau ou l'accumulation de substances dans la cellule sont assurés par la combinaison spécifique des protéines transmembranaires. Il existe trois classes de transporteurs :

- les **pompes** : ce sont les ATPases qui utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour faire circuler les ions ou molécules contre leur gradient chimique et/ou potentiel électrique. Ces processus sont énergétiquement favorables et sont appelés transports actifs.

- les **canaux protéiques** : appelés encore processus de diffusion facilitée, ils permettent le transfert de l'eau, des ions ou des petites molécules hydrophyles dans le sens de leur gradient chimique ou électrique. Certains canaux sont ouverts en permanence, on les appelle

alors canaux de fuite ; d'autres s'ouvrent uniquement sous l'impulsion de signaux chimiques ou électriques, ce sont alors des canaux dépendant d'un ligand ou voltage-dépendants.

- les **transporteurs** proprement dits qui sont de 3 types : les uniporteurs qui transportent une seule sorte de molécules (glucose et des acides aminées) dans le sens du gradient de concentration par diffusion facilitée. Les co-transporteurs assurent le déplacement d'un soluté contre son gradient de concentration simultanément avec le déplacement en sens inverse (les antiporteurs) ou dans le même sens (les symporteurs) d'autres solutés dans le sens de leur gradient de concentration. L'énergie utilisée par les co-transporteurs est issue du gradient électrochimique engendré généralement par le fonctionnement des ATPases d'où le nom de transport actif secondaire.

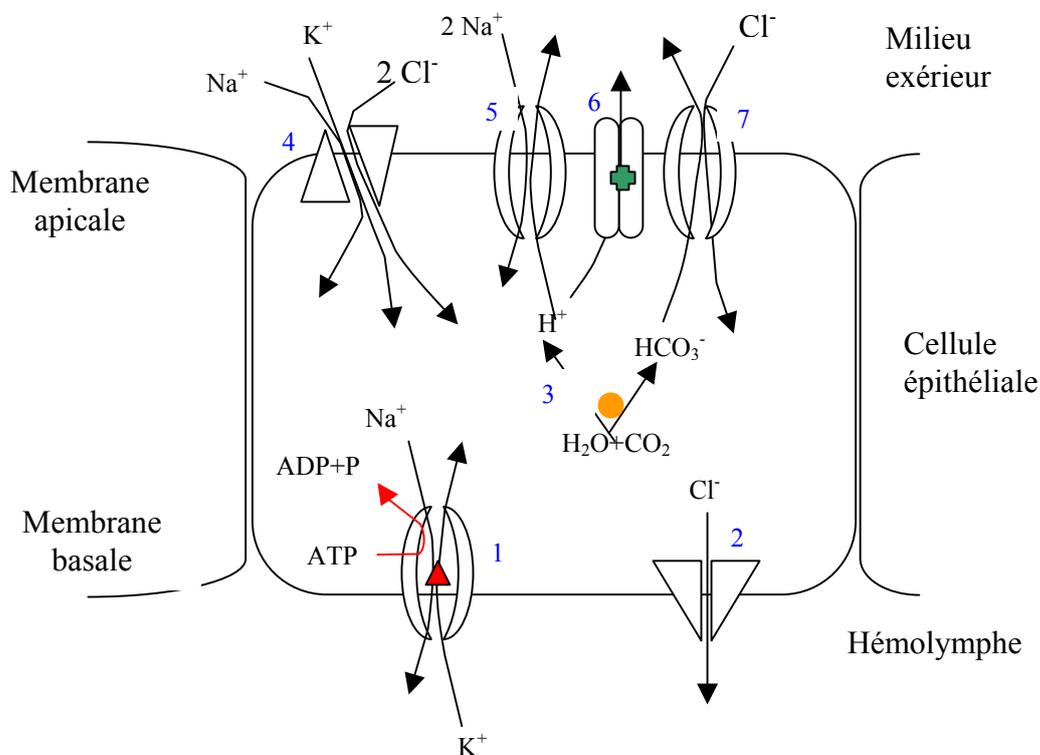


Figure II.17 : Modèle hypothétique des processus d'échanges d'ions entre le milieu extérieur, les cellules épithéliales et l'hémolymphe au niveau des branchies de crabes euryhalins hyperosmorégulateurs (selon Towle et Weihrauch, 2001). Au niveau de la membrane basolatérale : (1) Na^+K^+ ATPase, (2) Canal Chlore ; Au niveau de la membrane apicale : (3) Anhydrase Carbonique, (4) Cotransporteur NKCC (5) Echangeur Sodium/Hydrogène, (6) V-type H^+ ATPase (7) Echangeur Chlore/Bicarbonate.

Les transporteurs les plus couramment étudiés dans les phénomènes d'osmorégulation sont la Na^+K^+ -ATPase (NKA), le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC), le canal à chlore ou (CFTR), l'anhydrase carbonique (CA), et la V- H^+ -ATPase (VHA) (Morris 2001; Towle et Weihrauch, 2001 ; Khodabandeh *et al.*, 2006 ; Santos *et al.*, 2007 ; Tsai et Lin, 2007). La figure II.17

résume les processus d'échanges ions théoriques mettant en jeu ces différents transporteurs chez les crabes euryhalins.

Chez *L. stylirostris*, nous nous sommes limités à l'étude de trois de ces transporteurs qui sont donc détaillés plus précisément ci-après : la NKA, le NKCC et le CFTR .

II.2.3.1 La Na⁺K⁺ ATPase (NKA)

La NKA n'est présente que dans les organismes pluricellulaires et elle est considérée comme une molécule clé dans l'évolution des métazoaires. Le chercheur danois Jens C. Skou a été le premier à suggérer un lien entre le transport des ions Na⁺ et K⁺ au travers de la membrane plasmique et l'activité de l'enzyme en 1957 (Therien et Blostein, 2000). Cette protéine transmembranaire fait partie de la famille des P-ATPases. Encore appelée pompe à sodium, elle est la principale voie de transport actif d'ions (Péqueux, 1995 ; Charmantier, 1998 ; Lucu et Towle, 2003). Cette protéine est fortement exprimée au niveau des branchies avec une intensité pouvant cependant varier en fonction de la salinité et suivant les espèces. Les échanges faisant intervenir la NKA sont toujours situés au niveau de la membrane basale ou basolatérale des ionocytes (Ziegler, 1997; Lignot et Charmantier, 2001; Cieluch *et al.*, 2004; Cieluch *et al.*, 2005). L'hydrolyse de l'ATP, catalysée par la NKA, libère de l'énergie pour le transfert de trois Na⁺ du cytosol vers l'hémolymphe et l'entrée de deux ions K⁺ dans la cellule. Pour compenser les pertes de Na⁺ cytoplasmique vers l'hémolymphe, d'autres transporteurs, dont la protéine transmembranaire Na⁺/H⁺ située dans la partie apicale des ionocytes, permettent le transfert de Na⁺ du milieu environnant vers le cytosol.

Du point de vue moléculaire, la NKA est un oligomère composé de deux polypeptides majeurs :

- d'une sous-unité α , d'une taille d'environ de 112 kDa, propre des sous-unités catalytiques des ATPases type P, qui lie et hydrolyse la molécule d'ATP (figure II.18);
- d'une sous-unité β hautement glycosylée, de 40 à 60 kDa, qui fonctionne comme site d'adhésion à la membrane basolatérale et qui module l'affinité de l'enzyme aux ions Na⁺ et K⁺ (Blanco et Mercer, 1988) ;

Une troisième sous-unité γ protéolipidique de 8 à 14 kDa existe uniquement chez certains vertébrés, son rôle dans la régulation de l'activité de la NKA est présumé mais sa fonction exacte reste encore à déterminer.

Le rôle catalytique de la sous-unité α a généré un large intérêt conduisant à de nombreuses études physiologiques, moléculaires et pharmacologiques. Plusieurs isoformes des sous-unités α ($\alpha 1$ à $\alpha 4$) et β ($\beta 1$ à $\beta 3$) existent chez les mammifères mais la combinaison $\alpha 1\beta 1$ semble la

forme majoritaire (Blanco et Mercer, 1998). Chez le poisson *O. mossambicus*, la présence des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ a été démontrée (Lee *et al.*, 1998). Chez le crabe *C. sapidus*, aucune isoforme de α n'a été trouvée dans les différents organes osmorégulateurs et la séquence d'acides aminés de cette sous-unité est identique à 82% avec celle des arthropodes et à plus de 74% avec celle des vertébrés (Towle *et al.*, 2001).

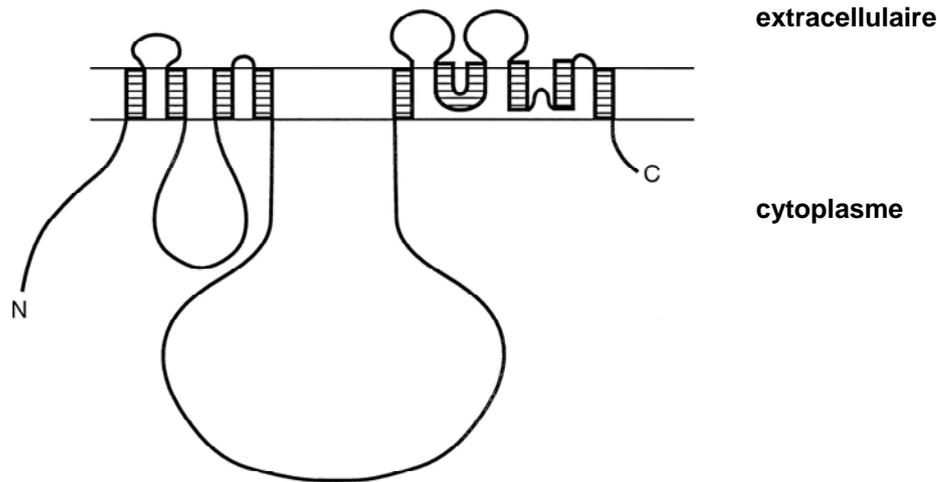


Figure II.18 : Un modèle de la topologie membranaire de la sous-unité α de la Na,K-ATPase. Les parties hachurées représentent les domaines transmembranaires. *N* et *C* désignent respectivement les liaisons terminales NH_2 et COOH . La longueur des régions terminales et de boucles entre deux domaines transmembranaires hydrophobes adjacents sont proportionnels au nombre de résidus d'acides aminés constitutifs (d'après Xié *et al.*, 1996).

II.2.3.2 Le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC)

Le NKCC est présent dans la plupart des cellules animales et joue un rôle dans le transport des ions et la régulation du volume cellulaire. C'est un co-transporteur glycoprotéique possédant une région hydrophobe de 12 domaines transmembranaires. La taille de la protéine est d'environ 150-170 kDa (Marshall *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2004; Tse *et al.*, 2006). La faible concentration cytosolique en Na^+ provoquée par la NKA en position basolatérale dans les ionocytes, engendre un gradient électrochimique favorisant le flux d'un Na^+ dans le sens de son gradient de concentration et d'un K^+ et 2 Cl^- contre leur sens de gradient de concentration, ce transport étant assuré par le NKCC. Deux isoformes de cette protéine avec des séquences d'acides aminés identiques à 60%, ont pu être identifiées par séquençage (Lytle *et al.*, 1995; Hass et Forbush, 1998; Cutler et Cramb 2002): le NKCC1 localisé en position basolatérale dans les cellules des épithéliums sécréteurs et le NKCC2, localisé essentiellement

dans la partie apicale des cellules rénales suggérant son rôle absorbant. Chez les téléostéens, le NKCC est en position basolatérale dans les branchies des salmonidés (Pelis *et al.*, 2001 ; Tipsmark *et al.*, 2002), supposant ainsi son rôle dans la sécrétion ionique en eau de mer. En eau douce, l'action du NKCC apparaît plus discret (Marshall 2002; Hirose *et al.*, 2003) tandis que chez certaines espèces, la localisation est indépendante de la salinité (McCormick *et al.*, 2003). Chez le poisson d'eau douce *Oreochromis mossambicus* (Wu *et al.*, 2003), le NKCC a été localisé pour la première fois en position apicale suggérant son rôle dans l'absorption ionique et l'existence de deux types cellulaires, les ionocytes d'eau douce et ceux d'eau de mer.

II.2.3.3 Le canal à chlore CFTR

Le CFTR ou “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”, est une ATPase de la superfamille « ATP-binding cassette » (ABC). La structure primaire du CFTR est composée de deux motifs répétés constitués chacun d'un domaine hydrophobe transmembranaire, deux domaines cytosoliques avec une importante région hydrophile contenant des séquences susceptibles de lier l'ATP et un domaine de régulation (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). La protéine transmembranaire a été séquencée pour la première fois chez l'homme en 1989 (Riordan *et al.*, 1989) et la mutation du gène codant est responsable de la maladie appelée mucoviscidose ou “Cystic fibrosis” (Chen *et al.* 2001). Le CFTR est une protéine multifonctionnelle et intervient notamment dans la régulation des flux d'ions Cl⁻ (Singer *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2004; Hiroi *et al.*, 2008), et celle des bicarbonates ainsi que dans l'équilibre acide-base (Bradbury *et al.*, 1992 ; Marshall et Singer, 2002). Le CFTR est codé par un seul gène et se compose de cinq domaines dont le domaine R, uniquement présent chez ce transporteur ABC. Son activation chez les mammifères et les poissons nécessite la phosphorylation du domaine R via l'AMP cyclique et la protéine kinase A (Kleizen *et al.*, 2000 ; Marshall, *et al.*, 2009). Avec une taille de l'ordre de 160 kDa, le CFTR est généralement localisé dans la région apicale des ionocytes chez des téléostéens acclimatés à l'eau de mer. Concernant sa fonction et sa localisation en eau douce, les résultats sont variables en fonction des espèces; le CFTR est positionné en position basale chez *Fundulus heteroclitus* (Scott *et al.*, 2004) ou disparaît complètement chez *Tetraodon nigroviridis* (Tang et Lee, 2007). Son expression reste cependant généralement plus forte en eau de mer qu'en eau douce.

Nous avons vu que les juvéniles et les adultes de *L. stylirostris* étaient capables de réguler leur milieu intérieur en fonction de la salinité du milieu environnant. Nous chercherons donc à déterminer quel sont les tissus et les mécanismes enzymatiques qui permettent à l'animal d'assurer son homéostasie. D'autre part, nous avons vu qu'au cours de leur développement, les pénéidés avaient une phase larvaire libre qui les mettaient au contact du milieu aqueux. Nous étudierons donc l'évolution de la tolérance au stress osmotique et de la capacité osmorégulatrice de l'animal au cours de son développement post-embryonnaire afin de déterminer à quel groupe d'ontogenèse de l'osmorégulation appartient la crevette bleue. Enfin par une approche intégrative alliant des techniques de microscopie électronique et des approches immunologiques et moléculaires, nous proposerons un modèle d'osmorégulation chez *L. stylirostris*.

Chapitre III : Détermination des organes de la cavité branchiale impliqués dans l'osmorégulation

III.1	Introduction	37
III.2	Matériels et méthodes	37
III.2.1	Acclimatation des animaux.....	37
III.2.2	Prélèvements.....	38
III.2.3	Histologie.....	38
III.2.4	Microscopie électronique.....	39
III.2.5	Immunohistochimie.....	39
III.2.6	Analyses statistiques.....	41
III.3	Résultats	41
III.3.1	Paramètres physico-chimiques et biologiques.....	41
III.3.2	Capacité-osmorégulatrice.....	42
III.3.3	Dénombrement et localisation topographique des organes osmorégulateurs.....	43
III.3.4	Ultrastructure des tissus osmorégulateurs.....	44
III.3.5	Immunolocalisation de la NKA, du CFTR et du NKCC1.....	48
III.4	Discussion	53
III.5	Conclusion	57

III.1 Introduction

La capacité des animaux à osmoréguler détermine leur répartition dans les milieux aquatiques. Pour les pénéidés qui sont euryhalins, la tolérance aux variations du milieu est relativement grande. Ainsi, les juvéniles de *L. vannamei* sont capables de résister à une dessalure pouvant atteindre 2 ppt pendant 40 jours en conditions expérimentales (Laramore *et al.*, 2001). Dans le milieu naturel, *L. vannamei* est présente dans des milieux variant de 0,5 ppt à 50 ppt (Bray *et al.*, 1994; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Saoud *et al.*, 2003). La crevette bleue *L. stylirostris* est connue pour être moins tolérante aux faibles salinités par rapport à *L. vannamei*. Ces adaptations physiologiques aux variations environnementales sont conditionnées par l'existence de tissus osmorégulateurs et de transporteurs enzymatiques au niveau cellulaire. Chez les crustacés décapodes, les organes susceptibles d'intervenir dans les échanges ioniques dans la cavité branchiale sont les branchies, les épipodites et le branchiostégite. L'épithélium des tissus osmorégulateurs constitue la barrière d'échange entre le milieu extérieur et l'hémolymphe de l'animal par l'intermédiaire de cellules spécialisées, les ionocytes (Taylor et Taylor, 1992). La présence et la localisation des transporteurs protéiques actifs dans les ionocytes dépendent de la salinité du milieu environnant. Plusieurs ont été identifiés chez les animaux aquatiques et parmi eux, la NKA, le NKCC et le CFTR font partie des protéines de transports majoritaires (Hirose *et al.*, 2003). Peu d'études existent cependant chez les crevettes pénéidés. Les objectifs de ce chapitre consistent donc à déterminer chez de très jeunes crevettes âgées d'1 mois :

- 1) la capacité osmorégulatrice;
- 2) l'organisation du système branchial ;
- 3) l'implication des tissus de la cavité branchiale dans l'osmorégulation.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1 Acclimatation des animaux

Des juvéniles PL9 de *L. stylirostris* de poids moyen 0,046g (\pm 0,034g) et âgées de 32 jours (P32) sont transférés dans trois bacs de 300 litres contenant de l'eau de mer à 35 ppt et à 29°C pour une acclimatation 5 jours avant le début de l'expérimentation. Ces animaux sont issus d'un élevage larvaire classique mené à 29°C et 34-35ppt. De l'eau à différentes salinités (12 ppt, 24 ppt et 35 ppt) est préparée à l'avance à partir d'un mélange d'eau de mer et d'eau douce pour les besoins de l'expérimentation. La salinité de l'eau est vérifiée en utilisant un

thermomètre-salinomètre WTW cond 315i. L'eau est fortement aérée dans les bacs afin d'enlever le chlore résiduel de l'eau douce.

A J0, neuf aquariums de 30 litres équipés de thermoplongeur sont installés dans une salle avec un éclairage artificiel de 8h à 16h. Les aquariums sont remplis avec de l'eau aux 3 salinités en triplicats. Quatre-vingt animaux sont stockés dans chaque aquarium. La température est maintenue entre 29 et 29,5°C et les animaux sont nourris *ad libitum*. Un renouvellement d'eau séquentiel de 50% est effectué tous les jours. La durée de l'expérimentation est de 9 jours. La température et la salinité sont vérifiées quotidiennement.

III.2.2 Prélèvements

Différents prélèvements sont réalisés au cours de l'expérimentation pour les analyses suivantes :

- détermination de la capacité osmorégulatrice ; pour chaque réplicat, l'hémolymphe est prélevé sur 2 (J1, J5) à 6 (J9) animaux en intermue et les mesures de la pression osmotique (ou osmolalité) de l'hémolymphe sont effectuées avec un nano-osmomètre OTAGO®. L'osmolalité de l'eau de chaque traitement est mesurée quotidiennement.

- analyses histologiques et immunologiques, 2 animaux par réplicat à 12 et 35 ppt sont prélevés à J9 et fixés dans le liquide de Bouin pendant 24 heures et conservés dans de l'éthanol 70°.

- microscopie électronique, 2 animaux par réplicat à 12 et 35 ppt sont prélevés à J9 et fixés dans une solution isotonique de glutaraldehyde à 2,5% pendant 24 heures puis conservés dans une solution isotonique de glutaraldehyde à 1% jusqu'au traitement des échantillons ;

- le poids final est mesuré à J9 sur 10 individus par réplicat.

III.2.3 Histologie

Les échantillons de cavités branchiales fixés dans du liquide de Bouin et conservés dans l'éthanol à 70°, sont déshydratés de la façon suivante :

- 3 bains de 30 minutes à l'éthanol 90°
- 3 bains de 15 minutes à l'éthanol 100°
- 2 bains d'1 heure d'alcool butylique

Avant inclusion, l'échantillon est plongé dans 4 bains successifs de Paraplast® (Sigma-Aldrich, USA) pendant 30 minutes. Pour la mise en bloc, des barres de Leuckart sont positionnés pour y couler du Paraplast® dans lequel les pièces sont orientées et une étiquette permet leur identification.

Cinq coupes successives de 4 microns sont réalisées au microtome et collées sur lame à l'aide d'un mélange albumine-glycérinée. Deux à trois lignes de coupes sont déposées sur chaque lame. Cette dernière est ensuite posée sur une platine chauffante facilitant la dilatation des coupes et l'excédent de liquide évacué. Les lames sont mises à sécher à l'étuve à 37°C au minimum 48 heures avant la coloration topographique.

Après déparaffinage, les coupes sont transférées dans des solutions successives d'éthanol de gradient croissant. A l'issue de cette réhydratation, les bains de coloration sont effectués dans l'ordre suivant :

- Hématoxyline de Groat;
- Fuchsine ponceau ;
- Orangé G molybdique ;
- Bleu aniline .

Le montage est effectué avec une résine de synthèse. L'observation au microscope photonique permet de différencier les différentes structures cellulaires : les noyaux sont noirs, les cytoplasmes acidophiles et les nucléoles en rose, les muscles sont rouges et les fibres collagènes sont bleues.

III.2.4 Microscopie électronique

Les échantillons conservés dans une solution d'eau de mer diluée à 1% de glutaraldéhyde isotonique à la pression osmotique de l'hémolymphe sont ensuite rincés avec un tampon cocadylate de sodium 0,1 M de pH 7,2 pendant 2 heures puis post-fixés dans une solution tampon contenant 1% d'acide osmique OsO₄ pendant 2-3 heures à 4°C. Des rinçages successifs dans de l'eau distillée sont effectués pour éliminer le maximum d'acide osmique de l'échantillon puis ce dernier subit une déshydratation dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante de 30 à 100° et d'oxyde de propylène avant d'être inclus dans de la résine de Spurr. Les coupes semi-fines et ultra-fines sont effectuées à l'aide d'un ultra-microtome Reichert OMU3. Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine alors que les coupes ultra-fines sont contrastées avec un mélange d'éthanol 70° et de citrate de plomb contenant 2% d'acétate uranyle. Les observations sont réalisées sur un microscope électronique à transmission JEOL 1200 EX2 à 70kV.

III.2.5 Immunohistochimie

Les coupes sont réalisées telles que décrit précédemment (cf. §II.2.3) mais sont ensuite récupérées sur lames Poly-L lysine avec une goutte d'eau distillée. Après déparaffinage, les

coupes sont réhydratées dans un bain de butanol et quatre bains d'éthanol successifs de concentrations décroissantes (de 100° à 50°) de 5 minutes chacun. Elles sont ensuite rincées dans une solution tampon phosphate saline (PBS, 10 mM, pH 7,3) pendant 5 minutes. Les lames sont préalablement immergées dans une solution de citrate de sodium avant d'être chauffées aux micro-ondes 2 fois pendant 1 minute à 80% de la puissance maximale afin de révéler les sites antigéniques (Bradford, 1976). Après refroidissement, les coupes sont plongées dans la solution PBS additionnée de 150 mM de NaCl et 1% de Tween 20 pendant 10 minutes, ce qui favorise leur perméabilité. La saturation et le blocage des sites non spécifiques de l'anticorps sont réalisés à l'aide d'une solution PBS contenant 5% de poudre de lait (PBS-R5%) à température ambiante pendant 20 minutes. Trois rinçages de 2 minutes sont ensuite effectués dans le PBS.

Les anticorps primaires (AC I) sont dilués dans du PBS-R 0,5% et utilisés aux concentrations indiquées dans le tableau III.1. Les anticorps utilisés sont dirigés contre les sites antigéniques suivants :

- La sous-unité $\alpha 1$ de la NKA humaine (NKA α - H300sc-28800). L'anticorps polyclonal de lapin est produit par Santa Cruz Biotechnology, Inc – USA;

- L'extrémité carboxyterminale du cotransporteur NKCC1 humain (C14 - sc-21547). Cet AC I est obtenu chez la chèvre (Santa Cruz Biotechnology, Inc - USA) ;

- L'extrémité carboxyterminale du canal CFTR humain, correspondant à la séquence la plus conserve de la protéine. Cet anticorps monoclonal de souris est produit par R&D Systems (USA).

Cent microlitres de la solution d'anticorps, ou de PBS-R 0,5% sans anticorps pour les lames témoins, sont déposés sur chaque lame avant incubation pendant 13 heures à une température de 4°C sur une table d'agitation. Les lames sont ensuite rincées dans 3 bains de PBS de 5 minutes afin d'enlever les anticorps qui ne se seraient pas fixés. Les anticorps secondaires (AC II, dirigés contre les AC I) suivants sont mélangés dans une solution de PBS-R 0,5% aux concentrations indiquées dans le tableau III.1:

- Rhodamine rouge lointain de Invitrogen™ ;
- Alexa Fluor® 633 de Invitrogen™ ;
- FluoProbes® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) de Interchim Innovations™.

Cent microlitres de solution d'AC II sont déposés sur chaque lame; l'incubation dure 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. Les lames sont rincées dans 3 bains de PBS de 5 minutes chacun ; à l'issue de cette deuxième incubation, le collage de la lamelle est réalisé à

l'aide d'un liquide de montage spécial. Les observations et les images sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal TCS SPE DM2500 (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) et d'un logiciel Carl Zeiss Axio Vision 4. Une longueur d'onde a été associée à chaque fluorochrome.

Tableau III.1 : Paramètres de marquage. Concentration des différents anticorps primaires et secondaires utilisés lors du triple marquage, longueurs d'onde de détection et couleurs associées pour la colocalisation des transporteurs de l'osmorégulation.

Anticorps primaire (µg/ml)	Anticorps secondaire (µg/ml)	Longueur d'onde de détection (nm)	Couleur
NKA α (H300) lapin anti-humain	Rhodamine âne anti-lapin	561-669	Rouge
NKCC 1 (C-14) chèvre anti-humain	Alexa 633 âne anti-chèvre	644-746	Bleu
CFTR C-Terminus souris anti-humain	FluoProbe 488 âne anti-souris	502-553	Vert

III.2.6 Analyses statistiques

Les résultats sont analysés statistiquement par l'analyse de la variance à une voie (ANOVA) après vérification de l'homogénéité des variances. Les résultats en pourcentage subissent une transformation $\arcsin(\sqrt{\cdot})$ au préalable. Lorsque des différences significatives ($p < 0.05$) sont observées, un test de classement des moyennes *a posteriori* (test PLSD de Fisher) est effectué. Dans le cas d'une hétérogénéité des variances, les données sont analysées par un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis, au seuil de significativité de 5 %). Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview.

III.3 Résultats

III.3.1 Paramètres physico-chimiques et biologiques

La température est restée stable et autour de 29°C pendant la durée de l'expérimentation. Le poids moyen des animaux est significativement plus élevé, après 9 jours de stabulation à 12 ppt, que celui des animaux élevés à 24 ou 35 ppt (Tableau III.2). Les survies sont dans l'ensemble bonnes, car supérieures à 70%, la survie la plus élevée étant obtenue pour les animaux maintenus à 24 ppt (85,8 %).

Tableau III.2 : Paramètres physico-chimiques et biologiques (moyenne \pm écart-type) en fonction de la salinité d'acclimatation pendant 9 jours chez *L. stylirostris*. Une astérisque indique une différence significative entre les traitements au seuil $\alpha = 0,5$.

Traitement	12 ppt	24 ppt	35 ppt
Nombre de réplicats	3	3	3
Poids final (g)	0,101 \pm 0,066 *	0,066 \pm 0,046	0,061 \pm 0,044
Survie (%)	76,3 \pm 1,3	85,8 \pm 2,5	73,3 \pm 8,3

III.3.2 Capacité-osmoréglatrice

La capacité osmoréglatrice (CO) des jeunes juvéniles de *L. stylirostris* varie en fonction de la salinité et du temps (Fig. III.1). Les animaux hyper-régulent à la salinité de 12 ppt : leur CO qui est stable dans les 5 premiers jours autour de 217 mOsm.kg⁻¹, augmente ensuite significativement pour atteindre à 310 mOsm.kg⁻¹ à J9. A 24 ppt, les juvéniles hypo-régulent légèrement, CO comprise entre -75 et -103 mOsm/kg, sans variation significative sur la durée de l'expérimentation. Enfin à la salinité de 35 ppt, les animaux hypo-régulent fortement et maintiennent dans les 5 premiers jours leur CO autour de -300 mOsm/kg. Au 9^{ème} jour, l'écart d'osmolalité entre leur hémolymphe et le milieu extérieur est significativement augmenté (CO = -439 mOsm/kg).

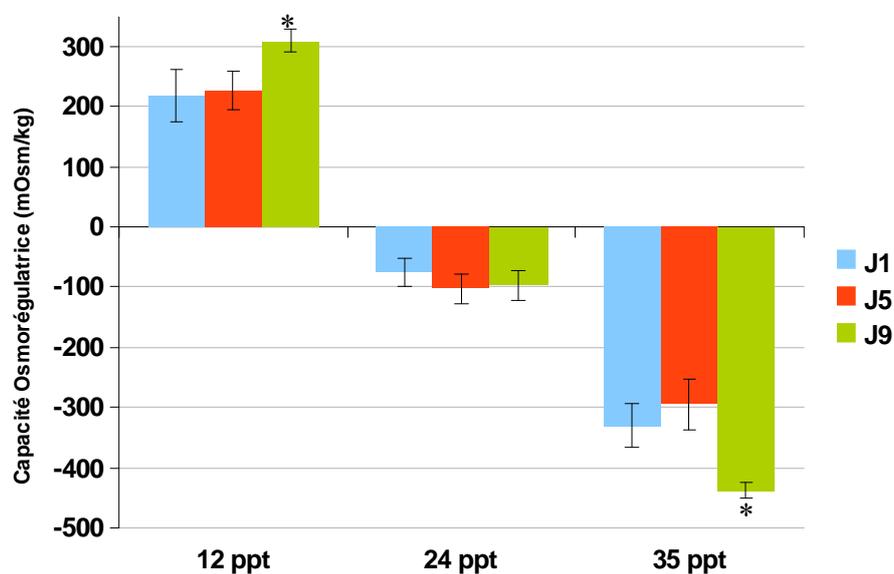


Figure III.1 : Capacité osmoréglatrice en fonction de la salinité et du temps d'acclimatation. Les astérisques indiquent une différence significative au seuil $\alpha = 0,05$.

III.3.3 Dénombrement et localisation topographique des organes osmorégulateurs

Chez *L. stylirostris*, il y a 18 paires de branchies et 5 paires d'épipodites protégées par la cavité branchiale, cette dernière étant délimitée par le branchiostégite du côté externe. Les podobranchies sont absentes chez *L. stylirostris*. Le tableau III.3 indique la répartition des différents types de branchies en fonction de l'appendice considéré. Les maxillipèdes 1 n'ont ni branchies, ni épipodites et les périopodes 5 ne portent qu'un seul type de branchies.

Tableau III.3 : Nombre de paires des différentes branchies et d'épipodites en fonction de l'appendice.

	Maxillipèdes			Périopodes					Total
	<u>M1</u>	<u>M2</u>	<u>M3</u>	<u>P1</u>	<u>P2</u>	<u>P3</u>	<u>P4</u>	<u>P5</u>	
Pleurobranchie	0	1	1	1	1	1	1	1	7
Arthrobranchie	0	2	2	2	2	2	1	0	11
Podobranchie	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paires de branchies									18
Epipodite	0	1	1	1	1	1	0	0	5

L'emplacement dans la cavité branchiale des principaux organes impliqués dans l'osmorégulation est indiqué sur les coupes transversales du céphalothorax de *L. stylirostris* (Fig. III.2). Le branchiostégite est présent sous la forme d'un épithélium accolé à la paroi interne de la cuticule de la cavité branchiale. Les épipodites sont observés sur la coupe avant du céphalothorax et s'intercalent entre les branchies. Dans la partie arrière du céphalothorax, la structure branchiale avec l'axe principal et les ramifications sont nettement visibles. A noter l'importance relative de l'hépatopancréas dans la zone arrière du céphalothorax.

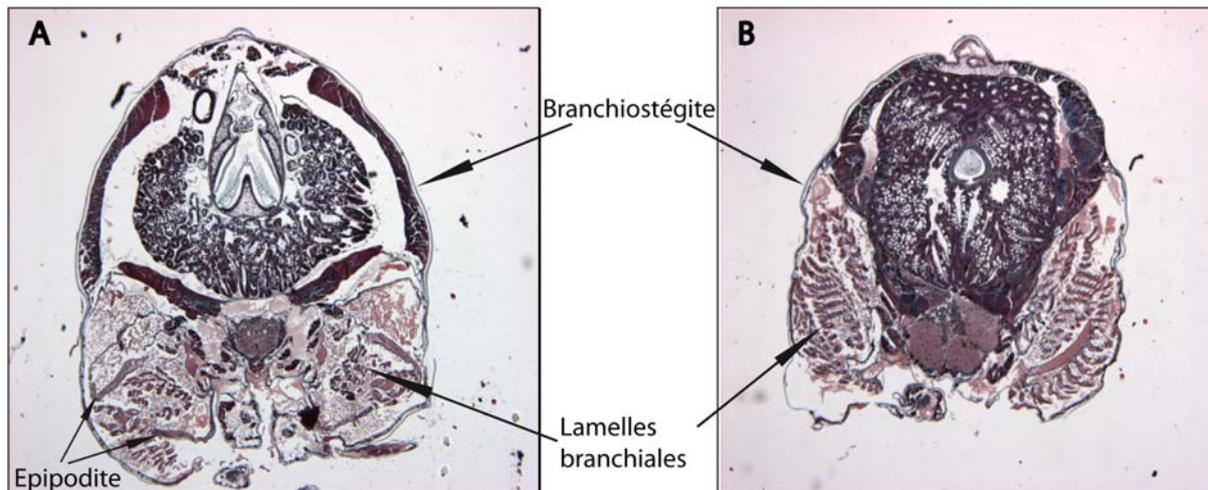


Figure III.2 : Localisation des organes de la cavité branchiale sur coloration topographique de coupes transversales avant (A) et arrière (B) du céphalothorax chez un juvénile de *L. stylirostris*.

III.3.4 Ultrastructure des tissus osmorégulateurs

Les coupes des tissus osmorégulateurs en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission montrent que les branchies sont constituées de nombreux espaces hémolympatiques bordés par une couche épithéliale simple de l'ordre de 15 nanomètres et protégées par une fine cuticule (Fig. III.3A et III.3B). Dans la partie distale des lamelles, la lacune hémolympatique occupe une place importante entre les 2 couches épithéliales. Au niveau de la zone inter-lamellaire et sur le premier tiers des lamelles branchiales, l'épithélium s'épaissit et se complexifie pour atteindre parfois 400 nanomètres. L'observation plus fine de cette partie proximale des lamelles et de la zone inter-lamellaire permet de constater que la couche épithéliale épaisse est constituée d'un tissu connectif composé de cellules septales avec des expansions latérales très fines en contact avec l'espace circulatoire de l'hémolymphe ainsi que des mitochondries et des inter-digitations cellulaires (Fig. III.3C et III.3D). Un premier type de cellule (type I) occupent régulièrement l'espace hémolympatique dans la partie proximale des lamelles et assurent le contact entre les 2 épithéliums qui se font face. Les cellules des noyaux occupent une grande partie du cytoplasme et les inter-digitations sont proches des structures mitochondriales (Fig. III.3E). Un autre type cellulaire (type II), moins nombreux, est présent uniquement dans l'axe branchial à la base des lamelles (Fig. III.3A et III.3B). Localisées dans des zones bien spécifiques du rachis et des lamelles - entre les cellules de type I et l'espace hémolympatique - ces cellules de type II sont disposées côte à côte et possèdent un cytoplasme peu dense et un noyau qui occupe la quasi-totalité du volume de la cellule (Fig. III.3F).

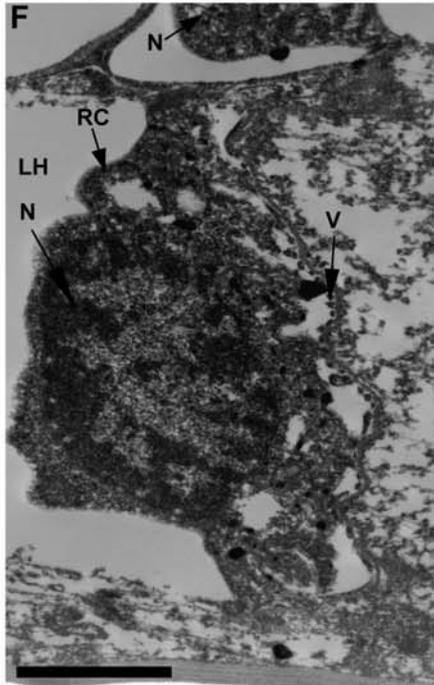
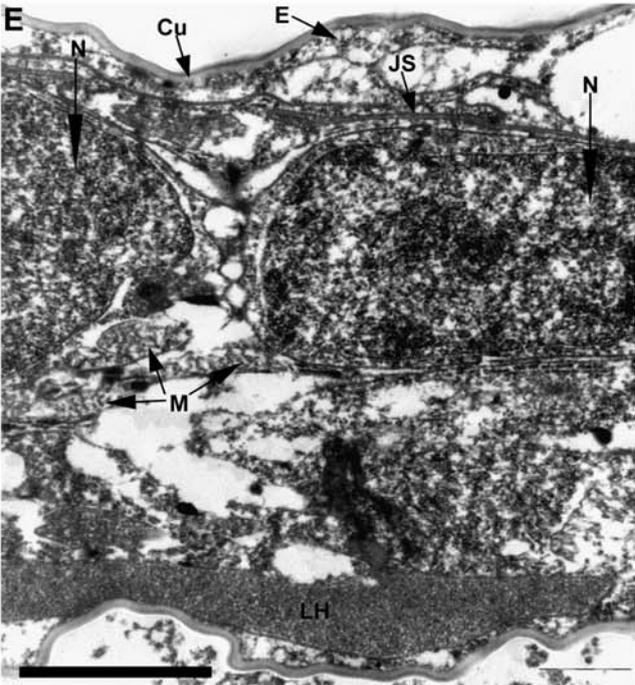
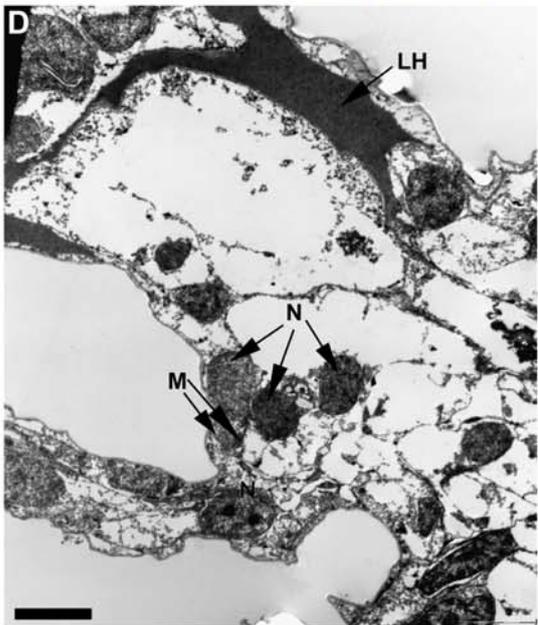
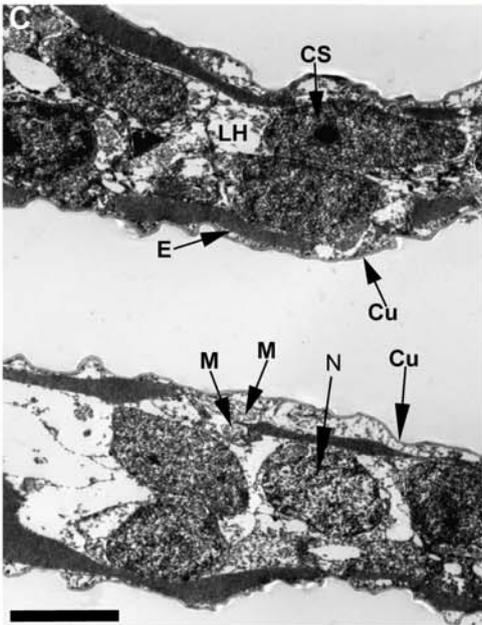
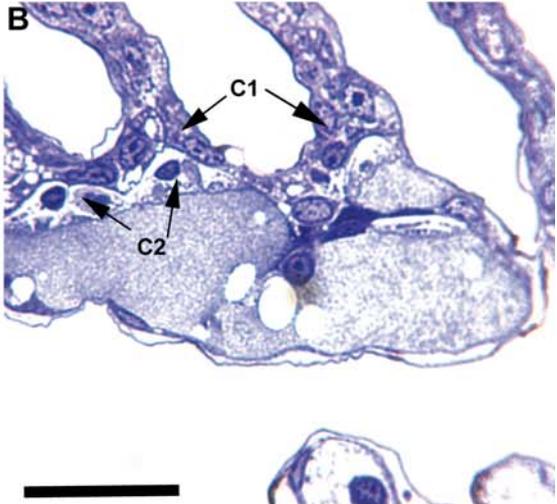
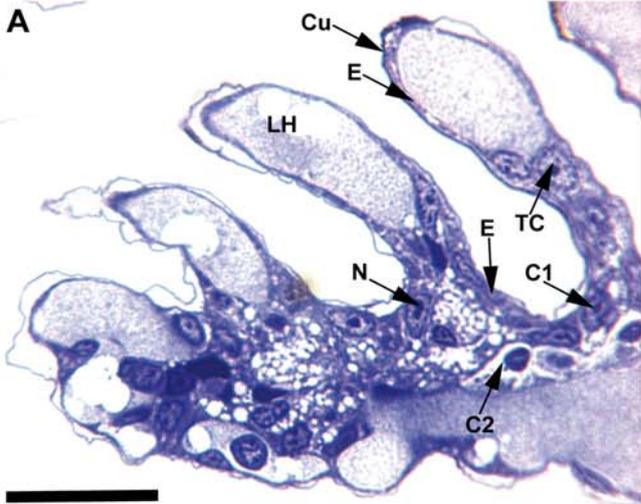


Figure III.3 : *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt **A**, Coupe semi-fine longitudinale des lamelles branchiales avec un épithélium fin et de larges lacunes hémolymphatiques. A la base des lamelles, présence des 2 types de cellules. Echelle : 20 μm ; **B**, Coupe semi-fine longitudinale de l'axe branchial. Les cellules de type II sont au contact avec les cellules de type I d'un côté et bordent l'espace hémolymphatique de l'autre. Echelle : 20 μm ; **C**, Coupe ultra-fine de lamelles branchiales. La densité cellulaire est variable sur la longueur des lamelles branchiales. Echelle : 5 μm ; **D**, Coupe ultra-fine de l'axe branchial ; des expansions cellulaires traversent les lacunes d'hémolymphe et les cellules contiennent peu de mitochondries. Echelle : 5 μm ; Ultrastructure d'une cellule branchiale de type I (**E**) avec des inter-digitations, et de type II (**F**) avec un noyau occupant une grande partie de la cellule. Echelles : 2 μm .

Cu: Cuticule; CS: Cellule Septale; C1 : cellule de type I ; C2 : cellule de type II ; E: Epithélium; IB: Invagination Basale; JS : Jonction septale ; LB: lame basale; LH: lacune hémolymphatique; M: Mitochondrie; MA: Microvillosité Apicale ; N : Noyau ; RC : Ramification cytoplasmique ; V : Vésicule.

Des ramifications cytoplasmiques sont observées entre les cellules adjacentes, permettant le contact inter-cellulaire. D'autre part, d'étroites lacunes hémolymphatiques dans lesquelles est parfois observé un chapelet de vésicules, s'insinuent entre les deux types de cellules. En hyper ou hyporégulation, aucune différence micro-anatomique notable n'est observée au niveau des branchies.

Les épipodites sont constitués d'une couche épithéliale simple couverte d'une fine cuticule du côté apical et délimitée par la lame basale du côté de l'espace hémolymphatique; cet épithélium parcourt de manière régulière et symétrique chaque bord de la lame biramée (Fig. III.4A). L'espace hémolymphatique est parfois entrecoupé par la jonction des cellules épithéliales formant ainsi des lacunes. A la base de l'épipodite, les cellules viennent au contact d'un important espace hémolymphatique et des cellules de type II analogues à celles dans les branchies sont observées (Fig. III.4B). Le tissu épithélial apparaît plus dense et plus structuré avec des lacunes plus abondantes chez les animaux élevés à 35 ppt que chez ceux élevés à 12 ppt (Fig. III.4C et III.4D). En eau dessalée, et du fait de la rétractation des lacunes, les invaginations basolatérales s'étendent plus profondément dans le cytoplasme. Les cellules épithéliales aux deux salinités présentent les caractéristiques des ionocytes ; le cytoplasme comporte un réseau dense d'invaginations basales en contact étroit avec de nombreuses mitochondries et des microvillosités émergent de la partie apicale des cellules.

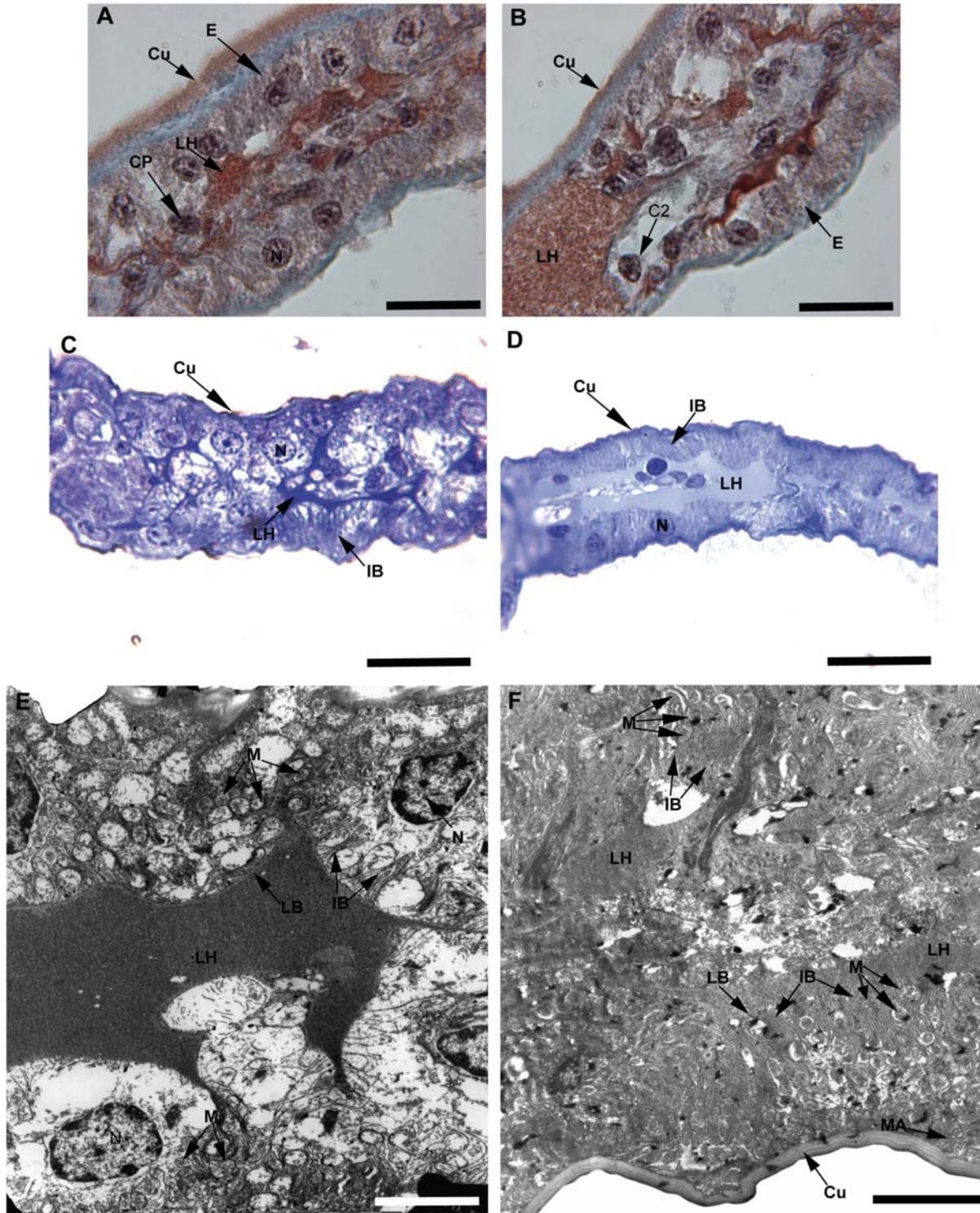


Figure III.4 : Coupes transversales de l'épipodite de *L. stylirostris* acclimatée à 35 ppt : partie distale (A) avec un épithélium épais de part et d'autre du mince espace hémolympatique. Partie proximale (B) avec une cellule de type II au contact d'une lacune hémolympatique. Echelle : 20 μ m ; Coupes semi-fines de l'épipodite de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (C) et 35 ppt (D) avec une structure plus dense en eau de mer. Echelle : 20 μ m ; Coupes ultra-fines de l'épipodite de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (E) et 35 ppt (F) avec la présence de ionocytes. Echelle : 5 μ m.
 Cu: Cuticule; C2: cellule de type 2; E: Epithélium; IB: Invagination Basale; LB: Lamelle basale; LH: Lacune hémolympatique; M: Mitochondrie; MA: Microvillosité apicale; N : Noyau. .

Le branchiostégite a une épaisseur variable en fonction de la salinité. La distance entre la cuticule interne et la cuticule externe du branchiostégite des animaux élevés à 12 ppt est de l'ordre de 20 μm alors que celle des animaux élevés à 35 ppt est de l'ordre de 14 μm (Fig. III.5A et III.5B). Les espaces lacunaires apparaissent plus grands chez les animaux en milieu hypotonique et de larges espaces sous-cuticulaires délimités par les microvillosités sont nettement visibles sur les coupes semi-fines. Aux deux salinités, la structure du branchiostégite est asymétrique avec un épithélium simple du côté externe recouvert d'une cuticule épaisse alors que du côté interne, l'épithélium simple est plus épais mais recouvert d'une fine cuticule (Fig. III.5D). Cependant, cette structure n'est pas régulière sur tout le branchiostégite, tant sur la hauteur que sur la longueur. Certaines portions du branchiostégite ont un épithélium très fin sur les deux bords. L'espace de circulation de l'hémolymphe est régulièrement interrompu par des cellules piliers qui font la jonction entre les 2 couches épithéliales et où des microvillosités apicales sont visibles mais avec très peu de mitochondries (Fig. III.5C). Des ionocytes sont présents dans les parties épithéliales les plus épaisses, parcouru par un réseau dense d'invaginations basales qui pénètrent profondément l'épithélium accompagnés de nombreuses mitochondries allongées et orientées perpendiculairement à la cuticule à 35 ppt (Fig. III.5E). A 12 ppt, l'orientation des mitochondries n'est pas aussi nette et les espaces sous-cuticulaires entre les microvillosités apicales sont beaucoup plus grands (Fig. III.5F).

III.3.5 Immunolocalisation de la NKA, du CFTR et du NKCC1

Des coupes témoins ne recevant que les anticorps secondaires montrent une auto-fluorescence de la cuticule externe du branchiostégite. Sur les coupes en avant de la cavité branchiale, la NKA est localisée basolatéralement aux deux salinités le long des bords de l'épipodite (Fig. III.6A et III.6B). Elle disparaît dans sa partie distale. Dans le branchiostégite, la NKA est détectée de manière irrégulière avec un marquage plus prononcé dans l'épithélium interne à 12 ppt. Elle est très peu visible dans le branchiostégite à 35 ppt. Dans les branchies situées en avant de la cavité branchiale, ce sont les axes branchiaux qui sont essentiellement immunoréactifs et le marquage est plus évident en eau dessalée qu'en eau de mer.

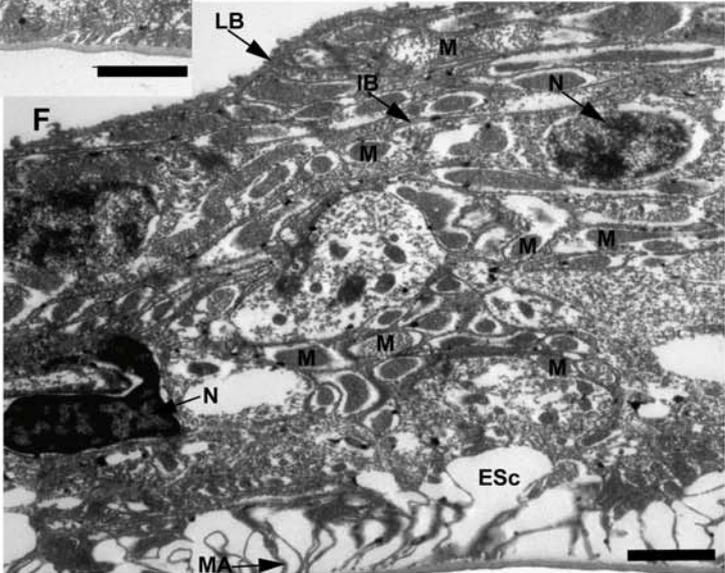
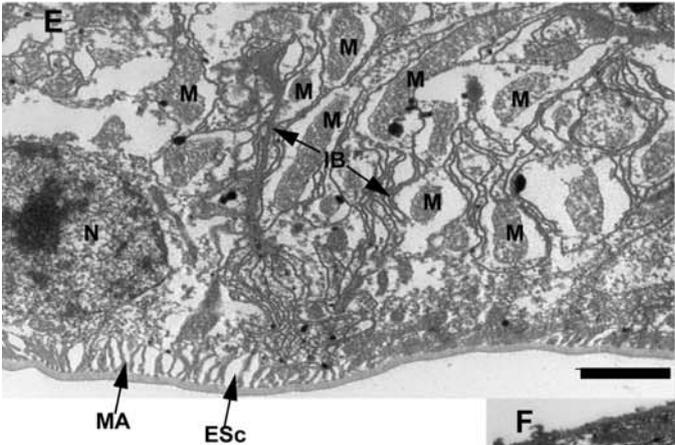
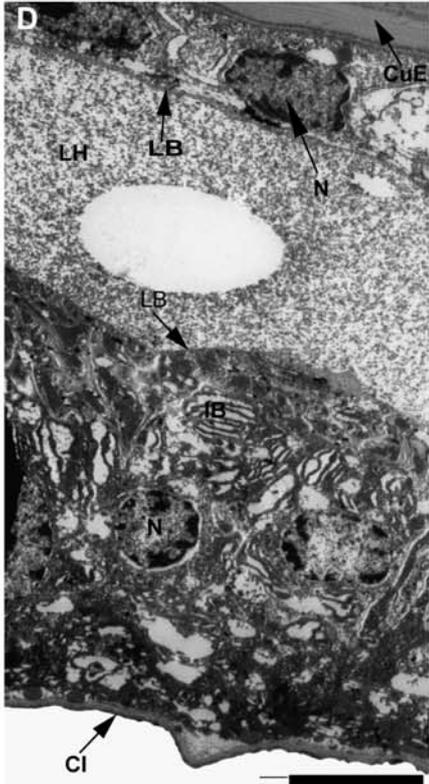
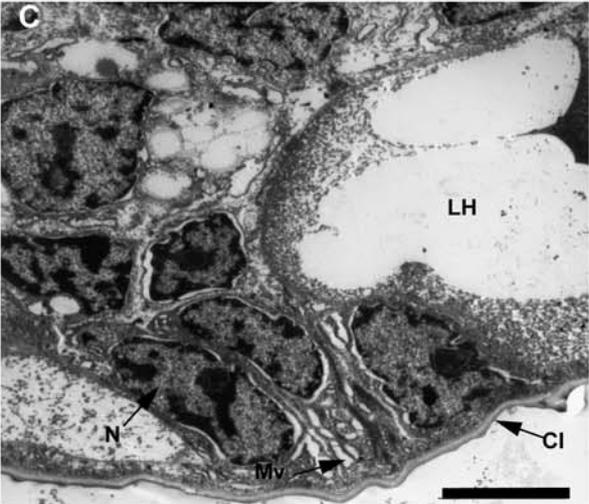
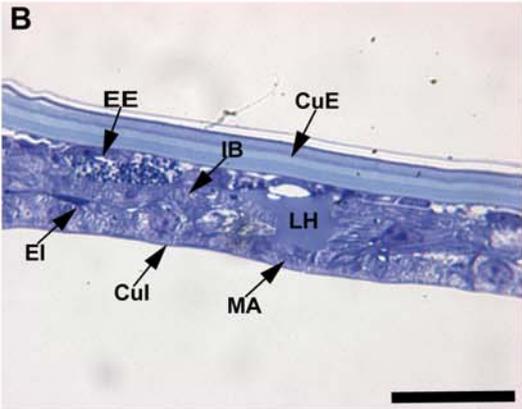
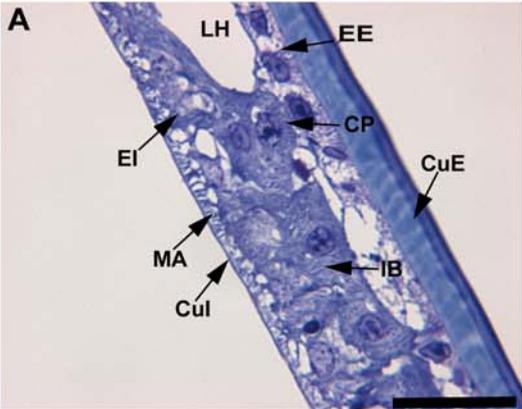


Figure III.5 : Coupes semi-fines transversales du branchiostégite de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (**A**) et à 35 ppt (**B**), avec des microvillosités apicales aux deux salinités. Echelle : 20 µm. Coupes ultra-fines du branchiostégite au niveau de la jonction des 2 épithéliums par des cellules piliers (**C**), et avec les 2 épithéliums (**D**) séparés par une lacune hémolymphatique. Les ionocytes composent l'épithélium interne. Echelle : 5 µm ; Coupes ultra-fines de l'épithélium interne du branchiostégite de *L. stylirostris* acclimatée à 35 ppt (**E**) et à 12 ppt (**F**) montrant des espaces sous cuticulaires plus grands en milieu hypotonique. Echelle : 2 µm.

CuE: Cuticule Externe; CuI: Cuticule interne; CP: Cellule Pilier; EE: Epithélium externe; EI: Epithélium interne; ESC: Espace Sous-cuticulaire; IB: Invagination Basale; LH: lacune hémolymphatique; M: Mitochondrie; MA: Microvillosité Apicale ; N : Noyau.

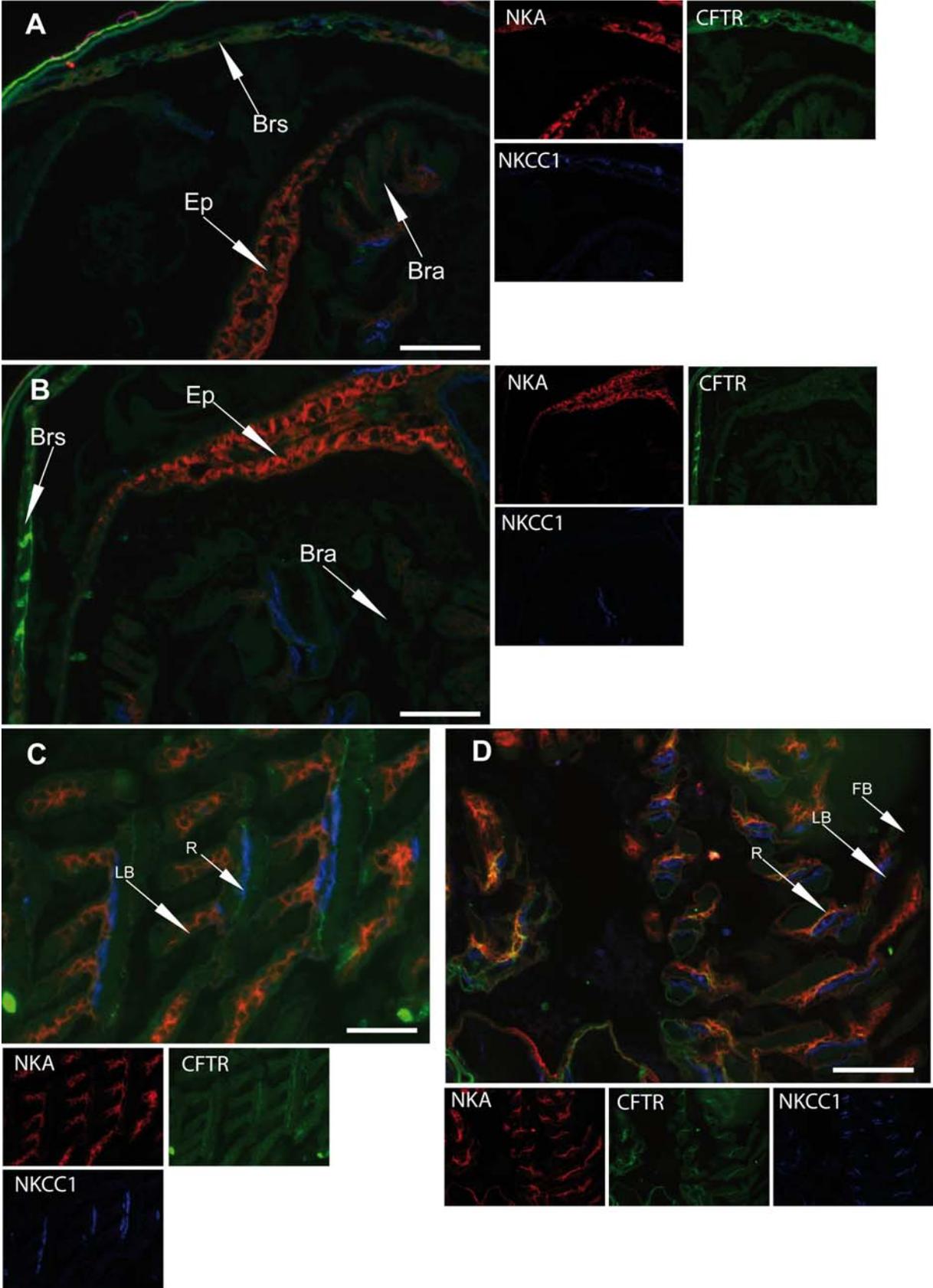
L'immunoréactivité du CFTR est peu prononcée dans l'ensemble des tissus à 12 ppt (Fig. III.6A); absent dans les filaments branchiaux, un léger marquage est constaté dans le branchiostégite et les épipodites. Dans ce dernier tissu, il apparaît plus nettement en position apicale à 35 ppt, ainsi que dans les cellules piliers du branchiostégite (Fig. III.6B).

Le NKCC1 est essentiellement détecté dans les branchies et dans les épipodites aux deux salinités (Fig. III.6A et III.6B). Dans les branchies, il est localisé uniquement dans l'axe branchial dans des zones cellulaires limitées d'un côté par les cellules sensibles à la NKA et de l'autre côté, par l'espace hémolymphatique. Au niveau de l'épipodite, le NKCC1 est visible dans une zone limitée à la partie la plus large de la lame biramée et dans une configuration cellulaire identique à celle des branchies, c'est-à-dire dans une couche cellulaire bordée d'un côté par les cellules à NKA et de l'autre par le canal hémolymphatique. Une très légère immunofluorescence mais non significative par rapport aux autres tissus apparaît sur l'épithélium externe du branchiostégite à 12 ppt.

Si nous observons maintenant les coupes situées en arrière de la cavité branchiale où les branchies sont bien développées et les épipodites sont absents, la NKA est localisée basolatéralement en périphérie du rachis dans les zones inter-lamellaires mais occupe des zones plus grandes dans toutes les lamelles branchiales aux deux salinités (Fig. III.6C et III.6D).

A 35 ppt, le NKCC1 apparaît bien nettement dans des cellules spécifiques de l'axe branchial et des lamelles, toujours dans une position caractéristique, limité d'un côté par les cellules à NKA et de l'autre par les lacunes d'hémolymphe. A 12 ppt, le NKCC1 semble se limiter au rachis et il est peu visible dans les lamelles.

Le CFTR est localisé en eau de mer dans les mêmes cellules que la NKA et sa position semble apicale (Fig. III.6D). Par contre en eau de mer diluée deux fois, il apparaît plus faiblement et localisé à proximité du marquage du NKCC1 (Fig. III.6C).



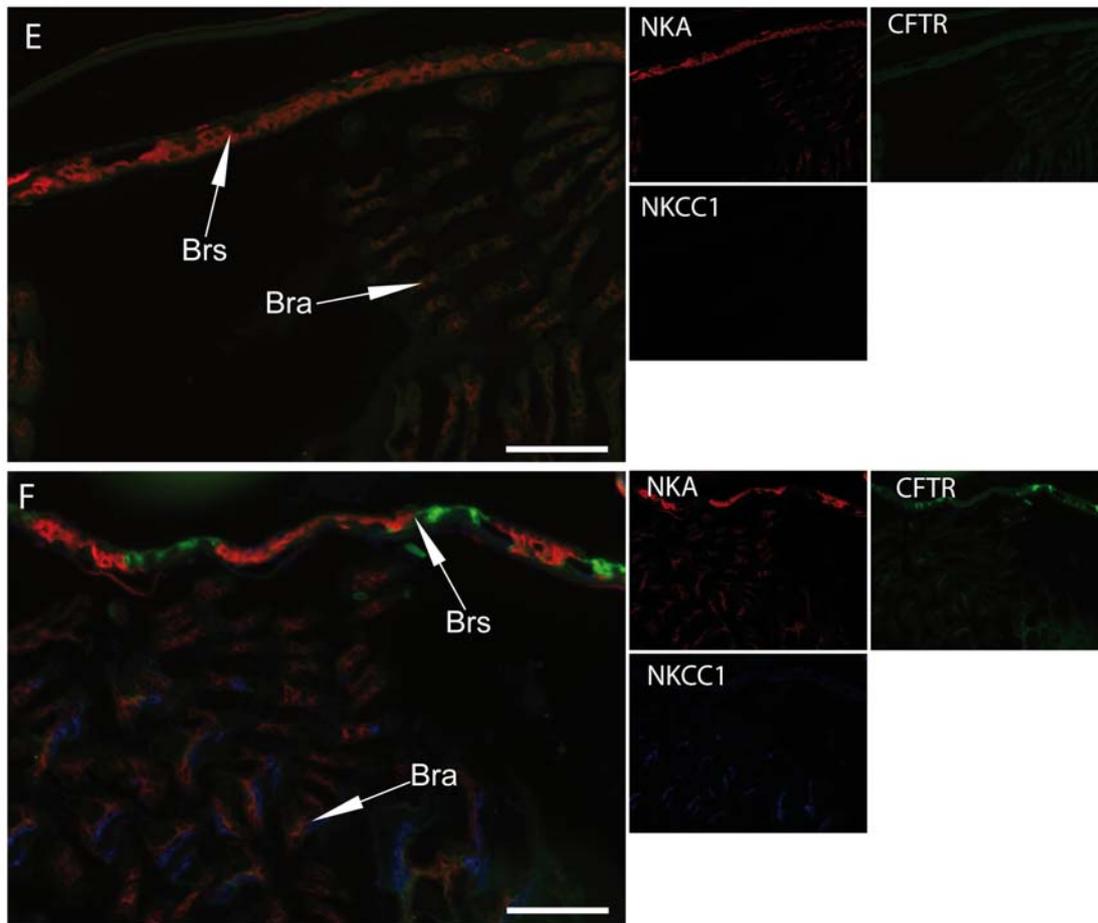


Figure III.6 : Co-localisation du CFTR (vert), de la NKA (rouge) et du NKCC1 (bleu) de coupes transversales de la cavité branchiale de *L. stylirostris* acclimatée à différentes salinités. Echelle : 50 μ m. Parties en avant de la cavité branchiale de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (**A**) et à 35 ppt (**B**). Parties arrières de la cavité branchiale de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (**C**) et à 35 ppt (**D**). Branchiostégite en arrière de la cavité branchiale de *L. stylirostris* acclimatée à 12 ppt (**E**) et à 35 ppt (**F**). La NKA prédomine dans l'ensemble des tissus aux deux salinités testées. Elle est présente dans les ionocytes des épipodites et du branchiostégite. Le NKCC1 et le CFTR sont localisés variablement en fonction de la salinité ; le NKCC1 plus particulièrement dans les axes branchiaux aux deux salinités et le CFTR dans les branchies et le branchiostégite à 35 ppt.

Bra: Branchie; Brs: Branchiostégite ; Ep: Epipodite ; FB : Filament Branchial ; LB : Lamelle Branchiale ; R : Rachis.

La triple localisation dans le branchiostégite en arrière de la cavité branchiale montre qu'à 12 ppt, seule la NKA est détectée en position basolatérale dans l'épithélium interne (Fig III.6E). A 35 ppt, l'immunofluorescence du CFTR n'est observée que dans des zones limitées et intercalées entre des sections plus grandes où se manifeste NKA (Fig. III.6F).

Le tableau III.4 synthétise nos observations sur l'immuno-localisation des trois protéines transmembranaires en fonction du tissu et de la salinité. En résumé, la NKA est détectée dans les 3 tissus aux deux salinités testées, la présence du CFTR est plus marquée à 35 ppt et

le NKCC1 est détecté dans des cellules différentes de celles du NKA uniquement dans les branchies et les épipodites.

Tableau III.4 : Présence (O) ou absence (N) des différents transporteurs protéiques dans les tissus osmorégulateurs en fonction de la salinité.

	12 ppt			35 ppt		
	Branchie	Epipodite	Branchiostégite	Branchie	Epipodite	Branchiostégite
NKA	O	O	O	O	O	O
CFTR	O	O	N	O	O	O
NKCC1	O	O	N	O	O	N

III.4 Discussion

Chez les pénéides, le nombre de paires de branchies est compris entre 12 et 18 et leur localisation varie d'une espèce à l'autre. La formule branchiale de *L. stylirostris* se résumant à 18 paires de branchies et 5 paires d'épipodites diffère de celle de *P. japonicus* par une paire en moins d'épipodites (Bouaricha *et al.*, 1994). Par ailleurs, *L. stylirostris* ne possède pas de podobranchie tel que décrit par Martin *et al.* (2007) sur *Farfantepenaeus californiensis*. Cette étude confirme le caractère hyper-hypo-osmorégulateur de *L. stylirostris* qui maintient son osmolalité entre 600 et 800 osm.kg⁻¹ suite à un transfert dans une eau de mer diluée à 12 et 24 ppt. Cette capacité d'adaptation est confirmée par des mortalités somme toute modérée (15 à 26%) lorsqu'un changement abrupt de salinités est réalisé dans des conditions clémentes de température (ici 29°C). Dans cette expérimentation, le point isoosmotique chez des jeunes juvéniles de *L. stylirostris* est évalué à 24 ppt. Cette valeur est légèrement inférieure au point isoosmotique déterminé chez des juvéniles (10g) et reproducteurs (40,4 g) de la même espèce autour de 26 ppt (Lemaire *et al.*, 2002; Wabete *et al.*, 2006). Ces différences de résultats ont également été observées sur d'autres pénéidés pour lesquelles la salinité d'équilibre dépend de la température (Chen et Lin, 1994 ; Chen et Lin, 1998 ; Buckle *et al.*, 2006) , de l'espèce (Chen et Lin, 1994 ; Buckle *et al.*, 2006) ou encore de l'âge (Lignot *et al.*, 1999b). Dans toutes les études concernant *L. stylirostris*, la détermination du point isoosmotique dans une fourchette de valeurs entre 24 et 28 ppt suggère que les élevages calédoniens pratiqués habituellement en eau de mer à 35 ppt maintiennent les animaux dans un état d'hypo-régulation constante. Cette contrainte environnementale impose aux animaux un effort permanent de régulation ionique et donc de dépense énergétique nécessaire à ce processus physiologique. Toutefois, nous avons observé au cours des 9 jours d'expérimentation que le

gain de poids des animaux en hyper-régulation à 12 ppt était deux fois plus élevé que celui des animaux maintenus à 24 et 35 ppt. Cette observation est assez surprenante et il conviendra dans des expérimentations futures de déterminer si des variations de la composition biochimique des animaux peuvent expliquer ce résultat.

Chez les crustacés décapodes, la régulation ionique est assurée en grande partie par différents tissus de la cavité branchiale possédant un épithélium riche en ionocytes. Ces cellules n'ont pas été observées dans les branchies de *L. stylirostris* mais d'autres types cellulaires sont présents que nous pouvons qualifier de ionocytes atypiques. Chez d'autres crevettes, comme *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994) ou *Sinelobus stanfordi* (Kikuchi et Matsumasa, 1993), des tissus branchiaux avec des ionocytes atypiques sans réseau d'invaginations basolatérales sont également observés. Cependant, nos données d'immunolocalisation indiquent que l'absence d'ionocytes classiques chez *L. stylirostris* n'empêche pas le tissu branchial d'avoir un rôle dans l'osmorégulation : la NKA, enzyme-clé dans les échanges ioniques, a été retrouvée dans les épipodites et le branchiostégite, mais également dans les branchies. Martinez *et al.* (2005) constatent également que les cellules branchiales chez *Palemon adspersus* sont immunoréactives malgré une ultrastructure peu développée et concluent également à la présence de ionocytes atypiques. La pluralité cellulaire des branchies chez *L. stylirostris* plaide en faveur d'une multifonctionnalité de ce tissu; les filaments branchiaux où l'épithélium est fin, pourraient être impliqués uniquement dans la respiration alors que les lamelles et l'axe branchial avec un épithélium différencié auraient à la fois un rôle respiratoire et osmorégulateur. Cette différenciation cellulaire au sein d'un même tissu est également retrouvée chez le branchiopode *Caenestheriella gifuensis* (Kikuchi et Shiraishi, 1997), chez la crevette palémonidé *Macrobrachium olfersii* (Freire et McNamara, 1995) et chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus* (Dunel-Erb *et al.*, 1996) où 2 types cellulaires co-existent dans l'épithélium. Par contre, chez les crabes brachyours, le rôle des branchies est associé à leur emplacement. Les branchies antérieures sont ainsi dévolues à la respiration alors que l'activité des branchies postérieures est axée essentiellement sur le transport d'ions (Mantel et Farmer, 1983; Taylor et Taylor 1992; Péqueux 1995; Lucu et Towle, 2003, Onken *et al.*, 2003 ; Torres *et al.*, 2007). Cette séparation anatomique entre respiration et osmorégulation est confirmée par l'immunolocalisation de la NKA uniquement dans les branchies postérieures chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (Cieluch *et al.*, 2007). Chez le crabe d'eau douce *Dilocarcinus pagei*, des mesures électro-physiologiques suggèrent même une spécialisation des épithéliums des branchies postérieures en fonction de leur épaisseur ;

l'épithélium fin absorberait les ions Cl^- alors que l'épithélium plus épais absorberait les ions Na^+ (Onken et Mc Namara, 2002).

L'immunofluorescence prononcée et la présence de nombreux ionocytes dans l'épipodite à toutes les salinités suggèrent une participation primordiale de ce tissu dans la régulation ionique. Les épipodites ont été décrits comme seul site d'activité de la NKA chez la caridée *Rimicaris exoculata* (Martinez *et al.*, 2005). Par ailleurs, les rôles prépondérants des épipodites et des branchies dans l'absorption des ions sont constatés chez le homard *Homarus gammarus* par des mesures de l'activité spécifique de la NKA qui montrent que 40% de l'activité enzymatique se situe dans les épipodites, autant dans les branchies et seulement 20% dans le branchiostégite (Flik et Haond, 2000). Nos données immunologiques suggèrent également que le branchiostégite est le moins impliqué des trois tissus dans l'osmorégulation chez *L. stylirostris*.

L'osmolalité de l'hémolymphe est essentiellement assurée par les ions Na^+ et Cl^- . Si le rôle de la NKA dans l'absorption des ions Na^+ et comme génératrice d'énergie pour les transporteurs secondaires ne fait aucun doute, les protéines transmembranaires responsables du transfert des ions Cl^- sont encore sujet à beaucoup de débats. Néanmoins, il est considéré que le NKCC et le CFTR font partie des transporteurs majeurs dans les processus de translocation des ions chlorures. Chez les crustacés, les crabes brachyours font l'objet de la plupart des expérimentations car la séparation fonctionnelle entre les branchies antérieures et les branchies postérieures permettent plus facilement d'appréhender les relations structure-rôle (Péqueux, 1995; Riestenpatt *et al.*, 1996; Kirschner, 2004, Freire *et al.*, 2008). Cependant, ces animaux sont osmoconformes en milieu marin et hyper-régulateurs en eau douce et c'est essentiellement l'hyper-régulation qui a été traitée chez les crustacés. D'autre part, ce sont des méthodes électro-physiologiques et de blocage chimique des enzymes qui ont été utilisées sur l'épithélium branchial afin d'appréhender les mécanismes de l'osmorégulation. Les données sur la localisation des transporteurs secondaires sont inexistantes.

La plupart des études d'immunolocalisation des transporteurs secondaires sont menées chez les poissons (Silva *et al.*, 1977; Marshall, 2002 ; Marshall *et al.*, 2002 ; McCormick *et al.*, 2003; Hiroi *et al.*, 2005; Lorin-Nebel *et al.*, 2006 ; Horng et Lin, 2008 ; Bodinier *et al.*, 2009). Le modèle d'hyper-hypo-régulation est par ailleurs plus fréquent chez les téléostéens, il est donc intéressant de rapprocher leur fonctionnement de celui des pénéidés. Dans notre étude, c'est la forme sécrétrice du NKCC (le NKCC1) qui a été recherché. Alors, nous nous attendions à retrouver cette forme plus intensément chez les animaux maintenus à 35 ppt mais

le NKCC1 a été détecté indifféremment en hyper et hypo-régulation. L'existence de la forme sécrétrice du NKCC en milieu hypotonique dans notre étude permet d'envisager plusieurs hypothèses. Premièrement, la protéine serait produite de manière continue mais inactive, permettant ainsi au mécanisme de régulation de se mettre rapidement en place en cas de changements brusques des conditions environnementales. Une autre possibilité serait que le stock de NKCC1 présent dans les cellules avant stabulation ne serait pas totalement épuisé après 9 jours d'acclimatation à 12 ppt. Une observation similaire est rapportée chez le loup de mer *Dicentrarchus labrax* où 2 semaines après le transfert de l'eau de mer vers l'eau douce, le NKCC passe de la position basolatérale à la position apicale dans très peu de ionocytes branchiaux (Lorin-Nobel *et al.*, 2006). Par contre, le passage d'un épithélium sécréteur à un épithélium absorbant est totalement réalisé au bout de 6 mois. Chez le gobie hawaïen *Stenogobius hawaiiensis* (McCormick *et al.*, 2003) et chez le killifish *F. heteroclitus* (Marshall *et al.*, 2002), la distribution du NKCC dans les ionocytes varie en fonction de la salinité du milieu passant d'une position basolatérale en eau de mer à une position apicale en eau douce. Chez le tilapia *Oreochromis mossambicus*, Horng et Lin (2008) montrent que le taux de NKCC branchial est 3 à 5 fois plus élevé chez les animaux en eau douce que ceux en eau de mer, et la position apicale suggère un rôle actif dans l'absorption des ions. Cependant, toutes ces études ont été réalisées avec l'anticorps NKCC T4 qui détecte toutes les isoformes du NKCC. D'autre part, Hiroi *et al.* (2008) indiquent que cet anticorps reconnaît également le co-transporteur Na^+/Cl^- ou NCC, ce qui diminue sa spécificité d'utilisation.

Un résultat important obtenu lors du marquage immunologique est l'emplacement du NKCC1 dans des cellules branchiales spécifiques et différentes de celles de la NKA. Cette observation rejoint les données de la microscopie électronique montrant que différents types cellulaires co-existent au sein de l'épithélium branchial (Fig. III.3A&B). Un couplage pourrait donc exister entre ces cellules afin d'assurer la sécrétion ou l'absorption des ions Na^+ et Cl^- . Dans le cas de *L. stylirostris*, cette association se ferait entre différentes cellules septales dont certaines seraient spécialisées dans l'absorption des ions Na^+ et d'autres dans la sécrétion des ions Cl^- . Des modèles de régulation ionique impliquant deux types de cellules sont proposées chez les poissons d'eau douce : des MRC (cellules riches en mitochondries) où se situent la NKA, le Na^+/Ca^+ et la VATPase d'une part, et des cellules pavimentaires qui abritent un échangeur Na^+/H^+ d'autre part (Wilson *et al.*, 2000 ; Marshall, 2002). Chez les poissons téléostéens marins, c'est un couplage cellulaire entre les MRC et des cellules accessoires qui assurerait l'efficacité de l'ionorégulation (Evans *et al.*, 2005 ; Hiroi *et al.*, 2005 ; Hiroi *et al.*,

2008). Des activités spécifiques en fonction du type de cellules au sein d'un même organe sont également suggérées chez le crabe rouge d'eau douce *Dilocarcinus pagei* (Weihrauch *et al.*, 2004). Chez cette espèce, les branchies postérieures sont caractérisées par une asymétrie dans l'épaisseur des épithéliums; les cellules de l'épithélium proximal plus épais aurait un rôle dans l'absorption de Na^+ alors que celles de l'épithélium distal plus fin aurait un rôle dans l'absorption du Cl^- . Chez *M. olfersii* (McNamara et Lima, 1997; McNamara et Torres, 1999), les auteurs proposent une association entre les cellules piliers, où transiteraient les ions Na^+ , et les cellules septales qui assureraient le passage de Na^+ dans l'hémolymphe.

Chez *L. stylirostris*, le CFTR n'est pas localisé dans les ionocytes typiques qui sont le siège de l'activité de la NKA dans le branchiostégite. Il a également été mis en évidence uniquement chez les animaux maintenus à 35 ppt dans les cellules piliers. Ces cellules ont une structure cellulaire moins complexe que les ionocytes avec des microvillosités apicales mais peu de mitochondries. Dans les épipodites, le CFTR est discret et contraste avec la présence prononcée de la NKA. Dans les branchies, le CFTR est trouvé en position apicale à 35 ppt, dans les cellules à NKA. Ce résultat est en accord avec son rôle excréteur des ions Cl^- en milieu hypertonique et a été décrit chez plusieurs poissons téléostéens. Chez *S. hawaiiensis*, le CFTR est localisé de façon apicale mais uniquement dans certaines cellules positives à la NKA. Le nombre de cellules à CFTR et l'intensité de ce dernier augmente après acclimatation à l'eau de mer alors qu'en eau douce, il est marqué de manière plus légère et plus diffus (McCormick, 2003). Chez *F. heteroclitus*, le CFTR passe d'une position cytoplasmique à une position apicale lorsqu'il est transféré de l'eau douce à l'eau de mer (Marshall *et al.*, 2002). Enfin, chez *D. Labrax* (Bodinier *et al.*, 2009), le CFTR est positionné apicalement dans les ionocytes branchiaux en eau de mer mais disparaît après 7 jours d'acclimatation en eau douce. En milieu hypotonique, nous avons constaté la disparition du CFTR des cellules où se manifeste l'activité de la NKA mais au profit d'une présence plus discrète près des sites de détection du NKCC1.

III.5 Conclusion

Nous avons vu que le juvénile de *L. stylirostris* était capable d'hyper-réguler ou d'hypo-réguler en fonction de la salinité du milieu environnant. Cette capacité à osmoréguler met en jeu différents transporteurs ioniques présents dans les branchies, les épipodites et le branchiostégite dont la NKA, le NKCC1 et le CFTR. Cette activité est confirmée par la présence de ionocytes dans les épipodites et le branchiostégite. Dans les branchies, d'autres

types cellulaires sont observés, moins structurés que les ionocytes, qui leur confèrent cependant une activité de régulation ionique en parallèle à leur rôle dans la respiration. La moindre différenciation des cellules branchiales pourraient nécessiter un fonctionnement couplé de deux types de cellules assurant l'efficacité des mécanismes de l'osmorégulation. D'autres transporteurs comme le Na^+/H^+ , l'anhydrase carbonique ou la VAT-Pase ont certainement des actions couplées avec ceux que nous avons étudiés. La localisation de ces transporteurs associée à des acclimations plus longues à différentes salinités devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes de l'osmorégulation chez les pénéidés.

Chapitre IV : Ontogénèse de l'osmorégulation et implication sur la tolérance à la salinité

IV.1	Introduction	60
IV.2	Matériels et méthodes	61
IV.2.1	Obtention des larves et post-larves.....	61
IV.2.2	Tolérance aux chocs de salinité.....	62
IV.2.3	Mesure de la capacité osmorégulatrice.....	63
IV.2.4	Spécificité de l'anticorps.....	64
IV.2.4.1	Dosage des protéines.....	65
IV.2.4.2	Western blot.....	66
IV.2.5	Immunohistochimie.....	66
IV.2.6	Microscopie électronique.....	67
IV.2.7	Analyses statistiques.....	67
IV.3	Résultats	67
IV.3.1	Tolérance aux chocs de salinité chez <i>L. stylirostris</i>	67
IV.3.2	Capacité osmorégulatrice.....	70
IV.3.3	Spécificité de l'anticorps Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α (H-300).....	72
IV.3.4	Mise en place des tissus et immunolocalisation de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	72
IV.3.5	Ultrastructure des organes de la cavité branchiale.....	74
IV.4	Discussion	77
IV.5	Conclusion	80

IV.1 Introduction

Les différentes études portant sur l'écologie des pénéidés (cf. chapitre II) indiquent que les juvéniles fréquentent généralement les estuaires où les conditions environnementales sont fluctuantes alors que les adultes migrent vers les eaux océaniques pour pondre. Après l'éclosion, *L. stylirostris* passe par plusieurs stades larvaires (Kitani, 1985): 6 stades nauplius, 3 stades zoés et 3 stades mysis qui se développent dans un environnement stable. Après la métamorphose, les post-larves se rapprochent des côtes et occupent les eaux estuariennes (Garcia et Le Restre, 1981). Dans cet environnement peu profond, la température et la salinité de l'eau peuvent subir d'importantes fluctuations (Kinne, 1963; Kinne, 1964). Et chez les pénéidés tels que *Penaeus merguensis*, l'influence de la salinité peut avoir un impact important sur la survie des stades précoces (Zacharia et Kakati, 2004).

Les processus d'osmorégulation permettent aux animaux aquatiques de supporter les changements de salinité du milieu environnant. Mais l'aptitude à osmoréguler diffère parmi les crustacés et Charmantier (1998) a décrit trois modèles d'ontogenèse de l'osmorégulation. Un premier groupe d'espèces, généralement sténohalins et marins, qui sont osmoconformes toute leur vie ; un second groupe d'animaux pour la plupart euryhalins, ayant une forte capacité à osmoréguler dans les premiers jours de leur vie et montrant une grande tolérance vis-à-vis des variations de salinité ; enfin un troisième groupe dont la capacité à osmoréguler évolue de faible à forte au cours de l'ontogenèse.

Nous avons montré dans le chapitre précédent que les juvéniles de 32 jours de *L. stylirostris* étaient capables d'hyper-hypo-réguler avec l'implication des organes osmorégulateurs de la cavité branchiale. L'objectif du travail présenté ci-après est d'évaluer les caractéristiques de l'osmorégulation au cours de l'ontogenèse chez *L. stylirostris* en déterminant au cours du développement larvaire :

- 1) la tolérance des animaux à un stress de salinité,
- 2) l'évolution de leur capacité osmorégulatrice,
- 3) l'apparition des tissus osmorégulateurs .

IV.2 Matériels et méthodes

IV.2.1 Obtention des larves et post-larves.

Deux phases d'élevage successives en bassin de terre à faible densité permettent d'obtenir des géniteurs de 8 mois et d'un poids moyen de 50g. A l'issue de l'élevage en bassin, ceux-ci sont transférés en salle de muration où la photopériode est artificiellement décalée (obscurité de 9h à 19h, éclairage de 19h à 9h) et une alimentation basée essentiellement sur de la nourriture fraîche favorise la qualité des pontes. Femelles et mâles sont stockés dans des bacs séparés. Une ablation oculaire est opérée chez les femelles afin de lever l'inhibition hormonale de la VIH (Vitellogenesis Inhibiting Hormone) sur la vitellogenèse et la température de l'eau est élevée progressivement à 29°C. Les premières pontes ont lieu 2 à 3 jours après cette opération.

Les femelles matures sont inséminées artificiellement 3 heures avant la ponte en déposant au niveau de leur thélycum du sperme extrait du spermatophore de 2 mâles. La ponte a lieu dans les 2-3 heures qui suivent l'insémination et elle est maintenue en suspension avec un léger bullage jusqu'au lendemain. Un échantillon d'une centaine d'œufs est prélevé 1 heure après la ponte afin de déterminer le taux de fécondation. Le lendemain, la ponte est récupérée sur un tamis de 100 microns et mise dans un récipient de 10 litres; 3 échantillons de 1 ml permettent d'estimer le taux d'éclosion ainsi que le nombre de larves issues de chaque ponte.

Les nauplius sont regroupés et mis en élevage dans des bacs de 150 litres remplis avec de l'eau de mer (33-35 ppt) à 29°C, filtrée à 5 microns et traitée à l'EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acétique) permettant la chélation des métaux lourds. La densité d'élevage est de 180 larves par litre. L'élevage dure environ 23 jours dans une eau aérée et maintenue à 29°C par des résistances chauffantes. L'alimentation est fonction du stade larvaire : les nauplii s'alimentent sur leur propre vitellus puis au 2^{ème} jour d'élevage de l'aliment inerte est distribué en prévision du passage au stade zoé 1. A partir de zoé 3, l'alimentation est composée essentiellement de proies vivantes, les artémies. Un traitement antibiotique préventif est administré tous les 2 jours entre J3 et J9. Au delà, la qualité sanitaire du milieu d'élevage est assurée par des renouvellements d'eau réguliers. Lorsque les post-larves ont atteint le stade PL3, la phase d'acclimatation débute, la température est ramenée progressivement à celle des conditions extérieures et le développement des post-larves est suivi par détermination de la formule rostrale. Lorsque cette dernière a atteint au minimum

[5-0], les animaux sont transférés dans les bassins en terre pour y subir la phase de grossissement.

Les différentes étapes de la production pour obtenir les animaux nécessaires aux expérimentations effectuées dans le cadre de cette thèse sont résumées dans la figure IV.1.

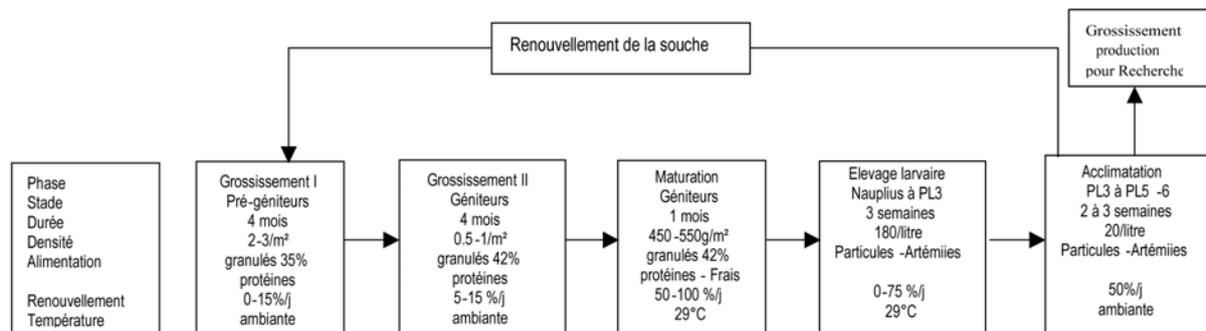


Figure IV.1 : Cycle de production de la crevette bleue au LEAD.

IV.2.2 Tolérance aux chocs de salinité.

Les milieux de différentes salinités sont obtenus par mélange d'eau douce distillée et d'eau de mer filtrée à 5 microns stérilisées. Les salinités supérieures à l'eau de mer (40 et 45 ppt) sont obtenus par ajout du sel de mer (Sera, Allemagne). Les milieux ainsi obtenus sont stockés à l'abri de la lumière à 24°C et utilisés au maximum dans les 7 jours suivant leur préparation. Les milieux de salinité comprises entre 0 et 45 ppt sont préparés et la mesure exacte de l'osmolalité du milieu est obtenue à l'aide d'un osmomètre Wescor® « Vapor Pressure » 5520.

Les animaux sont prélevés dans les bacs d'élevage larvaire (Fig. IV.2) aux stades suivants: nauplius deuxième jour, zoé 2, zoé 3, mysis 1, mysis 2, PL1, PL2, PL4 et PL9. Il sont concentrés dans un bécher à l'aide d'une maille et avec de l'eau à la même température et salinité que le bac d'élevage. La taille de la maille utilisée varie en fonction du stade de développement de l'animal : 100 microns à nauplius, 335 microns de zoé 3, mysis 2, PL1 et PL2 et 500 microns de PL4 à PL9.

A l'aide d'une micropipette, une quinzaine d'animaux est prélevée simultanément du bécher, remise sur maille trempée dans de l'eau à la même salinité que celle du bécher. La maille est ensuite rapidement séchée sur un papier absorbant et tous les animaux sont récupérés sur une coupelle cette fois-ci à l'aide d'une pissette contenant de l'eau à la salinité désirée. Le temps

d'acclimatation débute à ce moment-là. Les larves sont ensuite comptées et pipetées sous la loupe binoculaire puis transférées dans le récipient d'élevage contenant l'eau à la salinité voulue. De nauplius à PL4, dix animaux sont placés dans les tubes et le volume est complété à 30 ml en triplicat. Pour les PL9, les animaux sont mis dans des volumes de 300 ml. Six à huit salinités sont testées par stade. Les contenants sont disposés sur une table d'agitation installée dans une chambre thermorégulée à 29°C. Aucun nourrissage, ni bullage n'est apporté durant l'expérimentation. Le suivi de la mortalité est effectuée toutes les heures les six premières heures puis à 24 heures. Les animaux sont considérés comme morts lorsque plus aucun mouvement n'est détecté malgré l'agitation du tube ou la stimulation avec une pince.

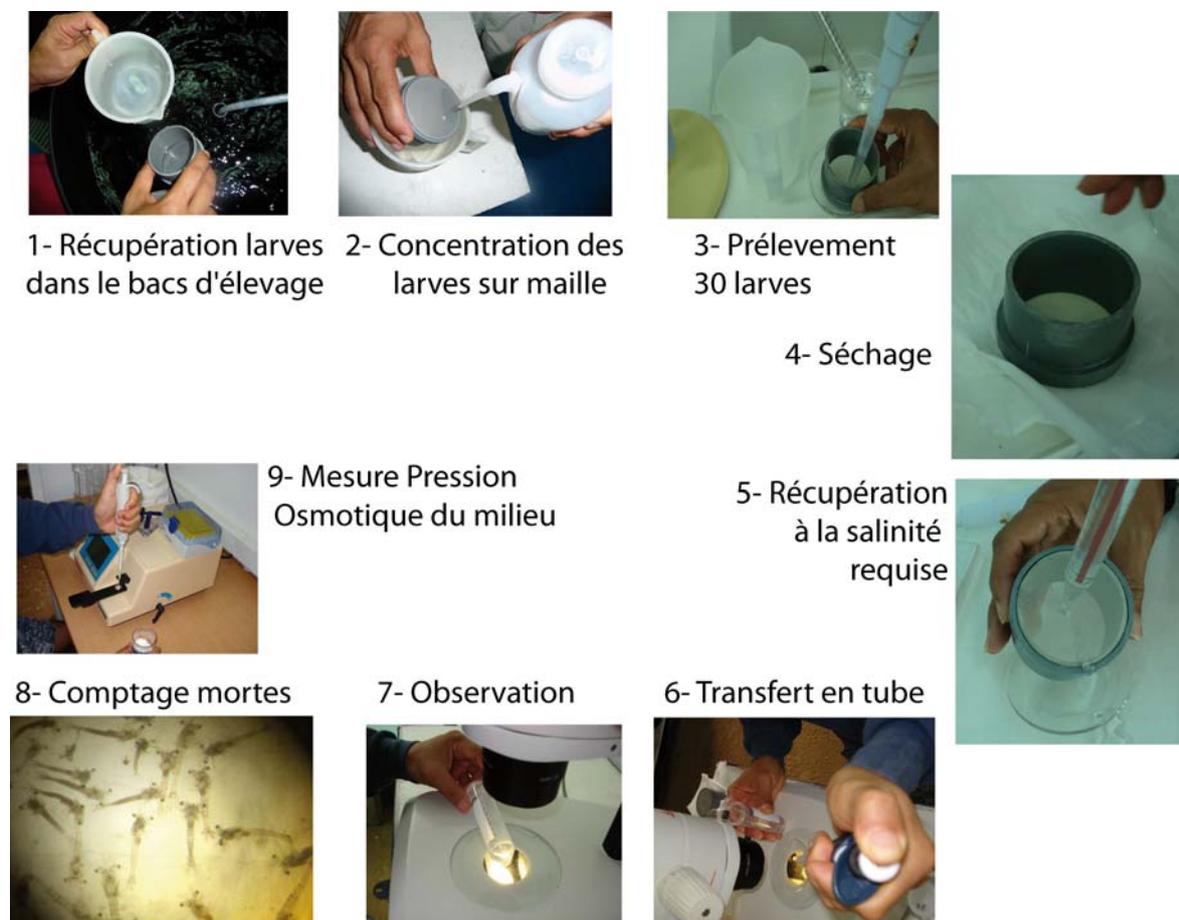


Figure IV.2 : Protocole de testage de la tolérance des animaux au choc osmotique.

IV.2.3 Mesure de la capacité osmorégulatrice

La mesure de l'osmolalité de l'hémolymphe est indirecte, elle est réalisée chez les larves à l'aide d'un nano-osmomètre Otago. Elle repose sur le principe des différences de températures de fusion en fonction de la concentration en solutés des solutions. Les points de

fusion d'une solution à 0 et 1000 mOsm/kg sont respectivement de 0°C et -1,858°C. L'abaissement cryoscopique est proportionnel à la concentration en ions de la solution.

La relation qui lie la température de fusion et l'osmolalité de l'échantillon est donc :

$$\text{Osmolalité en mOsm/kg} = (1000 \times T_f) / -1,858$$

où T_f est la température de fusion en degré celsius

La conversion de l'osmolalité en salinité est ensuite effectuée selon la relation 1 ppt = 29,41 mOsm/kg.

Des micro-aiguilles sont préparées à partir de micro-capillaires de 0,5 à 2 μm étirés en 2 fois sous la flamme en tenant chaque extrémité des tubes à l'aide de pinces fines. Les aiguilles ainsi préparées sont conservées à l'abri de l'humidité. Avant utilisation du nano-osmomètre, une calibration systématique est opérée avec de l'eau douce et une solution à 1000 mOsm/kg sur une moyenne de 3 puits. Environ 20 nanolitres sont nécessaires pour déterminer l'osmolalité d'un échantillon.

Les prélèvements d'hémolymphe sont réalisés 5-7 heures après immersion des larves dans un milieu à salinité donné. En effet une étude préliminaire a montré que l'osmolalité de l'hémolymphe était variable dans les premières heures pour atteindre une valeur stable entre 4 et 9h.

La larve est récupérée sur une coupelle, prélevée par le telson avec une pince et séchée rapidement sur un papier absorbant avant d'être plongée dans une huile minérale, évitant ainsi son dessèchement. Sous loupe binoculaire, une micro-aiguille est insérée entre la jonction du céphalothorax et de l'abdomen afin d'atteindre le cœur (Fig. IV3). L'hémolymphe est aspirée par capillarité puis refoulée à l'aide d'une seringue reliée à la micro-aiguille par un tube souple dans un des puits du disque. Entre 3 et 10 mesures sont réalisées pour chaque combinaison « stade larvaire-salinité ».

IV.2.4 Spécificité de l'anticorps

L'anticorps Na⁺/K⁺-ATPase α (H300 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'homme. La vérification de la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de la Na⁺/K⁺-ATPase de la crevette est déterminée par Western Blot sur du tissu branchial. Un dosage des protéines au préalable est réalisé afin d'homogénéiser la concentration totale en protéines des échantillons.

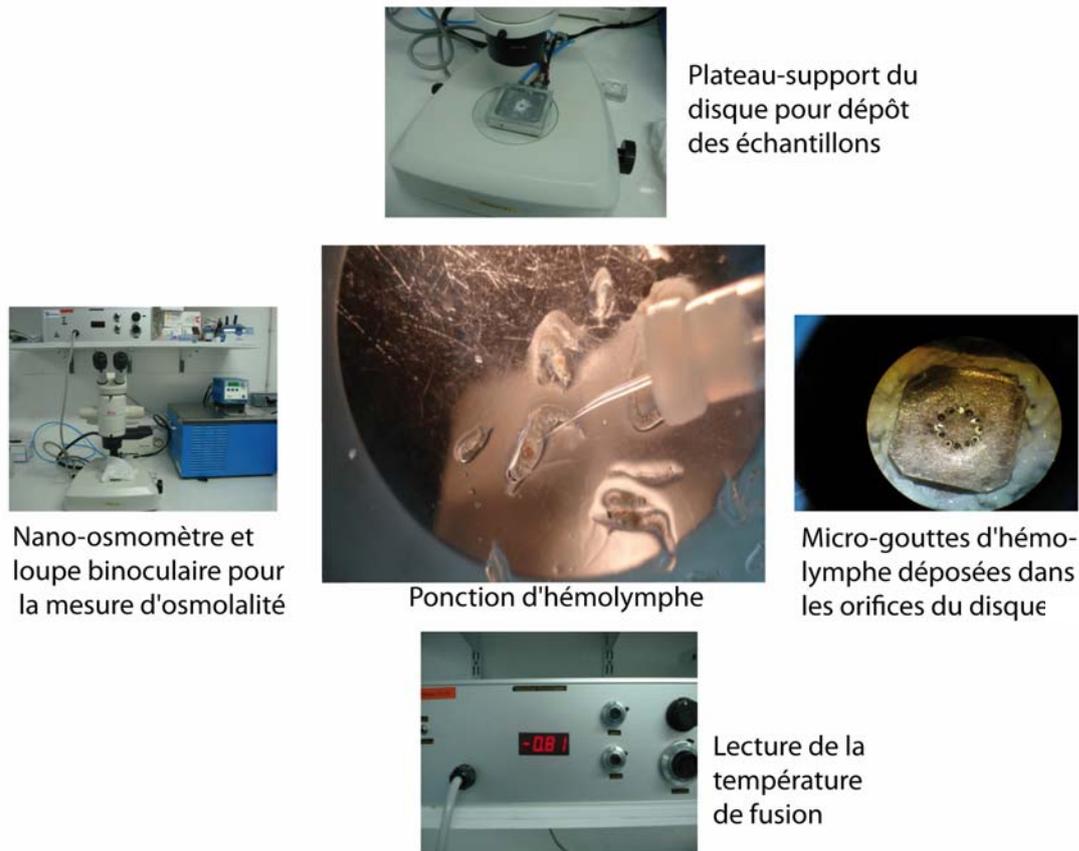


Figure IV.3 : Différentes étapes de la mesure de la pression osmotique de l'hémolymphe chez les larves.

IV.2.4.1 Dosage des protéines

Les branchies sont prélevées sur deux juvéniles de 10g et conservées dans une solution tampon SEI (sucrose 0.3M ; Na₂EDTA 0.02M ; imidazole 0.1M ; qsp H₂O 50 ml) avec un inhibiteur de protéase (1 pastille PI 25x, Mini, EDTA-free, Roche, Mannheim, Allemagne) à -80°C jusqu'au jour de leur utilisation. Après décongélation, rapide, les échantillons sont broyés dans le tampon SEI et maintenus sur glace pendant 90 minutes. Une première centrifugation à 2000 tours/min à 4°C pendant 6 minutes est effectuée et le culot est suspendu de nouveau dans du SEI avant de subir une nouvelle centrifugation. Le taux de protéines totales dans le surnageant est ensuite estimé selon la méthode de Bradford (1976). Une gamme étalon est établie à partir de l'albumine sérique bovine aux concentrations suivantes : 0,1- 0,25 - 0,5 - 0,75 mg/ml. Chaque point du dosage est fait en triplicat. Dix microlitres d'échantillon ou de solution standard sont mélangés à 250 µl de de bleu de Coomassie. Un temps de réaction de 10 minutes à température ambiante est nécessaire avant la lecture par

spectrophotométrie d'absorbance à une longueur d'onde de 630 nm. La concentration en protéine de chaque échantillon est déterminée en utilisant la droite d'étalonnage.

IV.2.4.2 Western blot

Pour chacun des échantillons, 12 μ l sont mélangés à 3 μ l de tampon de charge 5x (Tris HCL 1M pH 6.8, Glycerol 50%, SDS 10%, 2-mercaptoethanol, bleu de bromophenol 1%, H₂O). Un marqueur de taille « Precision Plus » Protein™ Standard Dual Color est utilisé comme échelle standard contenant 10 protéines de poids moléculaire connu. Les échantillons et les marqueurs de taille sont chauffés respectivement 5 minutes et 1 minute. Les protéines sont séparées selon leur taille sur gel de polyacrylamide dans un tampon d'électrophorèse composé d'1 volume de TGS (Tris-Glycérine-SDS) et de 9 volumes d'eau distillée. La migration est effectuée à 150 V et 80 mA pendant 30 minutes puis à 200 V et 80 mA les 30 minutes suivantes. Le transfert sur membrane PVDF, activée préalablement au méthanol et imbibée de tampon de transfert (Tris 48mM, Glycine 39mM), est ensuite effectué en appliquant le gel et la membrane face-à-face et à l'aide d'un courant électrique de 15 V et 80 mA pendant 2 heures. Le blocage de la membrane est réalisé en l'immergeant à 37°C pendant 1 heure dans du PBS-R 5% puis des rinçages de 3 fois 10 minutes sont effectués dans une solution de PBS additionnée de 0,05% de Tween® 20. La protéine cible est détectée avec l'anticorps primaire NKA α (H300) de lapin diluée au 1/1000 et l'anticorps secondaire IRDYE 800 anti-lapin dilué au 1/500. Les images sont obtenues avec un Odyssey Fc (Li-Cor Biosciences) par fluorescence infra-rouge pendant 2 minutes et traitées à l'aide du logiciel Image Studio Odyssey Fc.

IV.2.5 Immunohistochimie

La technique est la même que décrite précédemment (cf. §III.2.5). Les différents stades larvaires sont fixés au Davidson ou au liquide de Bouin pendant 24 heures et conservés dans l'éthanol à 70°. Après une déshydratation dans des bains d'éthanol ascendants, les échantillons sont inclus dans un bloc de Paraplast®.

Des coupes de 4 microns sont effectuées et récupérées sur lames Poly-L lysine. Après dissolution du Paraplast® et réhydratation des coupes, la saturation et le blocage des sites non spécifiques de l'anticorps sont réalisés à l'aide d'une solution PBS contenant 5% de poudre de lait (PBS-R5%) à température ambiante pendant 20 minutes. L'anticorps primaire NKA α (H300):sc-28800 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) est appliqué à la concentration de 8 μ g/l dans une solution PBS-R 0,5% mais avec une incubation de 2 heures seulement à une

température de 4°C. Les lames témoins reçoivent la solution de PBS-R 0,5% sans anticorps. Après rinçage, l'anticorps secondaire rhodamine rouge lointain âne anti-lapin (Invitrogen™) à 4 µg/l dans une solution de PBS-R0,5% est finalement déposé sur l'échantillon pour 1 heure d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Après rinçage et montage, les observations et les images sont réalisées sur un microscope Leica Diaplan équipé d'un filtre d'excitation à bande passante de 450-490nm associé à un appareil photo Leica DC 300 F et son logiciel FW 4000 (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France).

IV.2.6 Microscopie électronique

La technique a été décrite au chapitre précédent (cf. §III.2.4). Après fixation dans du glutaraldéhyde à 2,5%, les échantillons sont post-fixés dans une solution d'acide osmique OsO₄ à 1% pendant 2-3 heures à 4°C. Les tissus sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol de concentration croissante et d'oxyde de propylène avant d'être inclus dans de la résine de Spurr. Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine alors que les coupes ultra-fines sont contrastées avec un mélange d'éthanol 70° et de citrate de plomb à 2% d'acétate uranyle. Les observations sont réalisées sur un microscope électronique à transmission JEOL 1200 EX2 à 70kV.

IV.2.7 Analyses statistiques

Les résultats sont analysés statistiquement par l'analyse de la variance à une voie (ANOVA) après vérification de l'homogénéité des variances. Les résultats en pourcentage subissent une transformation arcsin(√) au préalable. Lorsque des différences significatives ($p < 0.05$) sont observées, un test de classement des moyennes *a posteriori* (test PLSD de Fisher) est effectué. Dans le cas d'une hétérogénéité des variances, les données sont analysées par un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis, au seuil de significativité de 5 %). Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview.

IV.3 Résultats

IV.3.1 Tolérance aux chocs de salinité chez *L. stylirostris*.

La capacité à résister aux changements salins brusques dépend à la fois du stade de développement et de la durée d'immersion dans le milieu (figure IV.4). Ainsi au stade nauplius (Fig. IV.4A), les survies à 24h sont supérieures à 80% dans les milieux de salinités supérieures à 26,7 ppt (785 mOsm.kg⁻¹) et jusqu'à 45,7ppt (1345 mOsm.kg⁻¹). Ces larves supportent une immersion de 6 heures dans une eau à 19,3 ppt (569 mOsm.kg⁻¹) mais le

nombre de survivants après 24 heures n'est plus que de 30%. La survie diminue au fur à mesure de l'abaissement de la salinité et aucun nauplius survivant n'est observé après 6 heures dans les eaux de salinité inférieure à 9,8 ppt (290 mOsm.kg⁻¹).

Les larves au stade zoé (Fig. IV.4B) montrent des survies proches de 80% après 6 et 24 heures lorsqu'ils sont transférés dans une eau à salinité comprise entre 21,8 ppt (641 mOsm.kg⁻¹) et 45,7 ppt. La chute de la résistance est ensuite brusque puisqu'une diminution de 2 ppt soit à 20,2 ppt (595 mOsm.kg⁻¹), entraîne 87% de mortalité à 6 heures et 100% à 24 heures.

Au stade mysis (Fig. IV.4C), 97% des animaux survivent à des salinités supérieures ou égales à 26,3 ppt (775 mOsm.kg⁻¹). En deçà, la survie diminue pour atteindre 53% à 24,5 ppt (723 mOsm.kg⁻¹) et à 21,8 ppt (641 mOsm.kg⁻¹), toutes les mysis meurent dans la première heure.

Les jeunes stades post-larvaires, PL1/P2 (Fig. IV.4D), ont une survie à 24 heures supérieure à 90% dans les milieux de salinités supérieures à 25,5 ppt (750 mOsm.kg⁻¹) puis une diminution de 2 ppt de la salinité entraîne de fortes mortalités (plus de 70% après 24 heures). A 21,6 ppt (636 mOsm.kg⁻¹), 10% survivent au bout de 6h et 3% à 24 heures alors qu'à 17,1ppt (503 mOsm.kg⁻¹), la mortalité est totale dans l'heure.

Une sensibilité aux salinités supérieures à 35ppt apparaît chez les PL4/P8 dont la survie diminue de 20 et 37% 24h après le transfert dans les milieux respectifs de 41,6 ppt (1222 mOsm.kg⁻¹) et 45,7 ppt (1345 mOsm.kg⁻¹) (Fig. IV.4E). A remarquer que 6h après le transfert, la survie à ces deux salinités était proche de 100% tout comme dans les salinités inférieures jusqu'à 20,8ppt (612 mOsm.kg⁻¹). La survie est réduite à 25 et 43% dans les milieux dilués de 50% (à 16,3 et 18 ppt) pour être nulle au bout de 6h à 14 ppt (411,6 mOsm.kg⁻¹).

Au dernier stade testé PL9/P25 (Fig. IV.4F), la résistance totale pendant 24 heures au choc osmotique est étendue à une gamme de salinité allant de 6 à 37,6 ppt (176 à 1107 mOsm.kg⁻¹). C'est seulement dans les milieux plus salés que l'eau de mer que des mortalités significatives sont observées au bout de 24 h.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les PL4 et PL9 avaient dans ces fortes salinités des comportements anormaux avec des mouvements très brusques et répétés.

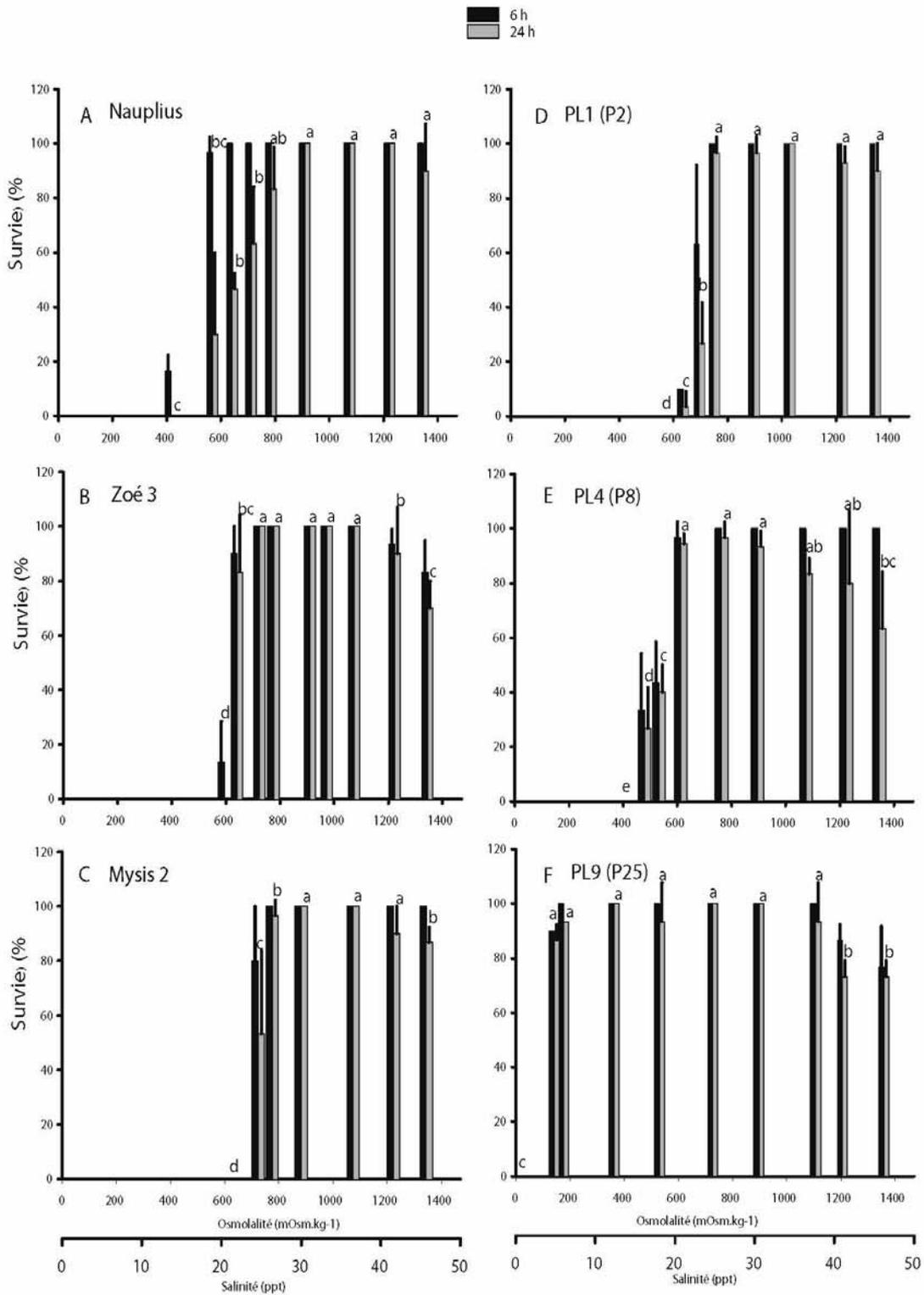


Figure IV.4 : Taux de survie après 6 heures et 24 heures en fonction de la salinité du milieu et des stades de développement (A-F). Moyenne ± écart-type (n=3); différentes lettres indiquent des différences significatives entre les survies ($p < 0.05$) à 24 h.

La représentation des valeurs de salinité létale pour 50% des animaux (SL50) à 24 heures en fonction du stade de développement permet d'avoir une vue synthétique de la résistance des animaux (Fig. IV.5). Nous pouvons ainsi remarquer que les stades mysis et PL1 sont les plus sensibles à la dessalure puisque 50 % des animaux meurent à des salinités au dessus de 24 ppt. Pour les stade nauplius et zoé, la SL50 est d'environ 22 ppt. Pour les stades post-larvaires de PL2, PL4 et PL9, les SL50 sont estimées respectivement à 20, 17 et 3 ppt.

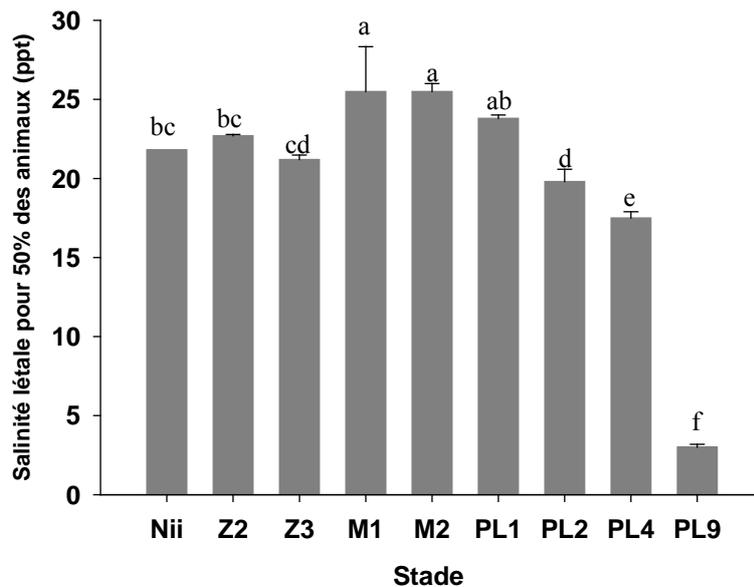


Figure IV.5 : Salinité létale pour 50% des animaux en fonction du stade de développement. Les barres verticales représentent l'erreur standard et les lettres signifient les différences significatives au seuil $\alpha=0,05$.

IV.3.2 Capacité osmoréglatrice.

La variation de l'osmolalité de l'hémolymphe et la capacité osmoréglatrice de *L. stylirostris* en fonction de la salinité du milieu sont données dans la figure IV.6. Dans les limites de leur résistance à la dessalure, les larves zoé et mysis hyper-osmorégulent légèrement à toute les salinités testées entre 22,1 (650 mOsm.kg⁻¹) et 44,2 ppt (1300 mOsm.kg⁻¹). La pression osmotique de l'hémolymphe reste toujours au dessus de celle du milieu dans lequel baigne l'animal et la CO est toujours positive, entre 0 et 150 mOsm.kg⁻¹. Après la métamorphose (stade post-larve), il y a une modification de l'aptitude à osmoréguler et la post-larve arrive à hyper-hypo-réguler. A PL1, l'animal hyper-hypo-régule légèrement avec une hyper-CO en dessous de 50 mOsm.kg⁻¹ alors que l'hypo-CO varie de -10 à -100 mOsm.kg⁻¹. A PL4, la tendance à l'hyper-hypo-osmorégulation observée à PL1 est plus prononcée avec une hyper-CO variant de 50 à 100 mOsm.kg⁻¹ et une hypo-CO allant de -100 to -200 mOsm.kg⁻¹.

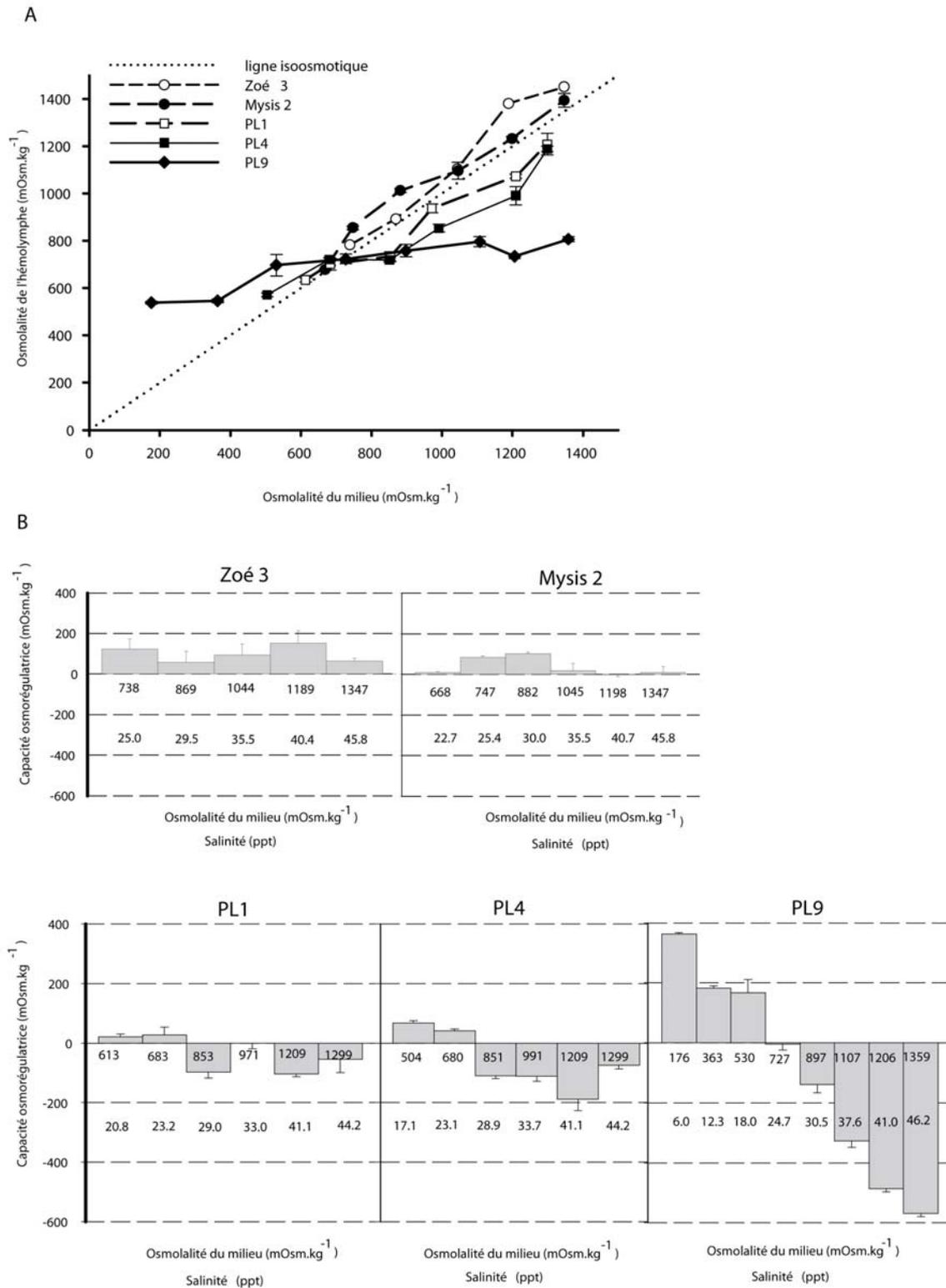


Figure IV.6 : (A) Variations de l'osmolalité de l'hémolymphes à différents stades de développement en relation avec la salinité du milieu environnant; Ligne diagonale en pointillés: ligne isoosmotique. Moyenne ± Ecart-type (n=3 à 10). (B): Variations de la capacité osmorégulatrice à différents stades de développement en relation avec la salinité du milieu environnant. Moyenne ± écart-type (n=3 à 10).

A PL9, les mesures entre 6 ppt (176 mOsm.kg⁻¹) et 46,2 ppt (1358 mOsm.kg⁻¹) montrent que l'hyper-CO varie de 200 à 380 mOsm.kg⁻¹ alors que l'hypo-CO atteint la valeur de -580 mOsm.kg⁻¹ pour les salinités testées les plus élevées. Le point iso-osmotique à ce stade est évalué à 720 mOsm.kg⁻¹ soit 24,5 ppt.

IV.3.3 Spécificité de l'anticorps Na⁺/K⁺-ATPase α (H-300)

La figure IV.7 montre la migration d'une bande protéique dans les échantillons de branchies de crevette qui s'arrête juste au dessus de la bande protéique de 100 kDa de l'échelle standard. Nous sommes donc en présence d'une protéine de taille correspondant approximativement à 110 kDa et conforme au poids moléculaires des différents isoformes de la sous-unité α de la NKA.

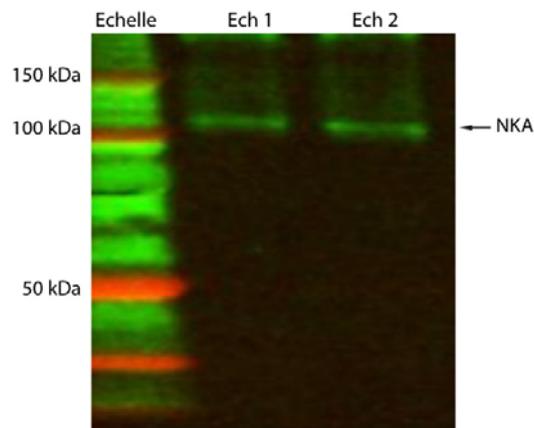


Figure IV.7 : Western Blot de la NKA dans les branchies de juvéniles de *L. stylirosotris* élevés à 35 ppt.

IV.3.4 Mise en place des tissus et immunolocalisation de la Na⁺/K⁺-ATPase

Les coupes sans anticorps primaire et servant de contrôle négatif ne montrent qu'une autofluorescence de la cuticule mais aucune réaction immuno-spécifique au niveau des organes examinés quel que soit le stade considéré.

D'un point de vue anatomique, seuls la pleure et le branchiostégite sont présents dans la cavité branchiale au stade zoé (Fig. IV.8A) mais la Na⁺/K⁺-ATPase est uniquement localisée au niveau de la pleure (Fig. IV.9A). Au stade mysis, des déformations de la partie ventrale de la pleure indiquent l'emplacement des futures branchies et le branchiostégite s'épaissit (Fig. IV.8B); un début d'immunofluorescence apparaît le long de l'épithélium du branchiostégite (Fig. IV.9B). Au stade PL1, les épipodites apparaissent alors que les branchies sont absentes; les déformations sont maintenant visibles tout le long de la pleure (Fig. IV.8C).

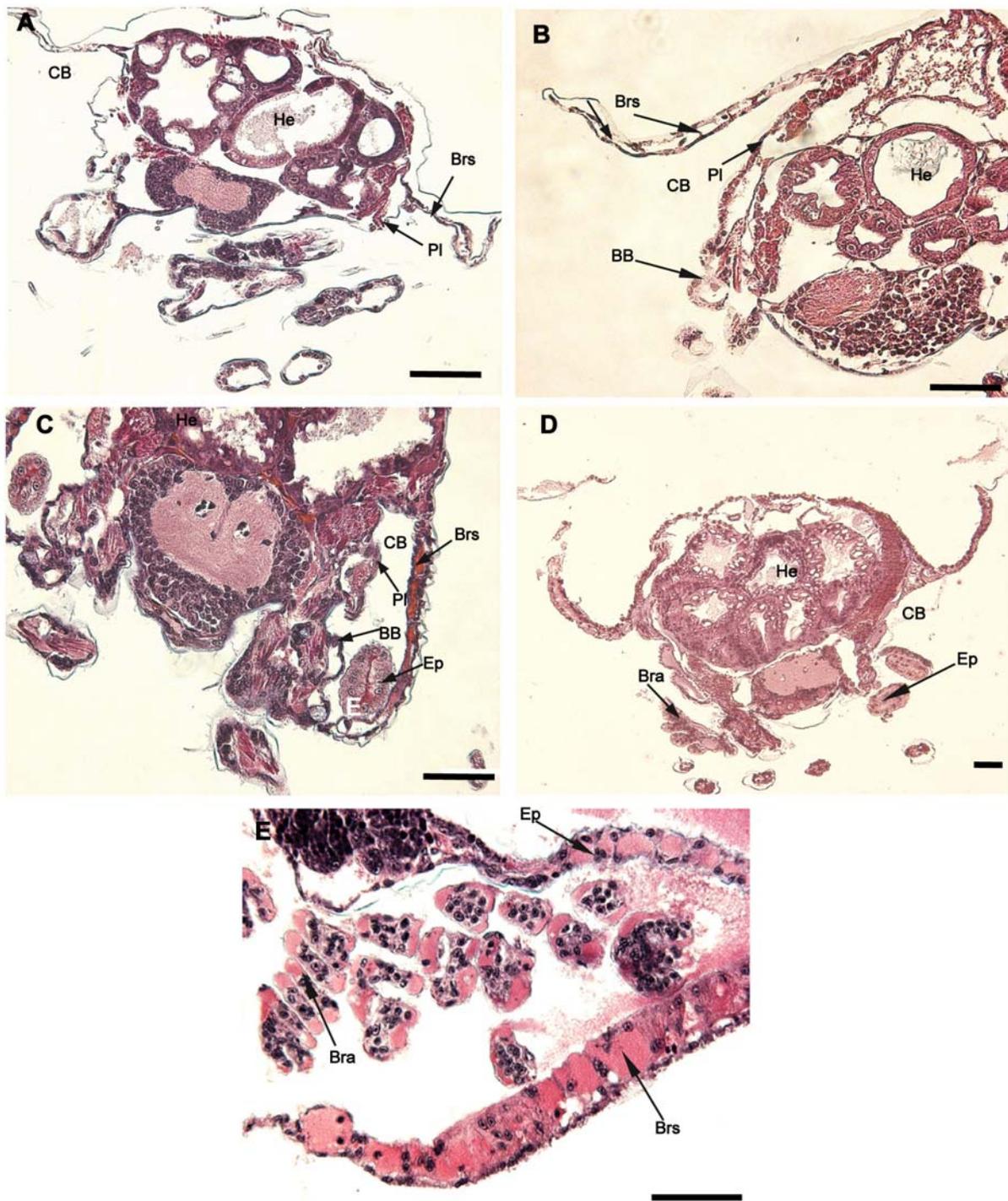


Figure IV.8 : Coupe transversale du céphalothorax d'une zoé 2 (A) : seuls la pleure et le branchiostégite sont présents dans la cavité branchiale ; d'une mysis 2 (B) : les déformations de la base de la pleure qui donneront les futures branchies ; d'une PL1 (C) : les épipodites sont bien visibles ; d'une PL4 (D) : les branchies apparaissent progressivement ; Coupe transversale de la cavité branchiale d'une PL9 (E) : les trois tissus sont présents et les branchies sont de plus en plus développées. Echelle : 50 μ m.

CB : cavité branchiale; Brs : branchiostégite; BB : Bourgeon Branchial; FB : Filament Branchial; Ep : Epipodite ; He : Hépatopancréas ; LaB : Lamelle branchiale ; PI : Pleure.

La pleure et les branchies sont toujours immunopositives et les épipodites montrent également une forte immunoréactivité (Fig. IV.9C). Au stade PL4, les branchies sont de plus en plus développées (Fig. IV.8D) mais aucune trace d'immunofluorescence n'est détectée (Fig. IV.9D). La pleure a cessé d'immunoréagir tandis que les épipodites et le branchiostégite sont très immunofluorescents. A PL9, les lamelles et filaments branchiaux sont bien en place dans la cavité branchiale (Fig. IV.8E) mais l'immunolocalisation de la Na^+/K^+ -ATPase est toujours négative dans ce tissu alors qu'elle est intense dans les épipodites et le branchiostégite (Fig. IV.9E et IV.9F).

IV.3.5 Ultrastructure des organes de la cavité branchiale

Dans cette étude, l'observation des organes osmorégulateurs en microscopie électronique s'est limitée à PL9, stade où tous les tissus sont bien en place dans la cavité branchiale (Fig. IV.10A). Les coupes transversales des lamelles branchiales montrent que la structure est bien développée avec un épithélium très mince, des noyaux très clairsemés sous la cuticule et un tissu central connectif (Fig. IV.10B et C). De larges lacunes hémolymphatiques sont situées entre les tissus et sont maintenues ouvertes par des minces cellules piliers. Aucune différenciation en ionocytes n'est observée au niveau des minces cellules de l'épithélium. Par contre, les cellules spécialisées dans le transport d'ions sont bien visibles au niveau des épipodites et de branchiostégites. Les épipodites (Fig. IV.10D et E) sont composés de deux couches épithéliales identiques se faisant face, séparées par des lacunes hémolymphatiques et se joignant de temps en temps avec des cellules piliers. Les ionocytes avec les nombreuses mitochondries associées à des invaginations de la membrane basale de la cellule sont visibles. D'abondantes microvillosités sont observées sur la partie apicale des cellules sous une mince cuticule. Des cellules ionocytes typiques sont également localisées au niveau de l'épithélium interne du branchiostégite (Fig. IV.10F et G) avec des cellules piliers présentant des microvillosités apicales et profondes et d'abondantes invaginations basolatérales associées aux mitochondries.

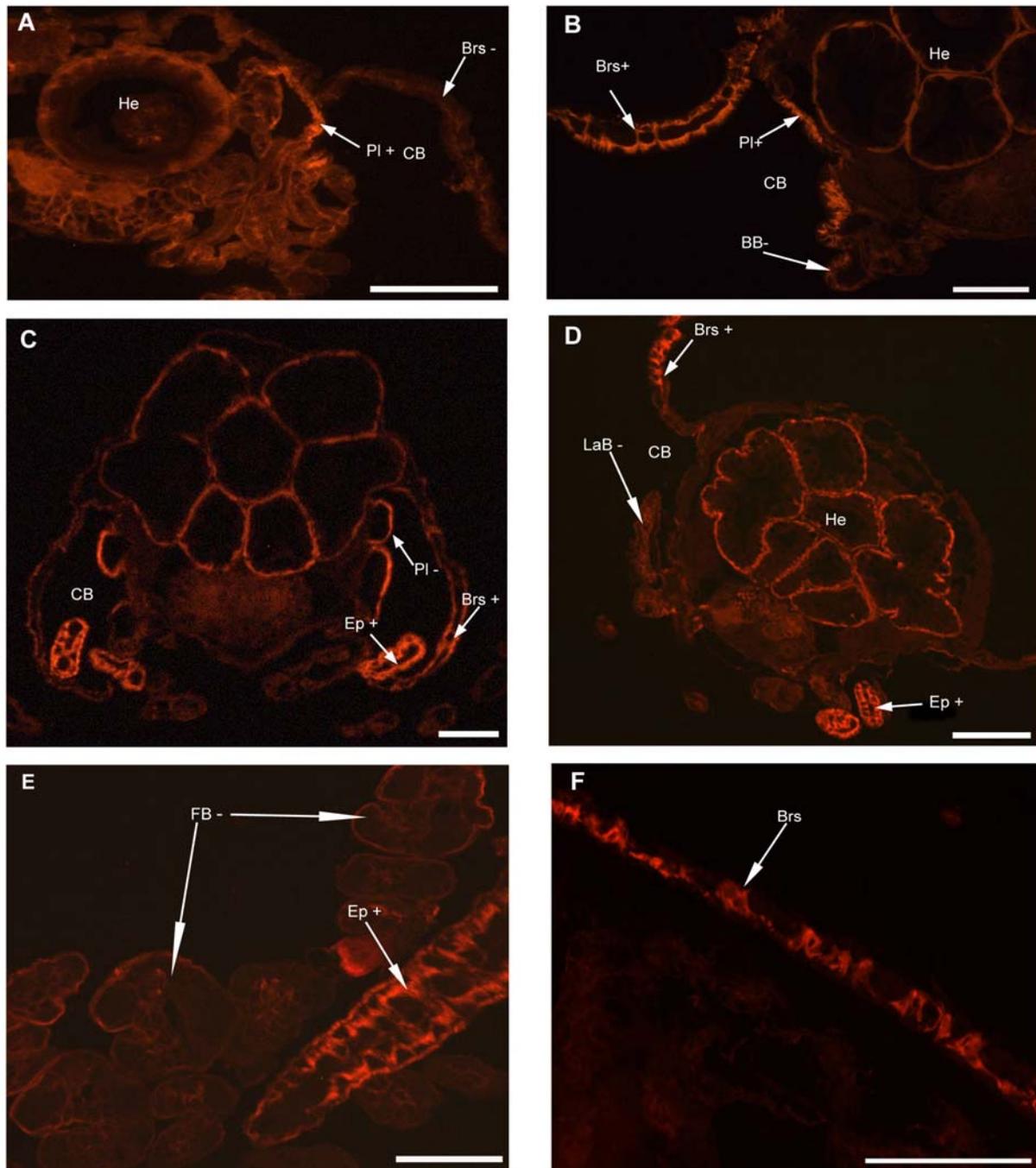


Figure IV.9 : Immunolocalisation de la Na^+K^+ -ATPase dans les organes de la cavité branchiale chez *Litopenaeus stylirostris*. Le + indique que l'immunoréactivité est positive. **A**, Coupe transversale du céphalothorax d'une zoé 2; immunofluorescence de l'épithélium pleural **B**, Coupe transversale du céphalothorax d'une mysis 2; immunofluorescence de l'épithélium de la pleure et du branchiostégite. **C**, Coupe transversale du céphalothorax d'une PL1; Immunoreactivité positive de la pleure, du branchiostégite et des ébauches d'épipodites. **D**, Coupe transversale du céphalothorax d'une PL4; Immunofluorescence des épipodites et du branchiostégite alors qu'aucune immunoréactivité n'est observée dans les branchies. **E**, Coupe d'un épipodite avec immunofluorescence et absence dans les filaments branchiaux d'une PL9. **F**, Coupe longitudinale du branchiostegite avec forte immunofluorescence dans les cellules piliers et de l'épithélium interne d'une PL9. CB : cavité branchiale; Brs : branchiostégite; BB : Bourgeon Branchial; FB : Filament Branchial; Ep : Épipodite ; He : Hépatopancréas ; LaB : Lamelle branchiale ; Pl : Pleure. Echelle = 100 μm .

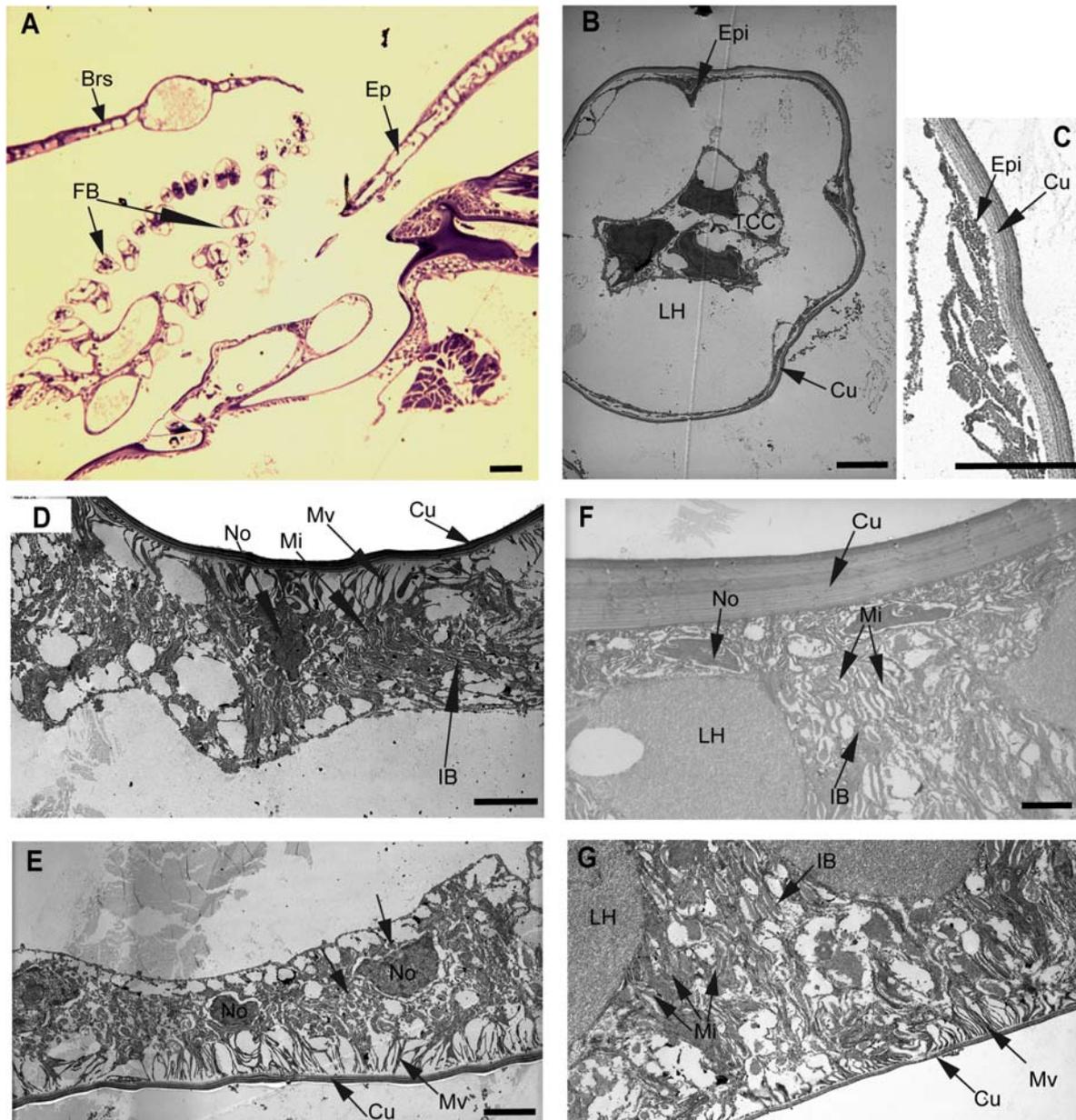


Figure IV.10 : Coupe semi-fine et ultrastructure des organes de la cavité branchiale au stade PL9 (P25 à 29°C). **A.** Coupe semi-fine de la cavité branchiale. **B, C.** Filament branchial avec un épithélium très fin. **D, E.** Deux bords de l'épithélium de l'épipodite avec leur réseau étendu de microvillosités apicales. **F.** Bord externe du branchiostégite, avec une épaisse cuticule et les profondes invaginations basolatérales. **G.** Bord interne du branchiostégite avec de nombreuses microvillosités sous une cuticule mince. Echelle = 8 μ m (sauf A échelle = 20 μ m).

IB: invaginations basolatérales; Brs: Branchiostégite; TCC: tissu connectif central; Cu: cuticule; Ep: Epipodite; Epi: Epithélium; FB: Filament branchial; LH: Lacune Hémolympatique; Mi: Mitochondrie; Mv: Microvillosité; No: Noyau.

IV.4 Discussion

Des différences significatives de survie et de croissance ont été observées chez les larves de crustacés soumises à un stress précoce, qu'il soit osmotique ou nutritionnel (Dawirs, 1986; Anger *et al.*, 1998; Gimenez, 2000). Ces chocs de salinité sont des expériences couramment pratiquées pour évaluer la qualité des larves de crevettes avant l'ensemencement des bassins mais également pour prédire leurs performances ultérieures en élevage. (AQUACOP *et al.*, 1991; Tackaert *et al.*, 1994; Samocha *et al.*, 1998; Palacios et Racotta, 2007). L'analyse et l'interprétation des résultats de tels tests doivent cependant être faites avec précaution car les crustacés sont sujets à des alternances de périodes d'inter-mues et mues. Ces dernières sont notamment très fréquentes pendant les phases larvaires et post-larvaires. Un différentiel de mortalité entre deux lots peut donc être uniquement lié à un état physiologique différent ; dans notre étude, les tests ont été répétés afin de minimiser l'impact de ces facteurs intrinsèques.

Les animaux ont été mis dans des conditions sévères. Nous nous attendions à ce que les conditions d'expérimentations soient plus contraignantes sur les stades post-métamorphoses notamment à cause de la concentration en oxygène de l'eau ou de l'excrétion des déchets azotés des animaux. Sur une période de 24 heures, les conditions expérimentales atypiques par rapport aux conditions d'élevage habituelles n'ont pas affecté la survie des animaux en eau de mer. Par contre, le jeûne et la contrainte spatiale sont des conditions supplémentaires de stress qui affectent probablement les animaux de façon différente en fonction du stade de développement mais l'objectif de cette expérimentation était de révéler rapidement les différences de résistance relatives sur de courtes périodes. Dans le contexte de l'étude, la résistance à des variations rapides de la salinité est variable et dépend du stade de développement de l'animal. Les nauplius et zoé ont montré une meilleure tolérance au choc osmotique que les stades mysis. Cette baisse de la tolérance a été également observée au cours de l'ontogénèse chez d'autres crustacés décapodes tels que *Armases miersii* (Anger, 1996), *Penaeus japonicus* (Charmantier *et al.*, 1988b), *C. maenas* (Cieluch *et al.*, 2004) et *Cangron cangron* (Cieluch *et al.*, 2005). Cette sensibilité plus importante des mysis au stress pourrait être expliquée par des besoins énergétiques plus élevés qui sont la conséquence du passage du régime herbivore au régime carnivore, des changements anatomiques importants et la faible capacité des animaux à osmoréguler. Un facteur nutritionnel est également susceptible d'expliquer la meilleure résistance des stades nauplius comparée à celle des stades larvaires ultérieurs. Au sortir de l'œuf, la larve nauplius possède un vitellus provenant de l'alimentation

de la femelle avant la ponte. Ces réserves vitellines permettent au nauplius de muer et de passer les 6 stades nauplius sans alimentation exogène. Après 48 heures et lorsqu'elle atteint le stade zoé, un apport alimentaire devient indispensable pour permettre à la larve de continuer à grandir. L'apport énergétique par l'aliment est probablement déficitaire à partir de zoé dans les conditions de l'expérimentation et pourrait donc expliquer en partie les différences entre les stades larvaires. D'autre part, le stade nauplius est dépourvu de tube digestif contrairement aux stades larvaires plus avancés donc les surfaces de l'animal en contact avec le milieu extérieur sont réduites, ce qui pourrait limiter les échanges ioniques.

Dans une note concernant la biologie des pénéidés, Rothlisberg (1999) conclut que les salinités océaniques sont les seules permettant d'obtenir de bonnes survies et croissances de *P. merguensis*. Ce résultat est confirmé par Zacharia et Kakati (2004) qui observent que pour cette espèce, le meilleur développement est obtenu lorsque la salinité est comprise entre 30 et 35 ppt. Les études effectuées sur *L. stylirostris* montrent la préférence des géniteurs pour les salinités au-dessus de 35 ppt et que les meilleures survies au stade PL1 sont enregistrées lorsque la salinité est proche de celle de l'eau de mer (Marty-Ordonez, 1972). Ces observations sont confirmées dans notre étude où nous avons mis en évidence que les larves résistaient mieux à des salinités supérieures à 30 ppt.

Nous avons aussi observé qu'après le stade PL1, la tolérance aux basses salinités augmente alors que celle aux salinités élevées diminuent. Mair (1980) a étudié la préférence saline de quatre espèces de pénéidés dont *L. stylirostris* et montré qu'elles étaient plus attirées par les eaux de faible salinité. Dall (1981) note que les juvéniles de certaines espèces du genre *Penaeus* tolèrent mieux les faibles salinités que les adultes. Quant à *Litopenaeus vannamei*, une étude sur la tolérance à la salinité de P2 à P20 montre que l'animal accroît ses capacités à supporter des dessalures au fur et à mesure qu'il grandit (Aquacop *et al.*, 1991). Cette évolution de la tolérance à la salinité peut être reliée à l'évolution de la capacité osmorégulatrice de l'animal. Nous avons mesuré que la CO de la larve était faible et que l'animal était hyper-osmoconforme dans les premiers jours post-éclosion. Après la métamorphose, elle acquiert la capacité à hyper-hypo-osmoréguler de manière très progressive. La capacité à osmoréguler comparable à celle de l'adulte est atteinte à PL9. Tous les processus physiologiques semblent être efficaces à ce stade. Pour des salinités variant de 6 à 45 ppt, une PL9 parvient à maintenir l'osmolalité de son hémolymphe entre 550 et 800 mOsm.kg⁻¹ et le point iso-osmotique est proche de 720 mOsm.kg⁻¹. Cette valeur est légèrement plus basse que celle trouvée par Lemaire *et al.* (2002) et Wabete *et al.* (2006) sur la même espèce mais sur des stades juveniles plus avancées de 10 g à 28°C et des adultes de

40g à 26,7°C avec des points iso-osmotiques respectifs de 735 mOsm.kg⁻¹ et 756 mOsm.kg⁻¹. Toutefois, ces différences sont en accord avec les résultats obtenus par Lignot *et al.* (1999b) qui observent une augmentation de la pression osmotique de l'hémolymphe en parallèle à l'augmentation du poids de l'animal sur la même espèce.

L'immunolocalisation de la Na⁺K⁺-ATPase en utilisant des anticorps monoclonaux est aujourd'hui un outil souvent utilisé pour rechercher les sites de l'osmorégulation chez les crustacés adultes (Lignot *et al.*, 1999a; Barradas *et al.*, 1999, Flik et Haond, 2000), mais également chez les stades précoces (Lignot and Charmantier, 2001, Cieluch *et al.*, 2004; Cieluch *et al.*, 2005; Lignot *et al.*, 2005). L'identification de la sous-unité α de la NKA chez *L. stylirostris* avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 1$ de la NKA humain montre que le domaine cytosolique de cette sous-unité est très bien conservé dans le règne animal. Le poids moléculaire autour de 110 kDa est conforme à la taille de la plupart des sous-unité α chez d'autres espèces. Chez la crevette d'eau douce *Macrobrachium olfersii* (Mendoza *et al.*, 2007), les crabes *Callinectes danae* (Masui *et al.*, 2005) et *Callinectes sapidus* (Towle *et al.*, 2001), la sous-unité α de la NKA a une taille similaire, variant de 100 à 114 kDa.

Au stade zoé 2, seule la pleure a répondu positivement à l'immunolocalisation et elle est apparue comme le seul tissu de la cavité branchiale intervenant dans la régulation ionique à ce stade. L'immuno-réactivité des branchiostégites est parfois visible et limitée à certaines parties du branchiostégites aux stades mysis ; ce n'est qu'après la métamorphose que le branchiostégite est réellement immunofluorescent. L'apparition des épipodites à PL1 est accompagnée par une immunoréactivité évidente alors que les branchies ne montrent aucune activité de la NKA à leur apparition et chez des post-larves de 25 jours. Cette dernière observation est surprenante puisque nous avons vu dans le chapitre précédent que chez les juvéniles âgées de 34 jours, les branchies étaient fortement impliquées dans l'osmorégulation. Mais les observations de l'ultra-structure nous permettent d'affirmer que le tissu branchial n'est pas définitivement développé à cet âge et quelques jours supplémentaires sont nécessaires pour qu'apparaissent dans les branchies les sites spécialisés dans l'osmorégulation. L'abondance des ionocytes au niveau des épipodites confirment le rôle important de ce tissu dans la régulation par la Na⁺/K⁺-ATPase chez *L. stylirostris*.

En résumé, Au cours du développement post-embryonnaire de *L. stylirostris*, l'hyper-osmoconformité de la régulation est assurée par la pleure dans un premier temps au stade zoé et les branchiostégites au stade mysis puis de manière plus efficace après la métamorphose

avec l'acquisition de l'hyper-hyporégulation par le branchiostégite et les épipodites. Des observations similaires sur la localisation ont été reportées chez d'autres crustacés avec des différences dans la chronologie et la localisation des sites osmorégulateurs. Par exemple, chez *C. crangon* (Cieluch *et al.*, 2005), les branchiostegites participent aux échanges ioniques dès le stade zoé. Chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus* (Lignot *et al.*, 2005) qui est un hyper-osmorégulateur vivant en eau douce, les branchies sont déjà présentes chez l'embryon et sont les seuls tissus osmorégulateurs. Chez les crabes brachyours tels *C. maenas* (Cieluch *et al.*, 2004), les branchies antérieures ont principalement un rôle respiratoire alors que les branchies postérieures sont impliquées dans la régulation ionique. Finalement, c'est *Homarus gammarus* (Flik et Haond, 2000, Lignot et Charmantier, 2001) qui a des caractéristiques osmorégulatrices les plus proches de *L. stylirostris* au cours de l'ontogenèse; le branchiostégite et les épipodites sont aussi les principaux organes de l'osmorégulation et aucune immunofluorescence n'est détectée dans les branchies chez cette espèce. Cependant, les épipodites sont déjà présents chez l'embryon et ont un rôle effectif dès ce stade alors que chez les pénéidés, les épipodites ne sont visibles qu'après la métamorphose.

L. stylirostris est un hyperosmoconforme dans les premiers jours après l'éclosion. Après la métamorphose, la capacité à hyporéguler apparaît progressivement pour être semblable à celle de l'adulte à PL9. En conséquence, *L. stylirostris* fait partie du troisième modèle de capacité osmorégulatrice défini par Charmantier (1998). Beaucoup de crustacés décapodes appartiennent à ce groupe : *Macrobrachium petersi* (Read, 1984), *Homarus americanus* (Charmantier *et al.*, 1984; 1988b; 2009), *Homarus gammarus* (Thuet *et al.*, 1988), *Cancer irroratus* (Charmantier and Charmantier-Daures, 1991), *Penaeus chinensis* (Chen and Lin, 1994) *Neohelice granulata* (Castilho *et al.*, 2001), et *Crangon crangon* (Cieluch *et al.*, 2005).

IV.5 Conclusion

Nous avons montré qu'au moins 80% des larves et post-larves de *L. stylirostris* étaient capables de supporter des baisses de la salinité jusqu'à 25 ppt pendant 24 heures. Les stades mysis sont apparus les plus fragiles face au stress osmotique et les larves sont hyper-osmoconformes vis-à-vis du milieu extérieur. L'implication du nombre croissant de tissus dans la régulation ionique se traduit par une meilleure résistance aux variations de la salinité et la capacité à hyper-hypo-réguler est acquise progressivement après la métamorphose. Ces résultats sont en accord avec les observations sur l'écologie des crevettes pénéidés. Les géniteurs libèrent les larves en milieu océanique où la salinité est relativement constante et élevée, généralement de 35 ppt. Ces larves font partie de la biomasse planctonique et se

laissent porter au gré des courants. Durant cette période, la faible capacité à osmoréguler n'est pas un handicap pour l'animal. Après la métamorphose, les animaux se rapprochent des estuaires de manière active mais ces déplacements sont influencés par les conditions extrinsèques telles que les courants marins, la température ou la lumière mais aussi de facteurs intrinsèques comme la croissance (Calderon-Aguilera *et al.*, 2003). Avant de se réfugier près des côtes, l'animal doit avoir acquis une bonne capacité à osmoréguler en prévision des variations de salinité que peuvent subir les milieux côtiers.

De ces résultats, des applications pratiques en zootechnie peuvent être retirées. La salinité du milieu d'élevage devrait être adaptée au stade de développement de l'animal et se rapprocher de son point isoosmotique.

Chapitre V : Na⁺/K⁺ ATPase chez *Litopenaeus stylirostris* :

Expression de l'ARNm de la sous-unité α selon les tissus, le stade de développement et la salinité

V.1	Introduction	83
V.2	Matériels et méthodes	84
V.2.1	Recherche d'un gène candidat.....	84
V.2.1.1	Construction d'amorces	84
V.2.1.2	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc.....	84
V.2.1.3	Amplification par PCR.....	86
V.2.1.4	Purification des produits d'amplification, clonage et séquençage	87
V.2.1.5	Obtention de la séquence ADNc complète	87
V.2.1.6	Analyses de séquences	88
V.2.2	Etude du profil d'expression du gène candidat.....	88
V.2.2.1	Principe de la technique	88
V.2.2.2	Mise au point de la technique pour cette étude	90
V.2.2.3	Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase dans différents tissus	91
V.2.2.4	Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase en réponse à la salinité	92
V.2.2.5	Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase au cours du développement larvaire	92
V.2.3	Analyses statistiques	92
V.3	Résultats	93
V.3.1	Caractérisation du gène codant la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	93
V.3.2	Expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase en fonction du tissu.....	97
V.3.3	Expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase en fonction de la salinité.....	98
V.3.4	Expression de la sous-unité α de la Na ⁺ /K ⁺ ATPase au cours du développement larvaire .	101
V.4	Discussion	102
V.5	Conclusion	107

V.1 Introduction

La Na^+/K^+ ATPase, ou « pompe à sodium », est une enzyme localisée baso-latéralement dans la plupart des cellules épithéliales. Son activité permet le transfert de 3 ions Na^+ du cytosol vers l'hémolymphe en échange de 2 ions K^+ par l'hydrolyse d'un ATP. Cette catalyse établit également un gradient électrochimique qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement d'autres transporteurs d'ions tels que le NKCC ou le Na^+/H^+ . L'enzyme native se présente sous la forme d'un tétramère composé de deux sous-unités α de grande taille (entre 95-101 kDa) et de deux sous-unités β de plus petite taille (38-40 kDa). Chez les crustacés, cette enzyme est considérée comme la protéine primordiale dans les activités de l'osmorégulation. Divers biochimistes ont montré que l'activité spécifique de la NKA varie fortement chez plusieurs crabes euryhalins transférés de l'eau de mer vers des milieux dessalés (Péqueux, 1995 ; Castilho *et al.*, 2001 ; Lucu et Towle, 2003). Les travaux sur la régulation au niveau transcriptionnel sont plus rares et donnent des résultats parfois contradictoires. Le premier séquençage de la sous-unité α de la NKA a été effectué à partir de tissus rénal de mouton (Shull *et al.*, 1985, 1986). Depuis, la description du gène codant la NKA a été effectuée chez de nombreux animaux aquatiques et crustacés parmi lesquels les crabes *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001) et *C. granulatus* (Luquet *et al.*, 2005) ou encore la crevette *Machrobrachium amazonicum* (Faleiros *et al.*, 2010). L'osmorégulation est de plus en plus étudiée au niveau moléculaire. Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a toujours pas de données sur l'osmorégulation chez *L. stylirostris* et les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent peu connus. Nous avons donc développé dans ce chapitre une démarche visant à caractériser le gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase chez cette espèce. Par la suite, nous nous sommes attachés à :

- 1) déterminer le profil d'expression spatial du gène chez les juvéniles ;
- 2) mesurer l'influence de la salinité sur le nombre de transcrits codant pour la NKA chez *L. stylirostris* ;
- 3) évaluer l'expression de ce gène au cours du développement larvaire.

V.2 Matériels et méthodes

V.2.1 Recherche d'un gène candidat

Afin de caractériser un orthologue du gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase chez la crevette *L. stylirostris*, la recherche de ce candidat a été entreprise par la technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) à partir des séquences nucléotidiques des orthologues de la sous-unité α de NKA caractérisées chez d'autres invertébrés marins. Après avoir obtenu un fragment de l'ADNc (ADN complémentaire) du gène recherché, les extrémités 5' et 3' de la séquence ADNc ont été complétées en dessinant de nouvelles amorces spécifiques (Fig. V.1).

V.2.1.1 Construction d'amorces

Un couple d'amorces spécifiques localisées a été dessiné dans les zones les plus conservées des alignements de séquences nucléotidiques de la sous-unité α de NKA de la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* (numéro d'accèsion Genbank DQ399796.1), du homard américain *Homarus americanus* (AY140650.1) et de séquences partielles de ce gène (ou expressed sequence tags, EST) caractérisées chez la crevette à pattes blanches *L. vannamei* dans le cadre du projet Marine Genomics (<http://www.marinegenomics.org>) (numéros d'accèsion Marine Genomics : MGID368619 et MGID455880). Ces alignements de séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>). Les amorces dessinées ont été désignées A-120 (5'-ACCCACCCCAAGCAGACTC-3') et A-122 (5'TGTTGCGTGCACGCCAGCCC-3').

V.2.1.2 Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Les ARN totaux des échantillons de tissus de crevettes utilisés au cours de notre étude ont été extraits individuellement selon la procédure décrite dans le kit QIAGEN « Rneasy mini kit ». Au cours de cette procédure, les ARN ont été traités par une DNase (RNase-free DNase set, QIAGEN) suivant les recommandations du fournisseur, pendant 15 min à température ambiante, afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique contaminant. Après extraction, ils ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropND 1000 (NanoDrop Technologies) et du logiciel ND-1000 V3 3.7 par des mesures d'absorbance à 260 et 280 nm.

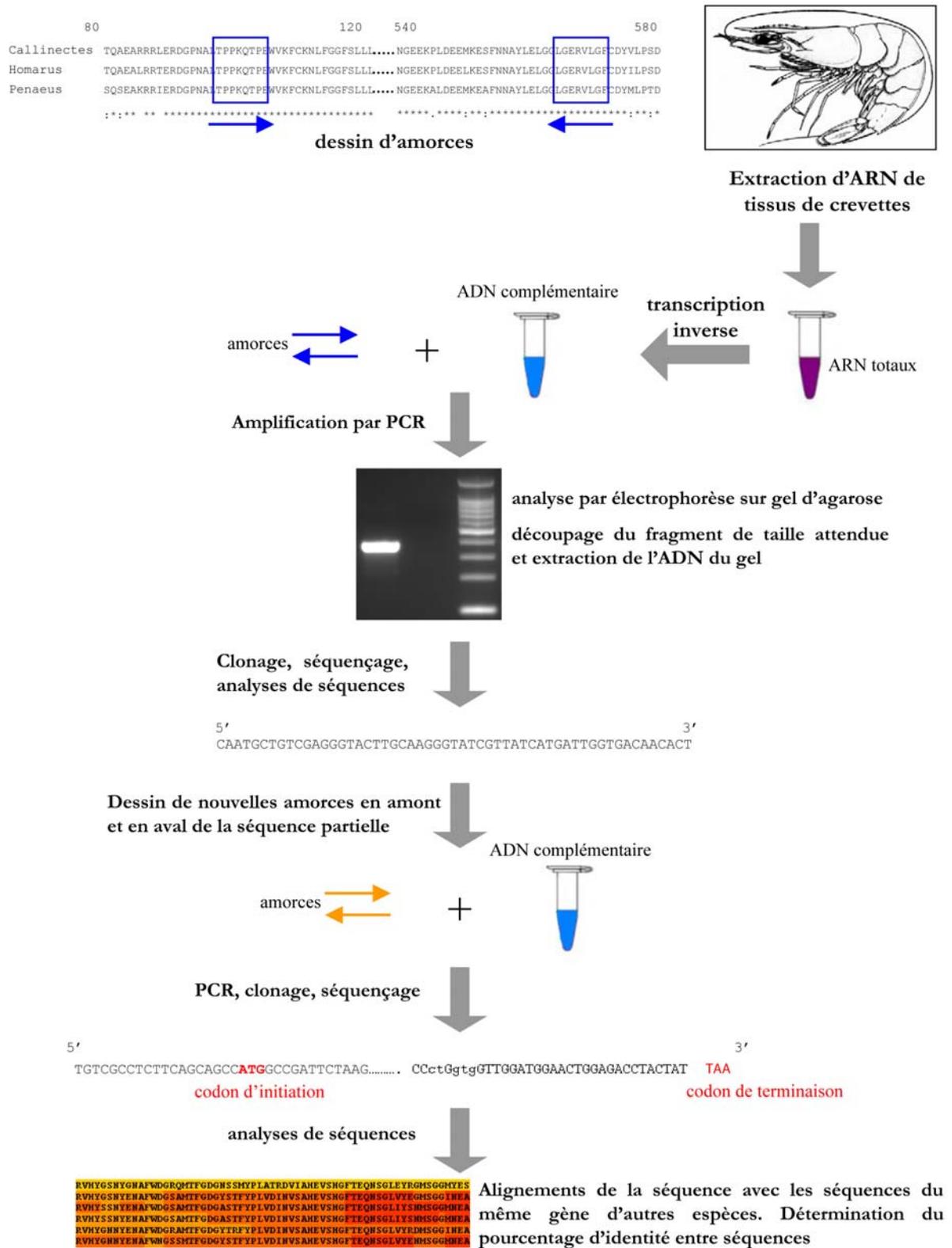


Figure V.1 : Principales étapes de la caractérisation d'un gène candidat

La concentration d'ARN en solution a été calculée en utilisant le facteur de conversion 1 unité $A_{260} = 40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'ARN. La pureté des échantillons d'ARN a été déterminée par le rapport : absorbance 260 nm / absorbance 280nm. Un ARN est considéré comme pur si le rapport A_{260}/A_{280} est proche de 2,1.

Après quantification, ces ARN totaux ont été soumis à une étape de transcription inverse, réaction enzymatique permettant la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) d'un ARN messenger (ARNm). Cette réaction se décompose en deux phases : une phase de synthèse de la séquence ADN complémentaire de la séquence ARN grâce à une enzyme virale reverse-transcriptase (2 heures à 42°C) et une phase d'inactivation de l'enzyme (70°C pendant 15 min). La transcription inverse a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp^R PCR system 9700 (Applied Biosystems) à partir d'une quantité de 200 ng d'ARN totaux de tissus de crevettes préalablement linéarisés par traitement thermique à 70°C pendant 5 minutes de façon à dénaturer les structures en tige-boucle. La composition du mélange réactionnel était la suivante : 1 X de tampon de réaction de l'enzyme, 1 mM final dNTPs, 200 unités de M-MLV reverse transcriptase (Promega) et 1 μM oligo(dT)₂₁-anchored primer dans un volume total de 20 μl .

V.2.1.3 Amplification par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une réaction d'amplification en chaîne de l'ADN permettant la synthèse de façon exponentielle d'une séquence d'ADN délimitée par les régions d'hybridation des amorces utilisées. L'amplification d'un fragment d'ADNc de l'orthologue du gène codant la sous-unité α de NKA a été réalisée à l'aide des amorces décrites dans le paragraphe 1.1, dans un volume de 20 μL d'un mélange réactionnel contenant 100 ng de matrice ADNc, 0.2 mM de dNTP, 1 X du tampon de réaction de la Taq polymerase, 1 unité d'enzyme Taq polymerase (Hot start Taq, QIAGEN) et 0,5 μM de chaque amorce. La réaction débute par une étape initiale de 15 min à 95°C (permettant l'activation de l'enzyme Hot start) suivie de 35 cycles de [30 s de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation des amorces à 55°C, 2 min d'élongation à 72°C] et une élongation finale de 10 min à 72°C. Le produit d'amplification a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% dans du TBE 1X (0,09 M Tris-acide borique, 2 mM EDTA pH 8.3) contenant un colorant (GelRedTM DNA stain) permettant la visualisation sous UV.

V.2.1.4 Purification des produits d'amplification, clonage et séquençage

Le produit d'amplification obtenu présentant la taille attendue (≈ 1180 paires de bases, pb) a ensuite été purifié, cloné puis séquencé pour déterminer s'il correspondait bien au gène candidat recherché.

A cette fin, l'amplicon a été découpé directement sur le gel à l'aide d'une lame de scalpel, puis extrait du gel d'agarose grâce au kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN) pour pouvoir être cloné. Le clonage consiste à introduire un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique qui est alors transféré dans une cellule bactérienne hôte. Le fragment d'ADN est alors reproduit en grande quantité lors de la croissance et multiplication bactérienne, et peut donc être isolé par lyse bactérienne puis digestion enzymatique du plasmide. Le clonage a été effectué à l'aide du TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen). Le principe de ce protocole repose sur une erreur de la Taq polymérase qui ajoute systématiquement lors de la réaction de PCR un dNTP de type adénine (A) aux extrémités 3' du brin néosynthétisé. Le vecteur utilisé (pCR®4-TOPO vector) possède quant à lui une thymine (T) au niveau du site d'insertion à ses extrémités 3', permettant une liaison entre ces deux bouts cohésifs. Elle est facilitée par l'action d'une topoisomérase qui assure la ligation des deux fragments d'ADN (insert et vecteur) à température ambiante. Les protocoles de clonage, de transformation, ainsi que de mise en culture des colonies bactériennes transformées sont ceux décrits par le fournisseur. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait à partir de 3 ml d'une culture liquide en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), qui repose sur une technique dérivée de la lyse alcaline. Un volume de 10 μ l de préparation plasmidique a été digéré par 1 unité/ μ l d'enzyme de restriction *Eco*RI (New England Biolabs) dans un volume réactionnel total de 20 μ l, pendant 1 heure à 37 °C. Cette digestion enzymatique permet de vérifier que l'insert d'ADN est présent. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %, puis les clones positifs ont été envoyés pour séquençage par un fournisseur de service (GATC Biotech).

V.2.1.5 Obtention de la séquence ADNc complète

Compte tenu des résultats d'analyses du fragment d'ADNc obtenu à l'issue de ces expérimentations et notamment des très forts taux d'identité relevés entre ce fragment et les séquences nucléotidiques (partielles ou complètes) du gène codant la sous-unité α de la NKA chez les crevettes pénéides *P. monodon* et *L. vannamei*, deux nouveaux couples d'amorces

spécifiques désignées A-119 (5'-TGTATCCTCTGCTGCCGTCCT-3') / A-129 (5'-GAGTCTGCTTGGGTGGGGT-3'), et A-130 (5'-GGGCTGGCGTGCACGCAACA-3') / A-132 (5'-TTAATAGTAGGTCTCCAGTTCCAT-3') ont été dessinés respectivement en amont du codon d'initiation et au niveau du codon de terminaison des gènes caractérisés chez ces deux espèces de pénéides. Les produits d'amplification obtenus par PCR à l'aide de ces couples d'amorces ont été clonés puis séquencés suivant les protocoles décrits dans le paragraphe V.2.1.4.

V.2.1.6 Analyses de séquences

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du programme BioEdit. La détermination du cadre ouvert de lecture a été réalisée à l'aide du logiciel ORF Finder, disponible sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Le logiciel Traduction Multiple d'Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) a permis d'effectuer la traduction en acides aminés des séquences. Afin de déterminer si l'ADNc isolé de *L. stylirostris* correspondait au gène codant la sous-unité α de la NKA, la séquence obtenue a été alignée avec les séquences de différentes espèces d'invertébrés et de vertébrés présentes en bases de données comme Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en utilisant les programmes BLASTn et BLASTx. Enfin, une analyse phylogénétique a été effectuée avec la séquence protéique déduite de l'ADNc isolé et différentes séquences protéiques de la sous-unité α de NKA à partir d'alignements réalisés grâce au programme ClustalW. Des arbres phylogénétiques de distance ont été construits avec le logiciel MEGA v5.0 (Tamura *et al.*, 2007) en utilisant les méthodes de "Neighbor joining" (Saitou et Nei 1987) et de maximum de vraisemblance ("maximum likelihood") (Felsenstein, 1985) afin de vérifier la cohérence des topologies d'arbres obtenues par ces différentes approches.

V.2.2 Etude du profil d'expression du gène candidat

V.2.2.1 Principe de la technique

La PCR en temps réel est une technique consistant à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle de PCR. Elle permet, par son principe, de quantifier un type d'ARNm (représenté par son ADNc) initialement présent dans un échantillon de manière relative (par rapport à un gène de référence non régulé) ou absolue (par la détermination en nombre de copies par rapport à un standard externe) (pour revue, voir Poitras et Houde, 2002). La

quantité de transcrits d'un gène déterminée par cette technique représente l'expression du gène, les transcrits en cours de synthèse, mais aussi les transcrits déjà formés et stockés dans les cellules. La détection de la quantité d'amplicons générés est assurée par des agents se liant à l'ADN double-brin, comme le SYBR Green que nous avons utilisé au cours de cette étude (Fig. V.2), ou par des sondes fluorescentes de type Taqman par exemple.

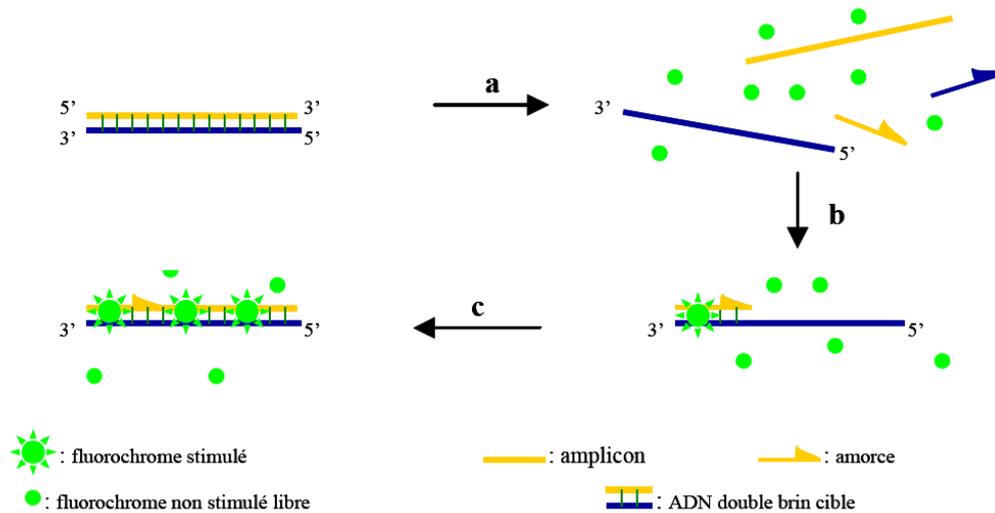


Figure V.2 : Mode d'action des fluorochromes de type SYBR Green lors de l'utilisation en PCR en temps réel (d'après Poitras et Houde, 2002). Lors de la dénaturation, le SYBR Green libre fluoresce peu (a). Au cours de l'appariement, des molécules se lient à l'ADN double-brin néosynthétisé provoquant l'émission de fluorescence (b). Pendant la phase de polymérisation (c), de plus en plus de molécules se lient au brin naissant, permettant le suivi de l'augmentation de la fluorescence en temps réel.

L'analyse de la quantité d'amplicons formés se fait pendant la phase exponentielle de la PCR (phase la plus reproductible de la réaction). Pendant cette étape, le nombre de copies d'amplicons observé est directement proportionnel au nombre initial de copies. Plus il y a de matrice au départ de la réaction et moins le nombre de cycles nécessaires pour entrer dans la phase exponentielle d'amplification est élevé. Le point où la fluorescence dépasse significativement le bruit de fond (où la phase exponentielle débute) est défini comme le cycle seuil ou Ct (Fig.V.3).

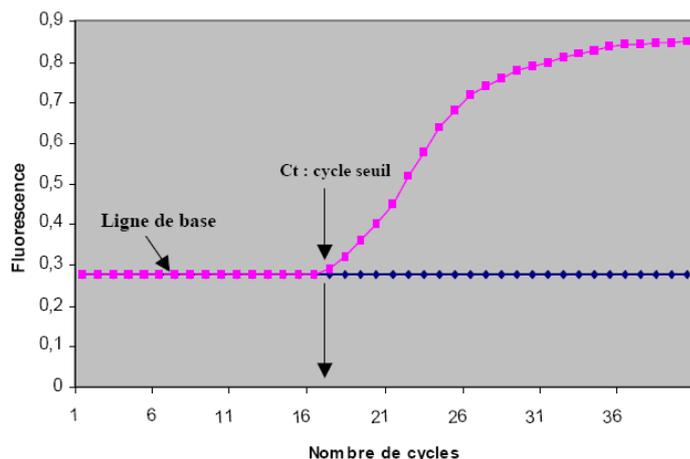


Figure V.3 : Représentation graphique de la PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de la fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

V.2.2.2 Mise au point de la technique pour cette étude

Les amorces utilisées pour amplifier, chez *L. stylirostris*, le gène codant la sous-unité α de la NKA et un gène de référence ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) et sont listées dans le tableau V.I.

Tableau V.1 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de gènes par PCR en temps réel

Gène cible	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')
<i>EF1</i>	A-52 (forward)	TGC TCA CAT TGC CTG CAA GT
<i>EF1</i>	A-53 (reverse)	CCT TAC CAG TAC GCC TGT CGA T
Na ⁺ /K ATPase ⁺	A-133 (forward)	TCC CAT CCT GAA ACG TGA AGT AA
Na ⁺ /K ATPase ⁺	A-134 (reverse)	CTA CAC ACT TCA GCA GAG CAG CTT

Pour chaque couple d'amorces testé, l'amplification d'une gamme de dilution d'un mélange d'ADNc a été réalisée pour déterminer l'efficacité (E) de la PCR ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$) et la dilution à laquelle travailler. La concentration de travail ne doit, en effet, être ni trop forte pour éviter l'inhibition de la réaction de PCR, ni trop faible pour ne pas être en dessous du seuil de détection. La gamme de dilution réalisée pour mesurer l'efficacité de PCR comportait les cinq points de dilution suivants : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. Comme gène de référence non régulé, nous avons sélectionné le gène codant le facteur d'élongation I (*EF1*) (numéro d'accension Genbank AY117542.1). Des mesures d'expression ont été préalablement réalisées sur différents échantillons afin d'évaluer la stabilité spatiale et temporelle de son expression. L'expression de ce gène n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons, les

tissus ou les stades de développement (ANOVA, $p > 0,05$). Par ailleurs, l'utilisation de *EFI* comme gène de référence chez *L. stylirostris* a déjà été validée par d'autres auteurs (De Lorgeril *et al.*, 2008).

Chaque réaction de Q-PCR a été réalisée en duplicat dans un volume final de 25 μ L comprenant 4 μ L d'ADNc (dilué au 1/4), 1 \times QuantiTect® SYBR Green PCR master mix (QIAGEN) et 300 nm de chaque amorce. L'amplification a été effectuée sur un appareil ABI 7500 system (Applied Biosystems)⁴. Celle-ci débute par une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes suivie de 40 cycles d'amplification, chaque cycle comprenant une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, une phase d'hybridation à 59°C pendant 30 secondes et enfin une phase d'élongation à 72°C pendant 32 secondes. Une étape de dissociation permet de vérifier la spécificité de la réaction pour chaque gène et l'absence de formation de dimères d'amorces. Chaque réaction de PCR incluait : 1) un échantillon contrôle commun à toutes les réactions et constitué par un mix d'ADNc de tissus de crevettes, 2) un contrôle négatif d'ARN totaux traités à la DNase I afin de détecter toute trace de contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique et 3) un blanc (eau) pour détecter les contaminations possibles du mélange réactionnel ou des amorces. L'expression relative du gène candidat a été déterminée selon la méthode décrite dans le kit QuantiTect® SYBR Green PCR master mix et normalisée par rapport au gène de référence, le Facteur d'Elongation (EF).

V.2.2.3 Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase dans différents tissus

Le profil d'expression spatial du gène candidat a été analysé sur différents tissus de crevettes adultes de 30g prélevées dans un bassin d'élevage de la station aquacole de Saint-Vincent. Cinq animaux ont été disséqués immédiatement après la pêche afin de prélever des tissus d'arthrobranchie 1, d'arthrobranchie 2 et de pleurobranchie de la 3^{ème} paire de périopodes, de pléopodes, d'hépatopancréas, de muscle, d'épipodites et de pédoncule oculaire. Après dissection, chaque pièce de tissus a été transférée individuellement en tube Eppendorf contenant 1 ml de RNA Later et stockée à -20°C avant extraction des ARN totaux.

⁴ Equipement positionné au sein du Plateau Technique Biologie Moléculaire de la Plateforme du Vivant de la Nouvelle-Calédonie (PFV NC), mutualisant les équipements techniques de pointe entre 5 établissements de recherche partenaires, présents en NC : Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC), Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC) et l'IFREMER.

V.2.2.4 Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase en réponse à la salinité

Cinq cents juvéniles de *L. stylirostris* de poids moyen 7,8 g ont été transférés d'un élevage en bassin de terre (33-37 ppt) dans 10 bacs de 300 litres remplis d'eau de mer (salinité comprise entre 35 et 37 ppt sur la durée de l'expérimentation). Après une stabulation de 7 jours, les animaux ont été répartis dans neuf aquariums de 30 litres à trois salinités différentes, en triplicat: 12 ppt, 26 ppt et 37 ppt. L'osmolarité des milieux a été vérifiée à l'aide d'un osmomètre Wescor® « Vapor Pressure » 5520. Cinquante animaux ont été stockés dans chaque aquarium. La température a été maintenue à 29°C et les animaux nourris quotidiennement à 3 % de la biomasse. Un renouvellement d'eau séquentiel de 50 % a été effectué tous les jours. La durée de l'expérimentation a été de 7 jours. Pendant ce laps de temps, la température et la salinité ont été vérifiées quotidiennement. A H6, J1 et J6, six animaux de chaque réplicat ont été prélevés pour les analyses suivantes :

- détermination du poids, du sexe et du stade d'intermue ;
- mesure de la pression osmotique de l'hémolymphe ;
- prélèvement des branchies et épipodites des animaux au stade C ou D0 puis conservées individuellement dans un tube Eppendorf contenant 1 ml de RNA Later et stockées à -20°C pour extraction ultérieure des ARN totaux.

V.2.2.5 Mesures d'expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase au cours du développement larvaire

Afin d'évaluer les niveaux d'expression du gène candidat lors du développement, différents stades larvaires, déterminés par observations à la loupe binoculaire, ont été échantillonnés dans les bacs d'élevage larvaire d'une même production (cf. IV.2.1, Chap. IV) : nauplii 24 h, stade zoé 2, stade mysis 2, et PL1. Les larves ont été récupérées sur tamis (maille de 150 μm pour les nauplius et les zoés 2 et maille de 335 μm pour les mysis 2 et PL1), rincées à l'eau distillée, séchées et transférées rapidement en tubes Eppendorf contenant 1 ml de RNA Later (Ambion) afin de stabiliser les ARN totaux avant leur extraction selon la procédure décrite précédemment.

V.2.3 Analyses statistiques

Les quantités de transcrits de la sous-unité α de NKA, mesurées par PCR en temps réel et rapportées aux quantités de transcrits *EFI*, ont été comparées par des analyses de variance

(ANOVA). Lorsque des différences significatives ($p < 0.05$) sont observées, un test de classement des moyennes *a posteriori* (test PLSD de Fisher) est effectué. Dans le cas d'une hétérogénéité des variances, les données sont analysées par un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis, au seuil de significativité de 5 %). Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview.

V.3 Résultats

V.3.1 Caractérisation du gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase

Un fragment d'ADNc d'une longueur de 1183 pb a pu être isolé et comparé à ceux d'autres espèces de la base de données Genbank ou sur le site de Marine Genomics (<http://www.marinegenomics.org>) à l'aide de l'algorithme BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Des taux d'identité de 98 % et 99 % ont été observés avec les gènes codant cette enzyme, respectivement chez *P. monodon* et *L. vannamei*. Ceci nous a permis de dessiner deux nouveaux couples d'amorces spécifiques à partir d'alignements des séquences nucléotidiques de ces deux espèces de crevettes afin d'obtenir les extrémités 5' et 3' de cet ADNc. Cette approche a permis d'isoler une séquence totale de 3092 pb, comprenant une phase de lecture ouverte (Open Reading Frame, ORF) de 3036 pb, un codon de terminaison (TAA) et une région non transcrite à l'extrémité 5' de 56 pb (Fig. V.4). Une séquence consensus de Kozak (5'-CAGCCATGG-3') (Kozak, 1991) a pu être mise en évidence au niveau du codon d'initiation putatif déterminé à l'aide du logiciel ORF Finder, supportant les résultats de l'analyse bioinformatique. La séquence protéique déduite comprend 1011 acides aminés, une masse moléculaire putative de 112,3 kDa et présente l'organisation caractéristique des sous-unités α de la NKA. En effet, l'analyse de la structure primaire de ce polypeptide à l'aide du logiciel TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) a permis de mettre en évidence 10 domaines transmembranaires. Par ailleurs, l'utilisation du logiciel Prosite a également révélé la présence d'un site de fixation à l'ATP ($\text{V}^{503}\text{MKGAPERIL}^{512}$) (Towle *et al.*, 2001) ainsi qu'un motif de phosphorylation conservé ($\text{D}^{364}\text{KTGTLT}^{370}$) (Kaplan, 2002).

1 TGTaTCCTCTGCTGCCGTCCTCCTGCTGAGCGCCGAGTGTGCGCTCTTTCAGCAGCCATGGCCGATTCTAAGAAAAAGCCC 80
 1 Y P L L P S S C * A P S V A S S A A M A D S K K K P 17
 81 CAGAAGGCTAAAGGGAAGAAGGGAGATAAGGATTTGAATGATCTGAAGCAGGAGTTGGAACTTGATGAGCACAAAGTCCC
 160
 18 Q K A K G K K G D K D L N D L K Q E L E L D E H K V P 44
 240
 161 AATTGAGGAACTCTTTCAACGTCTCACTGTTAACCCAGACACAGGTCTATCACAAAGTGAGGCTAAGCGCCGTATTGAAC
 240
 45 I E E L F Q R L T V N P D T G L S Q S E A K R R I E R 71
 241 GAGATGGGCCGAACGCTTTACCCACCCAAGCAGACTCCAGAATGGGTCAAGTTCTGCAAAAACCTCTTCGGTGGTTTC
 320
 72 D G P N A L I P P K Q T P E W V K F C K N L F G G F 97
 321 TCACTCCTGCTGTGGATTGGCGCTATCCTCTGCTTCATTGCCTACTCAATTGAGACAGCTGCAGAAGAGGAGCCCAACAA
 400
 98 S L L L W I G A I L C F I A Y S I E T A A E E E P N K
 124
 401 GGACAATTTGTACTGGGCATTGTGCTCACAGCTGTGCTGATCATCACAGGCGTCTTCTCATATTACCAAGAAAGCAAGA
 480
 125 D N L Y L G I V L T A V V I I T G V F S Y Y Q E S K S
 151
 481 GCTCCCATTATTATGGAATCTTTCAAGAACATGGTCCCTCAGTATGCTATTGTTCTTCGAGATGGCGAGAAGCAGAATGTT
 560
 152 S R I M E S F K N M V P Q Y A I V L R D G E K Q N V
 177
 561 CAGGCTGAGGAACTGTGCATAGGAGACATTGTAGAGGTCAAGTTGGTGATCGTATCCCAGCTGATATCCGTGTCATCGA
 640
 178 Q A E E L C I G D I V E V K F G D R I P A D I R V I E
 204
 641 AAGCAGGGGCTTCAAGGTTGACAACTCTCCCTGACTGGAGAATCCGAACCCAGAGCCGATCACCCGAATACACTTCCG
 720
 205 S R G F K V D N S S L T G E S E P Q S R S P E Y T S E
 231
 721 AGAACCCCTTGAGACCAAGAACTTGGCTTTCTTCTCCACCAATGCTGTGCGAGGGTACTTGCAAGGGTATCGTTATCATG
 800
 232 N P L E T K N L A F F S T N A V E G T C K G I V I M
 257
 801 ATGGTGACAACACTGTGATGGGTCGATTGCTGGTTTGGCATCCGGATTGGAACTGGTGAACCCCATTTGCCAAGGA
 880
 258 I G D N T V M G R I A G L A S G L E T G E T P I A K E
 284
 881 AATTACCATTTCATTACATCATTACTGGTGTGGCTGTGTTCTTGGGTGTGACCTTCTTCGTATTGCCTTTCATCCTTG
 960
 285 I T H F I H I I T G V A V F L G V T F F V I A F I L G
 311
 961 GGTACCATTGGTTGGATGCTGTGTGTTCTCATTGGTATCATTGTAGCCAATGTGCCTGAGGGTCTGCTAGCCACTGTC
 1040
 312 Y H W L D A V V F L I G I I V A N V P E G L L A T V
 337
 1041 ACTGTGTGCTTACTCTTACTGCCAAGCGCATGGCTGCCAAGAACTGCCTTGTAAAGAACTTGGAGGCTGTGGAACCCCT
 1120
 338 T V C L T L T A K R M A A K N C L V K N L E A V E T L
 364
 1121 GGGTTCCACTTCCACCATTGCTCTGATAAGACTGGTACCCTCACCCAGAATCGTATGACAGTAGCACATATGTGGTTCCG
 1200
 365 G S T S T I C S D K T G T L T Q N R M T V A H M W F D
 391
 1201 ACAATACCATTGAAGCTGATACATCTGAAGATCAGTCTGGCTGCCAGTATGACAAGACCTCACAAGGCTGGAAGGCT
 1280
 392 N T I I E A D T S E D Q S G C Q Y D K T S Q G W K A
 417
 1281 CTGTCTAGAATTGCTGCCCTCTGTAACCGTGCTGAATTCAAGACTGGTATGGAAAACACTCCCATCCTGAAACGTGAAGT
 1360
 418 L S R I A A L C N R A E F K T G M E N T P I L K R E V
 444
 1361 AAACGGCGATGCTTCTGAAGCTGCTCTGCTGAAGTGTGTAGAATTGGCTGTTGGTGATGTTAAGGGCTGGCGTGACGCA
 1440

471 445 N G D A S E A A L L K C V E L A V G D V K G W R A R N
1520 1441 ACAAGAAGGTATGTGAAATTCCTTTCAACTCCACCAAAGTACCAAGTATCCATCCACGAGACCGAGGATAAGAACGAC
497 472 K K V C E I P F N S T N K Y Q V S I H E T E D K N D
1600 1521 CCACGATACCTTGTGTGATGAAGGGAGCCCCTGAGAGGATCCTGGAACGTTGCTCCACCATCTACATCAATGGAGAGGA
524 498 P R Y L V Y M K G A P E R I L E R C S T I Y I N G E E
1680 1601 AAAGGCCCTCGACGAAGAAATGAAGGAAGCTTTCAACAATGCCTACCTTGAATTGGGCGGTCTTGGAGAGCGTGTACTTG
551 525 K A L D E E M K E A F N N A Y L E L G G L G E R V L G
1760 1681 GTTTCTGTGACTACATGCTGCCAACTGACAAGTACCCTCTTGGATACCCCTTCGATGCTGATGCTGTGAACTTCCTGTG
577 552 F C D Y M L P T D K Y P L G Y P F D A D A V N F P V
1840 1761 CATGGTCTGCGCTTCGTTGGTCTGATGTCCATGATTGATCCTCCTCGTGTCTGTACCCGATGCTGTAGCAAAGTGCAG
604 578 H G L R F V G L M S M I D P P R A A V P D A V A K C R
1920 1841 ATCTGCTGGTATCAAGGTTATCATGGTTACTGGTGTATCACCCATCACTGCCAAGGCTATTGCCAAGTCTGTAGGTATCA
631 605 S A G I K V I M V T G D H P I T A K A I A K S V G I I
2000 1921 TCTCTGAAGGAAACGAGACTGTTGAGGACATTGCACAGAGGTTGAACATTCCCATCAAGGAGGTCGACCCCACTGAAGCA
657 632 S E G N E T V E D I A Q R L N I P I K E V D P T E A
2080 2001 AAGGCTGCTGTAGTTCACGGTCTGAACTTCGTGACATGACATCCGAGCAGTTGGATGATGTCTCCTCCACCACACTGA
684 658 K A A V V H G S E L R D M T S E Q L D D V L L H H T E
2160 2081 AATCGTGTGTTGCCCGTACCTCCCCACAACAGAAGCTGATCATTGTAGAAGGTTGCCAGCGTATGGGTGCCATTGTGGCTG
711 685 I V F A R T S P Q Q K L I I V E G C Q R M G A I V A V
2240 2161 TAACTGGTGTGGTGTGAATGATTCTCCTGCTCTGAAGAAGGCTGATATTGGTGTGCTATGGGTATTGCTGGTCTTGAT
737 712 T G D G V N D S P A L K K A D I G V A M G I A G S D
2320 2241 GTGTCCAAGCAAGCTGCTGACATGATTCTGTTGGACGACAACCTTGGCTTCCATTGTCACCGGTGTTGAAGAGGGCAGACT
764 738 V S K Q A A D M I L L D D N F A S I V T G V E E G R L
2400 2321 TAATTTTCGACAACCTGAAGAAATCCATGCTTACACCCTGACATCTAACATCCCTGAAATCTCTCCCTTCTTGTCTTCA
791 765 I F D N L K K S I A Y T L T S N I P E I S P F L F F M
2480 2401 TGATTGCCTCAGTCCCCTTCTCTTGGAACTGTGACCATCCTCTGCATtGATCTGGGTACTGACATGGTGCCTGCCATT
817 792 I A S V P L P L G T V T I L C I D L G T D M V P A I
2560 2481 TCCCTTGCTATGAAGAAGCTGAGTCTGATATTATGAAGCGCCAGCCCCGAAACCCATTACCGACAAGCTTGTGAACGA
844 818 S L A Y E E A E S D I M K R Q P R N P F T D K L V N E
2640 2561 GAGGCTCATCTCAATGGCCTATGGTCAGATTGGTATGATCCAGGCCCTGGCAGGATTCTTACCTATTTTCGTGATCATGG
871 845 R L I S M A Y G O I G M I O A L A G F F T Y F V I M A
2720 2641 CTGAGAACGGCTTCTGCCACCCCATCTCTTTGGTCTCCGTGAGCGCTGGGACAGTAAGGCCATCAACGATCTGGAGGAT
897 872 E N G F L P P H L F G L R E R W D S K A I N D L E D
2800 2721 CACTATGGACAGGAATGGACCTTCCACGACCGTAAGATTCTTGAGTACACCTGCCACACTGCTTCTTACCTCCATTGT
924 898 H Y G Q E W T F H D R K I L E Y T C H T A F F T S I V

```

2801 GATTGTGCAGTGGGCCGATTTGATCATTGCAAGACCCGCCGTAACCTCCATTGTCCACCAGGGCATGAAGAAGTGGGTGC
2880
925 I V Q W A D L I I C K T R R N S I V H Q G M K N W V L
951
2881 TGAACCTTGGTCTCGTCTTTGAAACCACTTTGGCTGCCTTCCTTCTACACCCAGGCATGGACAAGGGTCTTCGCATG
2960
952 N F G L V F E T T L A A F L S Y T P G M D K G L R M
977
2961 TACCCACTGAAGTTCTATTGGTGGCTGCCTGCTCTTCCGTTCTCCATCCTTATCTTCATCTACGATGAGATACGTCGCTT
3040
978 Y P L K F Y W W L P A L P F S I L I F I Y D E I R R F
1004

3041 CATCCTGCGAAGGAACCTGGTGGTTGGATGGAAGTGGAGACCTACTATTAA 3092
1005 I L R R N P G G W M E L E T Y Y * 1020

```

Figure V.4 : Séquence nucléotidique et en acides aminés de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase caractérisée chez *L. stylirostris*. Les codons d'initiation et de terminaison sont indiqués en rouge. Les 10 domaines transmembranaires identifiés grâce au logiciel TMpred sont indiqués en bleu et surlignés. Le motif DKTGTLT, caractéristique des ATPases de type P, est signalé par une boîte jaune. Le site de fixation putatif à l'ATP (VMKGAPERIL) est signalé en orange et souligné. Les parenthèses rouges signalent le fragment d'ADNc initialement amplifié avant obtention de la séquence complète.

L'analyse des relations phylogénétiques entre les sous-unités α de la NKA de différents organismes montre l'existence de deux groupes distinguant organismes vertébrés et invertébrés (Fig. V.5). Au sein du groupe des invertébrés, l'arbre met en évidence par ailleurs l'existence de deux sous-groupes correspondant aux crustacés et aux insectes. La séquence en acides aminés déduite chez *L. stylirostris* est localisée au sein du cluster comportant les séquences des crustacés. La séquence a été déposée dans la base de données Genbank du NCBI sous le numéro d'accèsion **JN561324**.

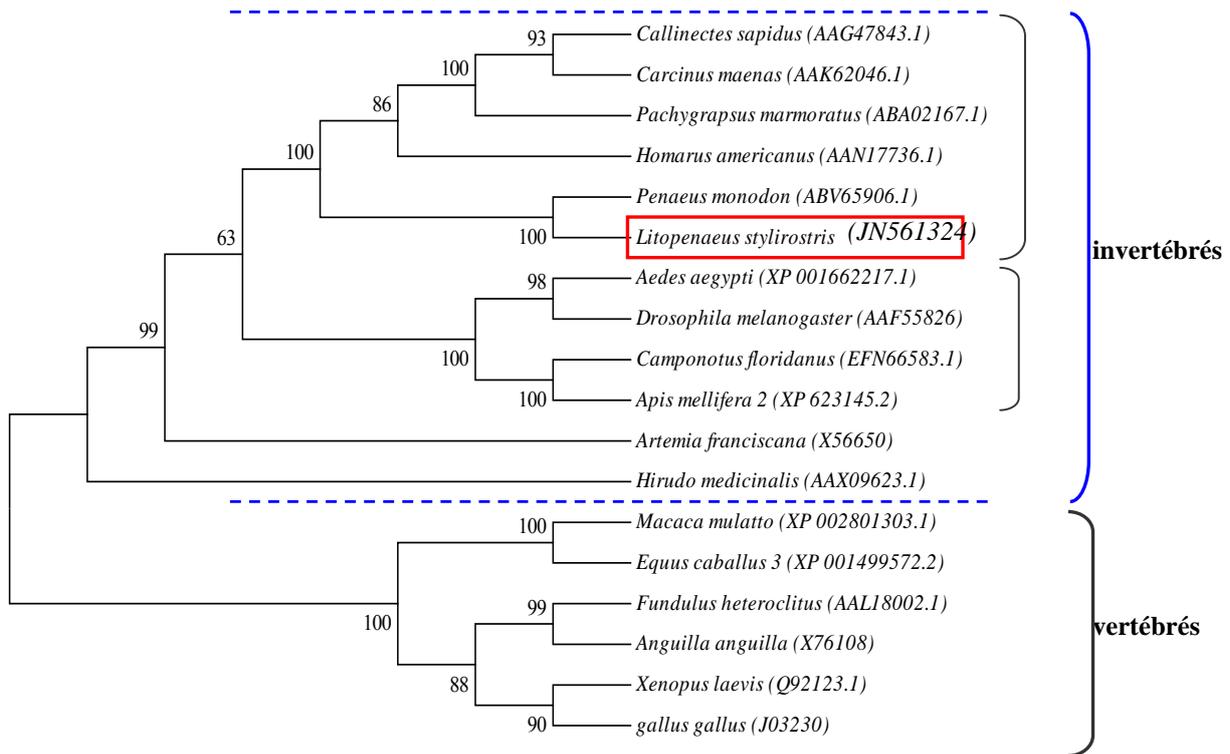


Figure V.5 : Représentation graphique de l'analyse phylogénétique des sous-unités α de la Na^+/K^+ ATPase. L'alignement des séquences a été réalisé avec Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) et l'arbre construit à l'aide du logiciel MEGA v5.0, selon la méthode dite de « Neighbor-Joining ». Les nombres à côté de chaque noeud représentent les valeurs de l'analyse des bootstraps en pourcentage (1000 répliquats). Les numéros d'accèsion Genbank pour les différentes séquences sont indiqués entre parenthèses.

V.3.2 Expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase en fonction du tissu

Le profil d'expression spatiale du gène codant la sous-unité α de la NKA a été analysé dans différents tissus de crevettes adultes par PCR en temps réel. Les résultats obtenus indiquent une expression ubiquitaire de ce gène dans l'ensemble des tissus testés (Fig. V.6). Les taux de transcrits les plus élevés sont mis en évidence dans l'épipodite, les arthrobranchies et les pleurobranchies. Viennent ensuite l'hépatopancréas et les pléopodes puis le pédoncule oculaire et le muscle où les taux sont de 2 à 3 fois significativement plus faibles que dans les premiers organes ($\alpha = 0,05$).

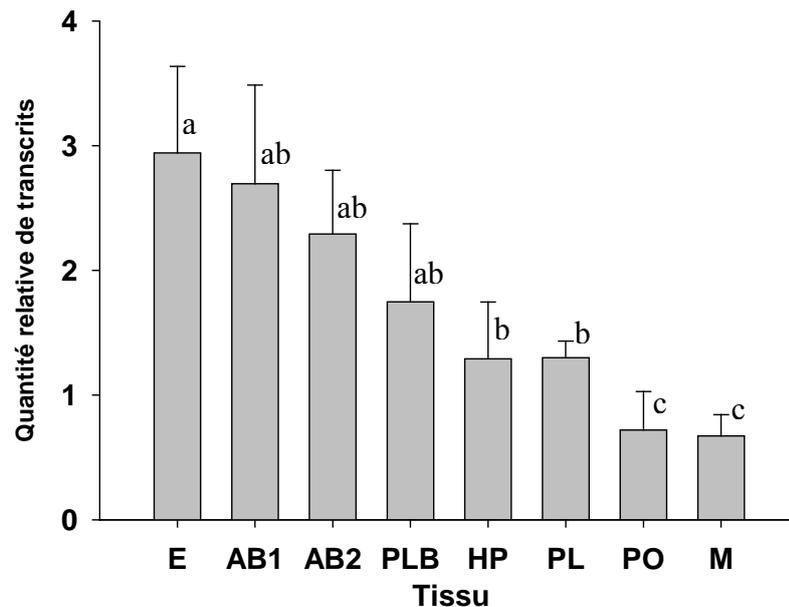


Figure V.6 : Niveaux de transcrits du gène codant la sous-unité α de de la Na^+/K^+ ATPase dans différents tissus de crevettes adultes *L. stylirostris* ($N=5$) élevées à 35 ppt. Les niveaux de transcrits indiqués sont déterminés relativement aux niveaux de transcrits du gène *EFI*, codant le facteur d'élongation I. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Les lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha=0,05$. E=Epipodite ; AB1=Arthrobranchie 1 ; AB2=Arthrobranchie 2 ; PLB= Pleurobranchie ; HP=Hépatopancréas ; PL= Pléopode ; PO=Pédoncule oculaire ; M=Muscle.

V.3.3 Expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase en fonction de la salinité

La figure V.7 indique l'évolution de la capacité osmorégulatrice (CO) de *L. stylirostris* en fonction de la salinité et du temps. A 37 ppt, l'animal est en état d'hypo- régulation 6 heures après le transfert avec une CO de $-272 \text{ mOsm.kg}^{-1}$. Le transfert en milieu déssalée, induit chez l'animal un passage rapide vers un état isoosmotique à 26 ppt (CO de -4 mOsm.kg^{-1}) ou vers l'état d'hyperrégulation à 12 ppt (CO de 263 mOsm.kg^{-1}) et ce, dans les premières heures d'acclimatation. Les valeurs de CO augmentent par la suite pour atteindre à J6, 324, - 43 et $-294 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ respectivement à 12, 26 et 37 ppt.

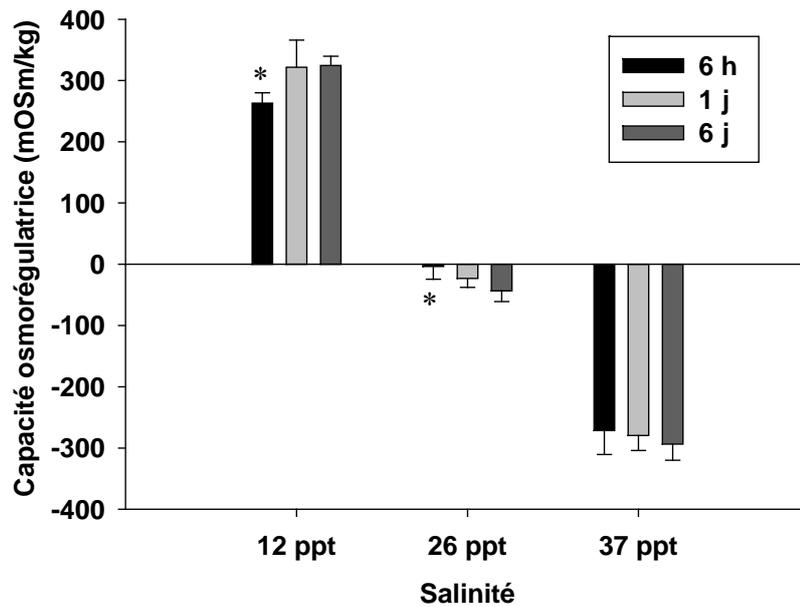


Figure V.7 : Evolution de la capacité osmorégulatrice chez les juvéniles de *L. stylirostris* (poids moyen = 7,8g) soumis à différentes conditions de salinité en fonction de la durée post-acclimatation à 29°C. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Une astérisque signifie une différence significative au seuil $\alpha = 0.05$

Sur la figure V.8, nous pouvons comparer la quantité de transcrits dans les épipodites en fonction de la salinité et dans le temps. Six heures après acclimatation, les animaux maintenus en milieu hypertonique (37 ppt) ont un taux de transcrit significativement plus élevé de 76% que les animaux transférés en milieu isotonique 26 ppt ($p=0,024$), alors qu'en milieu hypotonique (12 ppt), ce taux n'est que de 35 % supérieur sans être significativement différent. A 1 jour, la quantité de transcrits à 12 ppt et 37 ppt est respectivement de 71% et 32% supérieure à 26 ppt mais sans être significativement différent. Enfin, à 6 jours, c'est à 26 ppt que l'expression de la sous-unité α est la plus intense sans toutefois être significative, avec 33% et 16% de plus qu'à 12 et 37 ppt, respectivement.

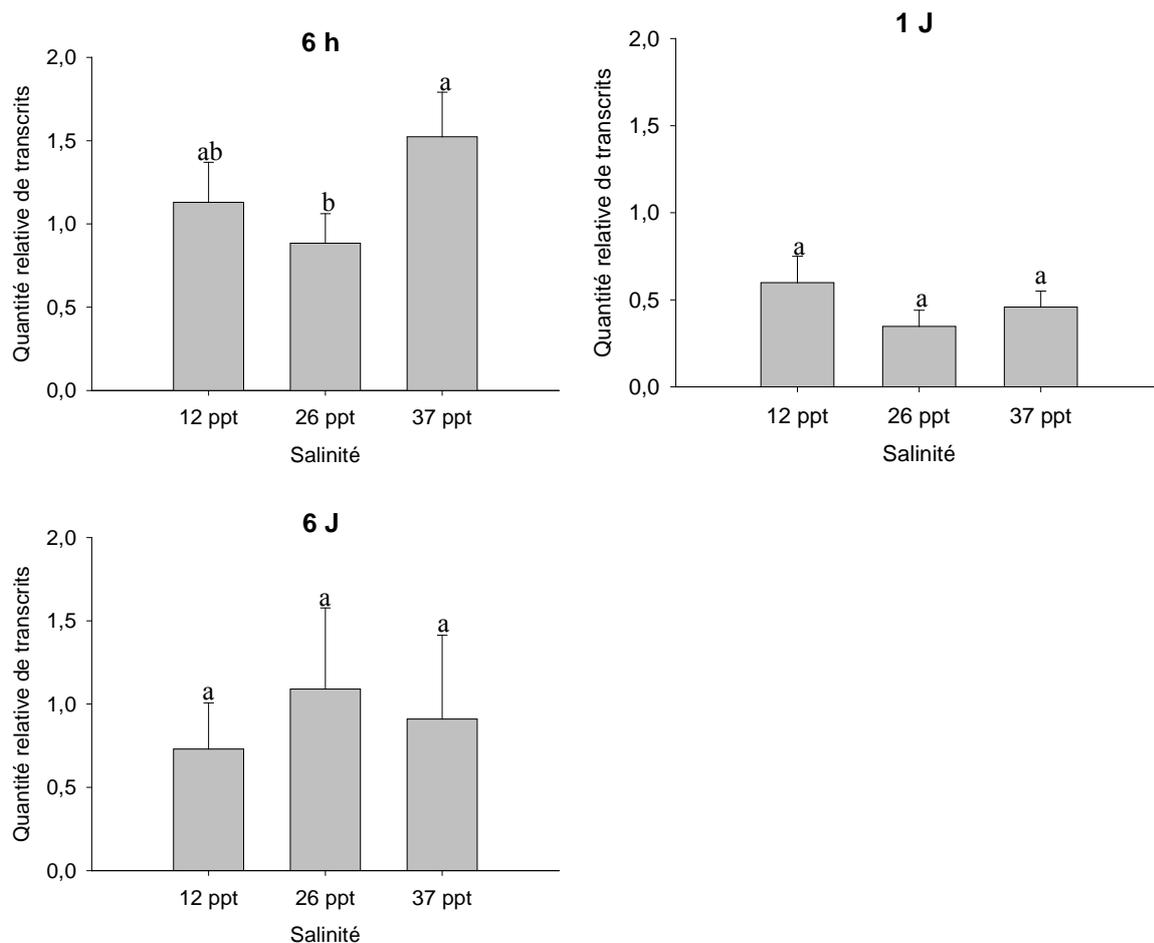


Figure V.8 : Niveaux de transcrits du gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase dans les épipodites de juvéniles de *L. stylirostris* (N entre 6 et 9) à 6 heures et 1 jour après le transfert de 37 ppt à la salinité indiquée en abscisse. Les niveaux de transcrits obtenus sont déterminés relativement aux niveaux de transcrits du gène *EFI*, codant le facteur d'élongation I. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Les lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha=0,05$.

Dans les branchies, le niveau relatif de transcrits dans les branchies six heures après le transfert, la quantité relative de transcrits est la plus élevée à la salinité de 12 ppt avec 25 % de plus qu'à 26 et 37 ppt où les taux sont relativement identiques (Fig. V.9). Un jour après le transfert, l'expression de la sous-unité α de la NKA est relativement identique à 12 et 26 ppt, tandis qu'à 37 ppt, elle est inférieure de 25% par rapport aux deux autres salinités. A 6 jours, c'est à 26 ppt que le taux de transcrits dans les branchies est le plus élevé avec une différence de l'ordre de 30% par rapport à 12 et 37 ppt. Cependant, aucune différence significative n'est mise en évidence ($\alpha = 0,05$).

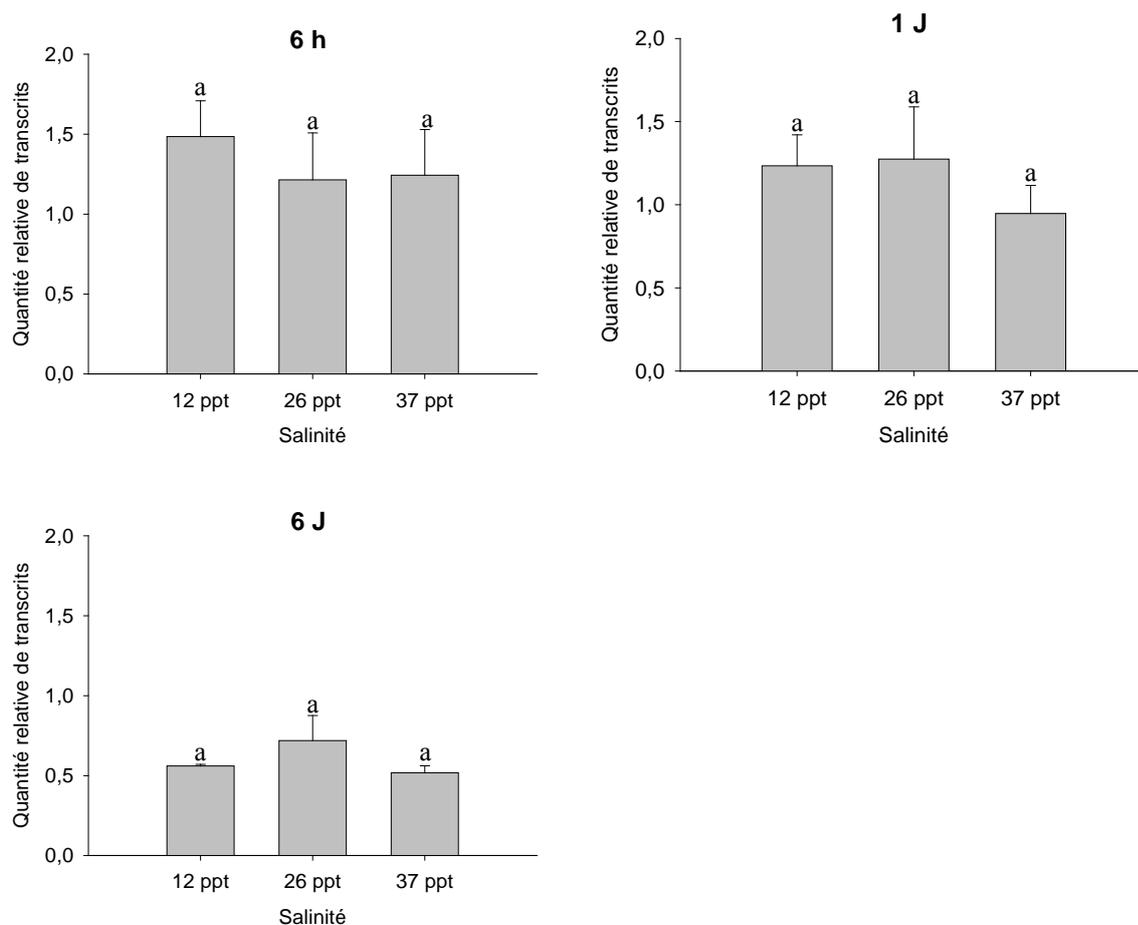


Figure V.9 : Niveaux de transcrits du gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase dans les branchies de juvéniles *L. stylirostris* (N entre 6 et 9) à 6 heures, 1 jour et 6 jours après le transfert de 37 ppt à la salinité indiquée en abscisse. Les niveaux de transcrits obtenus sont déterminés relativement aux niveaux de transcrits du gène *EFI*, codant le facteur d'élongation I. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Les lettres indiquent des différences significatives au seuil $\alpha=0,05$.

V.3.4 Expression de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase au cours du développement larvaire

Nous avons mesuré le niveau d'expression de ce gène au cours du développement larvaire, du stade nauplius à celui de post-larve (Fig. V.10). Les données obtenues par PCR en temps réel démontrent son expression pour tous les stades larvaires étudiés et cela dès le stade nauplius. Au stade zoé 2, le taux de transcrits est de 50 % inférieur à celui de nauplius puis il remonte progressivement aux stades mysis et PL1 pour atteindre 90 % de l'expression initiale. Cependant, les différences ne sont pas significatives dans les niveaux de transcrits de ce gène entre les différents stades analysés (ANOVA, $p > 0.05$).

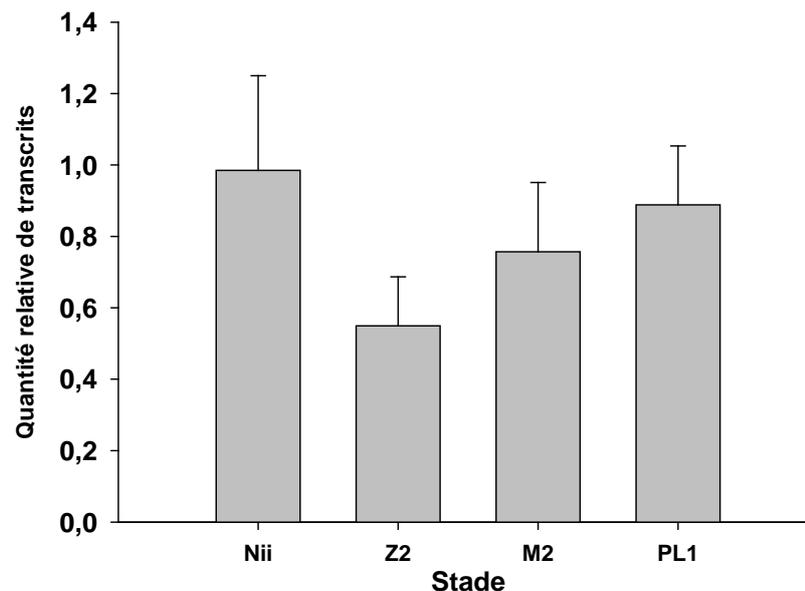


Figure V.10 : Niveaux de transcrits du gène codant la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase au cours du développement larvaire (du stade nauplius au stade post-larves PL1). Les niveaux de transcrits indiqués sont déterminés relativement aux niveaux de transcrits du gène *EFI*, codant le facteur d'élongation I. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Nii=Nauplius ; Z=Zoé ; M2=Mysis 2 ; PL1=Post-Larve 1. Les différences ne sont pas significatives au seuil $\alpha=0,05$.

V.4 Discussion

Lors de cette étude, nous avons entrepris la recherche d'un orthologue du gène codant la sous-unité α de la NKA chez la crevette *L. stylirostris* par la technique de RT-PCR. L'approche utilisée a permis de caractériser un ADNc de 3092 pb, dont la séquence protéique putative partage l'organisation et les caractéristiques structurales des sous-unités α de la NKA. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la présence de 10 domaines transmembranaires au sein de ce polypeptide, en accord avec les modèles topologiques décrits chez d'autres invertébrés comme le crabe marbré *P. marmoratus* (Jayasundara *et al.*, 2007). De plus, l'identification d'un site de fixation à l'ATP et d'un motif de phosphorylation conservé nous permettent de classer la protéine putative au sein de la famille des ATPases de type P. Les protéines de cette famille sont caractérisées par leur capacité à transporter des ions à travers la membrane en utilisant l'énergie de la dégradation d'un ATP. Nous avons pu observer que la séquence protéique déduite chez *L. stylirostris* présentait de très fortes identités avec les sous-unités α de la NKA de la crevette *P. monodon* (99%), des crabes *C. sapidus* (94%) et *P. marmoratus* (93%), ou encore du homard *H. americanus* (93%). L'ensemble de ces données nous permet par conséquent de conclure que la séquence ADNc isolée correspond bien à la séquence d'un

orthologue du gène codant la sous-unité α de la NKA chez *L. stylirostris*. Comme beaucoup d'autres protéines cellulaires, la NKA peut avoir plusieurs isoformes (Levenson, 1994). Ainsi quatre isoformes de la sous-unité α ont été caractérisées chez l'Homme (Blanco et Mercer, 1998), et trois isoformes chez la truite *Oncorhynchus mykiss* (Richards *et al.*, 2003). Chez *Artemia salina*, deux isoformes ont été décrites, présentant une distribution tissulaire spécifique (Peterson *et al.*, 1978 ; Cortas *et al.*, 1989). Chez le crabe *C. granulata*, la présence de plusieurs isoformes distinctes entre branchies antérieures et postérieures a été également suspectée en raison de mesures d'affinité de l'enzyme différentes entre ces tissus (Castilho *et al.*, 2001). Cependant, le clonage du gène de la NKA par Towle *et al.* (2001) chez une autre espèce de crabe *C. sapidus* n'a pas permis de valider cette hypothèse. De la même manière, aucune isoforme n'a pu être mise en évidence dans les quatre organes osmorégulateurs du crabe *Scylla paramamosain* (Chung et Lin, 2006). D'autres expérimentations sont nécessaires afin de déterminer l'existence ou non de différentes isoformes de cette enzyme chez *L. stylirostris*.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes attachés à investiguer l'implication de ce gène dans les processus d'osmorégulation. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude d'expression spatiale de ce gène dans différents tissus de crevettes adultes. Les données obtenues ont indiqué une expression ubiquitaire de la sous-unité α de la NKA, avec toutefois une abondance de transcrits significativement plus marquée dans les tissus suspectés d'intervenir dans l'osmorégulation. Ce résultat est en conformité avec nos observations immunohistochimiques, qui ont établi la présence de l'enzyme correspondante dans les tissus de la cavité branchiale, ainsi que dans l'hépatopancréas et la glande antennaire. Ce caractère ubiquitaire de la NAK, ou de ses transcrits, a été mis en évidence chez tous les métazoaires étudiés à ce jour, dont la crevette *Macrobrachium nipponense* (Wang *et al.*, 2003), et s'explique par le rôle joué par cette enzyme dans d'autres processus physiologiques tels que la régulation du volume cellulaire ou la réabsorption des ions calcium lors de l'ecdysie (Lucu et Towle, 2003).

Dans un second temps, nous avons étudié l'implication de ce gène dans les processus d'osmorégulation suite à des chocs osmotiques par des mesures de ses niveaux de transcrits dans les tissus où il est le plus fortement exprimé (branchies et épipodites). Nos données montrent des niveaux de transcrits significativement plus importants 6h post-transfert dans les épipodites des animaux maintenus à 37 ppt par rapport aux animaux en milieu isoosmotique, alors qu'aucune variation n'est observée dans le même temps dans les branchies. Ces résultats

vont dans le sens d'une implication prépondérante des épipodites dans l'osmorégulation et rejoignent 1) nos observations en immunohistochimie, mettant en évidence une présence plus abondante de la NKA dans ce tissu comparativement aux branchies et 2) notre analyse du profil d'expression spatiale de ce gène, indiquant des niveaux de transcrits sensiblement plus élevés dans les épipodites. Chez le crabe *C. granulatus*, Luquet *et al.* (2005) ont observé que la sous-unité α s'exprimait de manière plus intense dans les branchies postérieures, dévolues à l'osmorégulation, comparativement aux branchies antérieures, dont le rôle est essentiellement respiratoire. De la même manière, Chung et Lin (2006) ont montré chez *S. paramamosain* que les niveaux de transcrits de la NKA étaient supérieurs après transfert des animaux de 25 à 5 ppt uniquement dans les branchies postérieures et ne variaient pas de manière significative dans les branchies antérieures et la glande antennaire. Dans notre modèle *L. stylirostris*, on peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle les épipodites interviendraient en priorité dans les processus osmorégulateurs, jouant un rôle équivalent à celui des branchies postérieures des crabes brachyours, tandis que le tissu branchial présenterait un caractère plus multi-fonctionnel, intervenant à la fois sur le plan respiratoire mais aussi lors de l'osmorégulation.

Par ailleurs, nos résultats mettant en évidence une absence de variation des niveaux de transcrits de ce gène dans les branchies soulèvent plusieurs hypothèses quant au rôle de la NKA et à sa régulation chez *L. stylirostris*. La NKA est une enzyme décrite comme intervenant dans plusieurs processus physiologiques tels que la mue (Lucu et Towle, 2003), l'excrétion de l'ammoniaque (Weihrauch *et al.*, 2002) ou l'absorption du glucose par exemple. Compte tenu de ce caractère multi-fonctionnel, il est envisageable que la quantité basale d'enzyme pré-existante dans les tissus branchiaux soit suffisante pour permettre une réponse physiologique de l'animal au choc osmotique, ne nécessitant pas (au moins dans un premier temps) une synthèse protéique *de novo* et donc une augmentation des niveaux de transcrits du gène correspondant. Ainsi, Towle *et al.* (2001) n'observent pas de modifications significatives de l'abondance des transcrits de la sous-unité α de la NKA et de la teneur en protéine correspondante dans les branchies du crabe *C. sapidus* après transfert des animaux de 35 à 5 ppt. Chez la même espèce, Lovett *et al.* (2006) montrent également que le transfert de 32 à 10 ppt ne provoque pas d'augmentation de la quantité de transcrits de la NKA après 24h. Par contre, elle est multipliée par trois au bout de 10 jours avant de retrouver son niveau initial après 18 jours. Une observation similaire a été rapportée chez le crabe *S. paramamosain*, les auteurs de l'étude décrivant un délai de 7 jours entre l'augmentation des niveaux de transcrits et l'activité de NKA (Chung and Lin, 2006). Plusieurs auteurs suggèrent

que cette stabilité apparente de l'expression du gène codant la sous-unité α de la NKA plaide en faveur de mécanismes de régulation post-transcriptionnels de l'enzyme face aux changements de la salinité. Chez les mammifères, le contrôle de la NKA par des régulateurs endogènes (AMP cyclique, dopamine) ou encore par des hormones via les protéines kinases ou phosphatases a ainsi été montré (Therien and Blostein, 2000). Dans les branchies des crustacés, le rôle des neurohormones dans cette régulation a été suggéré dans plusieurs études (Sommer et Mantel, 1988 ; Bianchini and Gilles, 1990; Sommer et Mantel, 1991 ; Mo *et al.*, 1998 ; Lucu and Flik, 1999; Mo et Greenway, 2001 ; Mo *et al.*, 2003). Chez le crabe *P. marmoratus*, l'action de l'hormone hyperglycémique a ainsi été démontrée sur des branchies perfusées (Eckhardt *et al.*, 1995; Spanings-Pierrot *et al.*, 2000). Enfin, chez *L. vannamei*, l'injection d'amines biogéniques tels que la 5-hydroxytryptamine ou la dopamine entraîne une augmentation brutale du taux de transcrits branchial dans les 12 premières heures (Liu *et al.*, 2009).

Une seconde hypothèse repose sur l'existence de mécanismes de régulation ionique différents en fonction du tissu considéré. La stabilité des niveaux de transcrits de la NKA dans les branchies dans les premières heures pourrait être notamment liée à une activation prioritaire, dans un premier temps, d'autres transporteurs comme le Na^+/Ca^+ , le $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ ou le co-transporteur NKCC (Lucu et Towle, 2003). Cette idée est supportée par la détection en immunohistochimie de la forme sécrétrice du NKCC, le NKCC1, essentiellement dans les branchies (cf chapitre III).

Enfin, même si cela n'a pas été démontré à ce jour chez les crevettes pénéides, on ne peut exclure l'existence potentielle d'autres isoformes de cette enzyme chez *L. stylirostris*, intervenant préférentiellement dans les processus d'osmorégulation. Ainsi, chez le saumon *Salmo salar*, deux isoformes de la sous-unité α (désignées α_{1a} et α_{1b}) sont détectées dans les branchies. Les travaux de Madsen *et al.* (2009) ont montré que leurs niveaux d'expression variaient différemment après transfert des animaux de l'eau douce à l'eau salée (diminution de la quantité de transcrits de α_{1a} et augmentation des niveaux de transcrits de α_{1b}). Des observations similaires ont été rapportées chez d'autres espèces de poissons comme *O. mykiss* (Richards *et al.*, 2003).

Dans le chapitre IV, l'utilisation de marqueurs immunologiques de la NKA nous avait permis d'observer que les organes de la cavité branchiale participaient peu à peu à l'osmorégulation au cours de l'ontogenèse chez *L. stylirostris*. Il nous a donc semblé intéressant pour conclure

cette étude de vérifier si cette implication progressive coïncidait avec une variation de l'expression du gène. Pour cela, nous avons eu recours à des mesures des niveaux de transcrits de ce gène au cours du développement larvaire. Un des points cruciaux à la réalisation de telles études d'expression est de trouver un gène dont l'expression soit stable dans le temps afin qu'il puisse servir de gène de référence. Or, le développement larvaire se caractérise par des modifications métaboliques et physiologiques fréquentes et il est plus délicat de trouver un gène s'exprimant de façon stable dans ces conditions. C'est pourquoi peu de données concernant les niveaux de transcrits de la sous-unité α de la NKA au cours de l'ontogénèse sont disponibles chez les crustacés. Le facteur d'élongation EF1 caractérisé chez *L. stylirostris* remplit ce critère de stabilité, comme l'ont démontré nos analyses statistiques, et a donc pu être utilisé comme gène de référence. Chez l'écrevisse *A. leptodactylus*, les auteurs ont testé le facteur d'élongation EF2 mais n'ont pu le retenir comme gène de référence car les variations mesurées étaient de l'ordre d'un facteur 10 (Serrano *et al.*, 2007). En utilisant un autre gène de ménage (comme celui codant la β -actine), les auteurs ont observé, en concordance avec nos résultats, que la sous-unité α de la NKA s'exprimait dès le stade métanauplius et que deux pics étaient visibles au cours de l'embryogénèse. Chez *L. stylirostris*, nous n'avons pas observé de différences significatives dans les niveaux d'expression de ce gène entre les différents stades. Cependant, l'utilisation d'un marqueur immunologique spécifique de la NKA nous avait permis d'établir qualitativement une présence croissante de l'enzyme au cours de l'ontogénèse (cf chapitre IV). Cette différence des résultats entre approches moléculaires et immunologiques peut avoir plusieurs origines. Premièrement, la quantification des transcrits est effectuée sur des animaux entiers chez les larves en raison de leur taille et donc nos mesures tiennent compte à la fois de l'expression de la sous-unité α de la NKA des organes non osmorégulateurs (comme l'hépatopancréas) mais également des organes osmorégulateurs situés hors de la cavité branchiale, comme la glande antennaire. Or Khodabandeh *et al.* (2005) observent que chez *A. leptodactylus*, l'immunofluorescence de la NKA s'intensifie et s'élargit dans la glande antennaire au cours du développement embryonnaire. Dès lors, les différences qualitatives observées en immunohistochimie ont pu être masquées lors des mesures des niveaux de transcrits. Deuxièmement, la larve est hyperosmoconforme entre zoé et PL1 et l'activité osmorégulatrice est limitée dans les premiers jours de sa vie (cf chapitre IV) ; les seuls tissus osmorégulateurs de la cavité branchiale au stade larvaire sont la pleure et le branchiostégite ; les épipodites et les branchies, qui sont les principaux organes de l'osmorégulation chez les juvéniles et

adultes, sont absents chez la larve et n'apparaissent que sous forme de bourgeons à PL1. Ces données pourraient expliquer les faibles variations observées du taux de transcrits.

V.5 Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser pour la première fois chez l'espèce *L. stylirostris* le gène codant la NKA et d'étudier son expression spatio-temporelle. L'ensemble des données établit sa présence préférentiellement dans les organes osmorégulateurs et notamment dans les épipodites, dont le rôle pourrait être plus spécialisé dans ce processus par rapport aux branchies. De futures expérimentations incluant l'ablation des épipodites devraient nous permettre de confirmer cette hypothèse. L'induction de chocs osmotiques ne nous a pas permis lors de cette étude d'observer de variations significatives des niveaux de transcrits dans les branchies. Cependant, il a été suspecté chez d'autres organismes l'existence de mécanismes de régulation à court terme, s'opérant via la modification de la cinétique enzymatique de la NKA, et/ou la translocation de la protéine entre la membrane cellulaire et les lieux de stockage et/ou l'activation d'autres transporteurs. Il serait également intéressant de vérifier si une régulation à long terme mettant une synthèse *de novo* de l'enzyme intervient chez *L. stylirostris*. De nouvelles études moléculaires dans les mêmes conditions, mais sur une durée plus longue et associée à des mesures d'activité spécifique de l'enzyme devront être conduites pour vérifier cette hypothèse.

Chapitre VI : Salinité et confort physiologique : Application pratique en élevage larvaire

VI.1	Introduction	109
VI.2	Matériels et méthodes	109
VI.2.1	Elevage larvaire	109
VI.2.2	Influence de la salinité en élevage en phase larvaire.	111
VI.2.3	Influence de la salinité en élevage en phase post-larvaire.....	111
VI.2.3.1	Phase P1 à P10.	112
VI.2.3.2	Application des conditions de salinité isotonique pendant la phase post-larvaire et la phase d'acclimatation ou « Nurserie »	112
VI.2.4	Analyses statistiques	113
VI.3	Résultats	115
VI.3.1	Influence de la salinité en élevage entre le stade nauplius (Nii) et post-larve.....	115
VI.3.2	Influence de la salinité sur le développement des PL en élevage.....	116
VI.3.3	Phase post-larvaire en condition isotonique	118
VI.4	Discussion	120
VI.5	Conclusion	122

VI.1 Introduction

L'influence de la salinité du milieu sur la physiologie de l'animal est couramment étudiée en aquaculture. En effet, les milieux hypertoniques ou hypotoniques sont considérés comme un facteur de stress au même titre qu'un déficit en oxygène ou une température inadéquate en élevage. Des différences de survie, de croissance, de nutrition ou de métabolisme sont observées chez les crustacés soumis à des variations salines (Jury *et al.*, 1994; Sang et Fotedar, 2004; Romano et Zeng, 2006; Ye *et al.*, 2009; Zang *et al.*, 2009). La capacité d'un animal à survivre à un stress salin dépend non seulement de l'espèce, du stade de mue, de l'état nutritionnel mais également de son stade de développement. Ainsi, Ismael et Moreira (1997) montrent que chez *M. acanthurus*, l'adulte vit en eau douce malgré un point isoosmotique à 22,4 ppt, mais que les larves ne supportent pas les salinités proches de 0. Les meilleures survies en élevage larvaire pour cette espèce sont obtenues lorsque la salinité du milieu se situe entre 14 et 21 ppt. L'acquisition de la connaissance sur la régulation hydro-minérale au cours de l'ontogenèse est une nécessité qui déterminent les conditions de confort physiologique à différents stades de développement de l'animal.

Lors des travaux présentés précédemment, nous avons montré que les jeunes stades de *L. stylirostris* étaient hyper-osmoconformes et avaient une tolérance faible aux basses salinités. Après la métamorphose, la résistance s'améliore et la capacité à hyper-réguler dans les basses salinités et hypo-réguler dans les salinités élevées est acquise progressivement durant la phase post-larvaire et le point iso-osmotique de l'animal se situe autour de 25 ppt. L'objectif des tests menés ci-après était donc de vérifier si les conditions salines d'élevage pouvaient être adaptées aux différents stades de développement de *L. stylirostris* et d'en déterminer les incidences sur les paramètres zootechniques d'élevage.

VI.2 Matériels et méthodes

VI.2.1 Elevage larvaire

Cette étude a été menée dans l'Écloserie expérimentale de la station de Saint-Vincent, dans les conditions standards de production d'écloserie. Quatre séries de tests ont été réalisées en bacs de 80 à 150 litres de forme cylindro-conique, en polyéthylène noir (Fig. VI.1). Les enceintes et tous leurs accessoires (tuyau central, thermoplongeur, sonde de température, tuyau de bullage) ont été savonnés au savon de Marseille puis rincés abondamment à l'eau douce avant toute utilisation.



Figure VI.1 : Bacs cylindro-conique d'élevage larvaire en « petits » volume de 100 litres de l'Écloserie expérimentale de Saint-Vincent (station Ifemer NC)

Pour chaque expérimentation, les nauplius issus des pontes d'une même journée ont été regroupés dans un seau de 10 litres et le nombre total de larves a été estimé à partir de 5 prélèvements de 1 ml. Le nombre nécessaire pour chaque bac a été réparti de façon volumétrique. La température d'élevage a été maintenue entre 29 et 30°C à l'aide de thermo-plongeurs individuels.

Les élevages ont été menés selon le « protocole Ifremer » (cf. Chap. IV, §IV.2.1), avec respect des traitements antibiotiques (2,5 ppm d'érythromycine CDD 75% à J3, J5, J7 et J9) et des changements d'eau de 50% à J9, J11 et tous les jours de J13 à J20.

Les paramètres suivants ont été contrôlés quotidiennement :

- la température et la salinité à 7h30 et uniquement la température à 15h30 avec un thermomètre-salinomètre WTW cond 315 i ;
- la survie entre 8h et 10h par trois à cinq comptages volumétriques de 100 ml ;
- le développement et l'état des animaux entre 8h et 10h sur une vingtaine d'individus.

L'eau de mer utilisée était celle pompée dans la baie au moment du remplissage de la réserve de l'écloserie. En fonction du mois de l'année, la salinité de l'eau de mer de la baie de Saint-Vincent a fluctué entre 30 et 37 ppt. Les différentes salinités testées ont été obtenues par dilution de l'eau de mer avec de l'eau douce ou par adjonction de sels de mer (Sera). La préparation de l'eau dessalée est effectuée 48 heures avant son utilisation dans des bacs de 2m³ équipés d'un fort bullage pour éliminer le chlore apporté par l'eau douce du réseau.

Au dernier jour de l'expérimentation, les bacs ont été vidangés. Les animaux récupérés sur maille ont été remis dans un seau de 10 litres et la survie finale est évaluée par comptage de 4 échantillons de 100 ml.

La croissance finale a été quantifiée de différentes manières :

- par un indice de développement (ID) jusqu'à la métamorphose en post-larve, calculé à partir de l'indice de stage selon Villegas et Kanazawa (1980). Une note de 0 pour le stade nauplius, 1 pour le stade zoé 1 et ainsi de suite jusqu'à 7 pour le stade PL1 - est attribuée et pondérée par le pourcentage de larves au stade considéré;
- par la détermination du pourcentage de chaque formule rostrale sur les stades post-larvaires ;
- par le poids sec individuel des post-larves. Trois échantillons de 25 à 30 PL sont prélevés dans chaque réplicat. Les PL sont rincées à l'eau distillée sur un filtre muni d'une pompe à vide et mises à sécher à l'étuve à 60°C pendant 24 heures. Le poids sec individuel est ainsi déterminé par une moyenne des pesées des 3 échantillons ramenées au nombre de PL par échantillon.

VI.2.2 Influence de la salinité en élevage en phase larvaire.

Le premier essai a consisté à déterminer, en se basant sur la tolérance des larves aux chocs de salinité (cf. Chap. IV), la gamme de salinité adéquate pour le démarrage de l'élevage larvaire. Six salinités ont donc été testées : 20, 25, 28, 31, 35, 39 ppt. Six bacs remplis avec 80 litres d'eau de mer à chaque salinité (1 réplicat par traitement) ont étéensemencés avec 13 300 nauplii/ bac (soit une densité initiale de 167nii/litre). L'élevage a été mené dans les conditions standards de protocole pendant 8 jours (J0 à J7). Aucun changement d'eau n'a donc été réalisé. L'influence de la salinité a été évaluée sur la survie et l'indice de développement.

Les résultats de l'expérimentation précédente ont permis de resserrer la gamme de salinité et de tester ensuite trois salinités (28, 30 et 35 ppt), en duplicat dès le stade nauplius.

Six bacs de 150 litres remplis d'eau de mer ajustée aux salinités étudiées, ont étéensemencés avec 25 000 nauplii chacun soit à une densité initiale de 168 larves par litre. L'élevage a été mené dans les conditions standards de protocole pendant 15 jours. Les trois salinités testées ont été maintenues jusqu'à J9 puis des changements d'eau (50% du volume) ont été réalisés (J9, J11, J13, J14) avec de l'eau de mer dont la salinité a varié entre 30,5 et 31,5 ppt.

VI.2.3 Influence de la salinité en élevage en phase post-larvaire.

Deux séries d'expérimentation ont été menées afin de déterminer la salinité optimale, en terme de survie et développement chez les stades post-larvaires lors des deux étapes d'élevage précédant l'ensemencement en bassin.

VI.2.3.1 Phase P1 à P10.

Dans la première expérimentation, la première phase d'élevage correspondant aux 10 jours (J0 à J9) précédant la métamorphose en PL a été menée à deux salinités, 30 et 35 ppt, à raison de 12 réplifications par traitement. Lors de la deuxième phase de l'élevage, de J9 à J20, 4 salinités ont ensuite été testées en triplicat : 24, 27, 30 et 35 ppt. Le changement de salinité a été réalisé progressivement au moment des renouvellements d'eau (à J9, J11, J13 et les jours suivants) avec de l'eau de mer diluée. L'expérimentation est schématisée dans le diagramme ci-dessous (fig. VI.2).

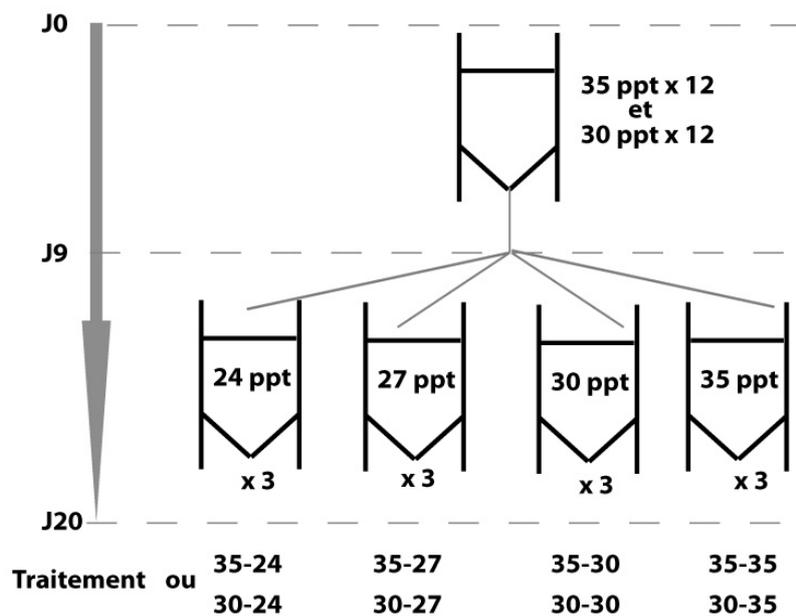


Figure VI.2 : Schéma expérimental du premier test de salinité pendant la phase post-larvaire.

Suite à des mortalités observées sur les élevages à 30 ppt, seuls les traitements suivants ont été menés à terme : "35-24", "35-27", "35-30" et "35-35".

VI.2.3.2 Application des conditions de salinité isotonique pendant la phase post-larvaire et la phase d'acclimatation ou « Nurserie »

Les résultats des expérimentations précédentes ont conduit à tester à partir de la phase post-larvaire un élevage en milieu isotonique (27 ppt). Pour cela, comme précédemment 6 bacs ont étéensemencés avec des nauplii (densité = 180 larves par litre) qui ont été élevés jusqu'à la métamorphose dans les conditions standards (salinité = 35,4 ppt durant ce test). A partir de J9, la salinité de 3 bacs est progressivement abaissée à 27 ppt à la faveur des renouvellements d'eau qui ont été réalisés avec de l'eau de mer diluée à 27 ppt. L'eau des bacs maintenue à 35

ppt est quant à elle renouvelée avec de l'eau de mer à 35 ppt. Pour cette deuxième phase, les élevages ont été menés jusqu'au stade P10 (J19).

A J19, les post-larves ont été pêchées, comptées et les animaux de trois des 4 réplifications de chaque traitement ont été répartis à raison de 3000 PL dans 9 bacs de 150L (soit 20 PL/litre) pour une 3^{ème} phase d'élevage correspondant à la phase de 12 jours d'acclimatation (plus communément appelée « Nurserie »). Les animaux élevés à 27 ppt ont été transférés dans un milieu à la même salinité alors que les animaux élevés à 35 ppt ont été répartis en deux groupes ; l'un subissant un transfert direct à 27 ppt, et l'autre un transfert à 35 ppt. (Fig. VI.3).

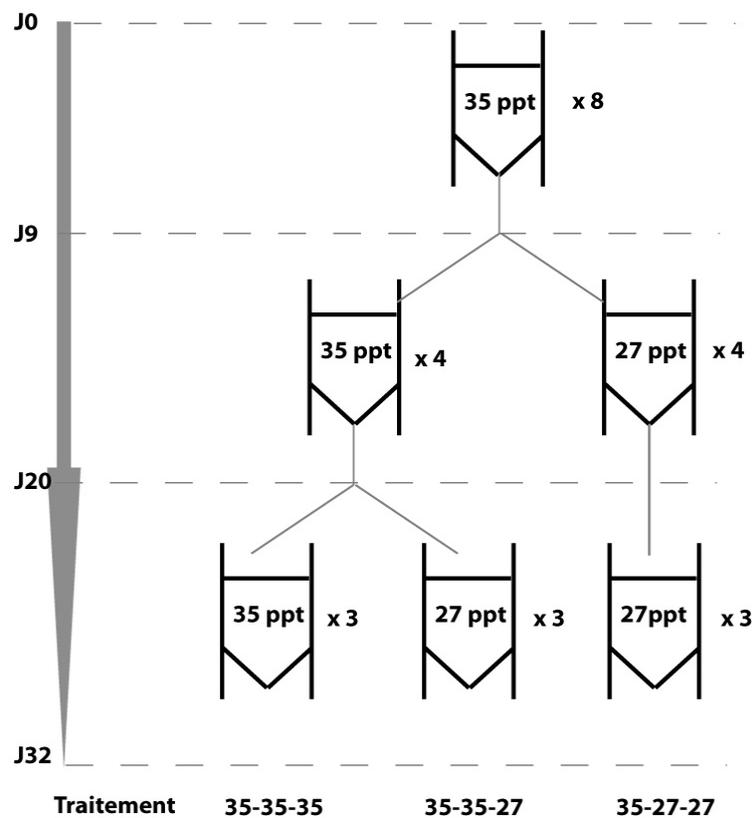


Figure VI.3 : Schéma expérimental du testage de la dessalure à partir du stade post-larve (J9).

A J32, la survie et le poids sec des animaux ont été déterminés pour chaque traitement.

VI.2.4 Analyses statistiques

Lors des expérimentations contenant des traitements effectués en triplicats, les comparaisons statistiques des résultats sont effectuées en utilisant l'analyse de la variance à une voie avec le logiciel Statview. Les données en pourcentages ont subi au préalable la transformation $\arcsin(\sqrt{\cdot})$. Le PLSD de Fisher a ensuite été appliqué pour détecter les différences entre le

traitements au seuil de 5%. Pour les autres paramètres (croissance, indice de développement), le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été appliqué.

VI.3 Résultats

VI.3.1 Influence de la salinité en élevage entre le stade nauplius (Nii) et post-larve

Pour l'ensemble des salinités testées de 20 à 40 ppt, les survies sont supérieures à 80% à J1 (Fig. VI.4). Cependant, le développement des Nii est plus faible à 25 et 20 ppt dès les premiers jours : les larves sont toujours au stade nauplius 2 alors que dans tous les autres traitements les nauplius sont au stade 5 à J1. Pour ces deux salinités, la survie chute ensuite très rapidement et au 3^{ème} jour d'élevage, plus aucune survivante n'est observée.

A J3, la survie des larves élevées à 28, 35 et 39 ppt est similaire tout comme leur ID compris entre 1 et 1,1. Le traitement 31 ppt se démarque avec une survie légèrement supérieure et un ID à 1,5 (plus de 50% des larves au stade zoé 2). Cette différence est comblée à J5 et J7 et seules les larves élevées à la salinité de 28 ppt (ID=3,86) reste légèrement en retrait par rapport aux autres traitements (ID=4). A la fin de l'élevage, les meilleures survies sont obtenues aux salinités de 28 et 31 ppt avec des valeurs autour de 80%, les élevages à 35 et 39 ppt donnent des survies proches de 70%.

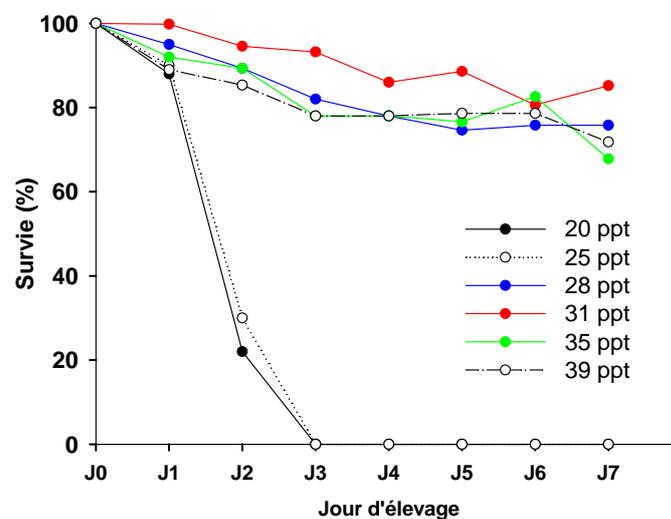


Figure VI.4 : Evolution de la survie en élevage larvaire en fonction de la salinité du milieu.

Une deuxième expérimentation a ensuite été menée sur cette même phase de l'élevage larvaire afin de tester à nouveau mais en duplicata les salinités de 28, 30 et 35ppt .

Après 5 jours d'élevage, les survies et les indices de développement sont équivalents aux 3 salinités (respectivement 80% et 3). C'est à partir de J7 que la survie commence à diminuer

aux salinités de 28 et 30 ppt pour atteindre à J9 les taux respectifs de 69,5% et 73,5%. A ce stade de l'élevage 88,4% des larves à 35 ppt sont encore en vie.

Après 15 jours d'élevage, les survies moyennes finales des PL sont de 56,2%, 64,4% et 80,8% respectivement pour les traitements 28, 30 et 35 ppt avec une hétérogénéité des résultats à 28 ppt (Tab VI.1). Le développement des animaux à cette salinité s'est cependant révélé le meilleur puisque 20% des PL ont une formule rostrale de [3-0] alors que dans les deux salinités les plus élevées la formule rostrale des PL est encore de 100% [2-0].

Tableau VI.1 : Survie et indice de croissance en fin d'élevage (J15) en fonction de la salinité d'élevage.

Traitement (ppt)	28	28	30	30	35	35
Survie (%)	66,9	45,6	67,9	61	85,5	76,2
% [2-0]/%[3-0]	80/20	80/20	100/0	100/0	100/0	100/0

Il nous a donc semblé intéressant au vu des résultats de cette deuxième expérience de maintenir la salinité d'élevage entre 30 et 35 ppt dans la première partie de l'élevage larvaire, puis de l'abaisser dans la phase post-larvaire pour vérifier l'effet sur la croissance et/ou le développement.

VI.3.2 Influence de la salinité sur le développement des PL en élevage

Jusqu'à J4, la survie est identique à 30 et 35 ppt (Fig. VI.5A). Par contre, un retard de développement est observé dès J3 à 30 ppt, les larves ayant mis plus de temps à passer au stade zoé 2 (Fig. VI. 5B). A J5, des écarts de survie sont également observés entre les deux traitements et les différences sont statistiquement significatives sur les deux paramètres ($\alpha=0,05$). A J7, les différences se sont accrues et la survie n'est plus que de 50% à 30 ppt avec une forte disparité en fonction des réplicats (de 0 à 85%). Des larves mortes sont observées sur dix des douze bacs alors qu'aucune mortalité n'a été relevée à 35 ppt, ce dernier traitement enregistrant une survie moyenne supérieure à 85% à J9. Pour éviter tout risque de contamination par les bacs présentant des larves mortes (qui pourrait nuire au déroulement de la deuxième partie de cette expérimentation), il a donc été décidé d'éliminer tous les bacs à 30 ppt.

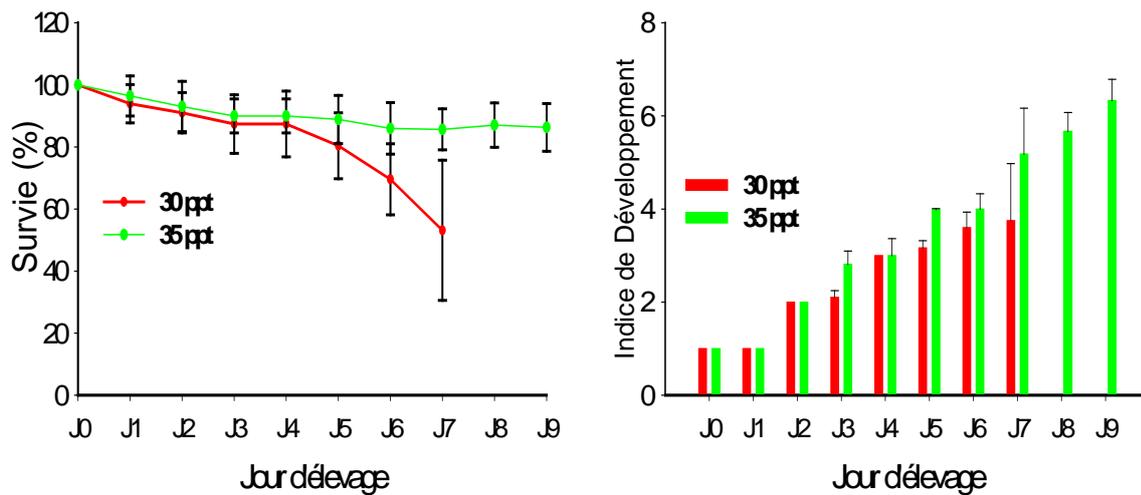


Figure VI.5 : Evolution de la survie (A) et de l'indice de développement (B) en fonction de la salinité d'élevage de J0 à J9 (moyenne \pm écart-type).

A J9, les 12 bacs restants à la salinité de 35 ppt ont subi des renouvellements réguliers avec de l'eau à différentes salinités en triplicats : à 24 ppt pour le traitement « 35-24 », à 27 ppt pour le traitement « 35-27 » et 30 ppt pour le traitement « 35-30 », ce qui a permis de diminuer progressivement la salinité. Trois réplicats ont été renouvelés avec de l'eau à 35 ppt pour le traitement « 35-35 » (protocole témoin).

Après 20 jours d'élevage, la meilleure survie a été obtenue avec le traitement « 35-35 » (84,1%) et la plus basse avec le traitement « 35-24 » (73,1%) mais ces résultats ne sont pas significativement différents (Tab. VI.2). Les survies sont excellentes et même au-dessus des résultats moyens obtenus en élevage larvaire de *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie (50 à 60%). En terme de développement, les traitements « 35-24 » et « 35-35 » ont obtenu les scores les plus élevés avec plus de 85% de PL4, les deux autres traitements affichant 77%. Concernant le gain de poids, les animaux des bacs du traitement « 35-24 », « 35-27 » et « 35-35 » ont enregistré des résultats similaires autour de 0,6 mg ; le traitement « 35-30 » était en retrait avec 0,47 mg (Tab. VI.2). Cependant, que ce soit le paramètre croissance ou le stade de développement, les différences ne sont pas statistiquement significatives ($\alpha=0,05$).

Tableau VI.2: Survie (moyenne \pm écart-type), proportion des différents stades post-larvaires et poids moyen final en fonction de la salinité (moyenne \pm écart-type).

Traitement	35-24	35-27	35-30	35-35
Nombre de réplicats	3	3	3	3
Survie J0-J19 (%)	73,1 \pm 1,9	77,3 \pm 4,7	79,8 \pm 13,2	84,1 \pm 6,4
% PL3 - %PL4	6 - 94	22 - 78	12 - 88	22 - 78
Poids sec final (mg)	0,60 \pm 0,03	0,59 \pm 0,04	0,47 \pm 0,21	0,62 \pm 0,07

Les différents taux de dessalure pratiqués sur les élevages larvaires après la métamorphose ne provoquent de perturbation ni sur la croissance, ni sur la survie des animaux. Mais ils n'ont pas non plus amélioré les résultats par rapport au protocole témoin. Pour l'expérimentation suivante, nous avons décidé de prolonger la phase de dessalure au-delà de J19 (après P10).

VI.3.3 Phase post-larvaire en condition isotonique

Huit élevages ont été gérés de manière identique à 35 ppt entre J0 et J9 et les survies obtenues sont supérieures à 80%. Par contre, le développement des larves sur l'ensemble des bacs était en retrait par rapport à la normale, les indices de développement étant de 5 alors qu'ils devraient atteindre 6 à J9. Ce retard dans le développement peut être lié à la très bonne survie et à un sous-nourrissage des animaux des bacs. A partir de J9, les changements d'eau sont effectués régulièrement sur 4 des bacs avec de l'eau à 27 ppt (traitement « 35-27 ») alors que l'eau des 4 autres bacs est renouvelée à la salinité de 35 ppt (traitement témoin « 35-35 »). Que ce soit en terme de développement, de croissance ou de survie, les meilleurs résultats sont obtenus avec le traitement « 35-27 » (Fig. VI.6). La survie à J19 a été de 56,6% et 47,6% pour les traitements respectifs de « 35-27 » et « 35-35 ». Cependant, les différences à ce stade de l'élevage ne sont pas significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

Tableau VI.3: Survie, pourcentage de PL4 et poids en fonction de la salinité à J19. (moyenne \pm écart-type).

Traitement	35-27	35-35
Nombre de réplicats	4	4
Survie à J19 (%)	56,6 \pm 21,4	47,6 \pm 17,7
Pourcentage de PL4 (%)	72,5 \pm 5,1	45,7 \pm 19,3
Poids sec moyen à J19 (mg)	0,24 \pm 0,05	0,20 \pm 0,06

A J20, l'ensemble des bacs est pêché et la densité est réduite à 20 animaux par litre pour la dernière phase d'élevage de 13 jours. L'élevage des animaux du traitement « 35-27 » est poursuivi à 27 ppt (traitement « 35-27-27 ») alors que les animaux des triplicats « 35-35 » sont répartis dans 3 bacs à 35 ppt pour continuer l'élevage en condition standard (traitement « 35-35-35 ») et 3 bacs à 27 ppt sans acclimatation préalable (traitement « 35-35-27 »).

Ainsi les animaux ayant été élevés pendant toute la phase post-larvaire en condition isotonique ont présenté la meilleure survie, 97,2%. Comparativement la survie des traitements « 35-35-27 » et « 35-35-35 » étaient respectivement de 89,4% et 84,2%. Les écarts ne sont cependant pas significativement différents. Par contre, des écarts significatifs de croissance ont été observés entre « 35-27-27 » et « 35-35-35 » avec des poids moyens respectifs de 1,07 mg et 0,43 mg (Fig. VI.6B). De même le pourcentage d'animaux ayant atteint ou dépassé le stade PL5 était significativement plus important quand la phase post-larvaire est menée en condition isotonique comparativement aux conditions standards.

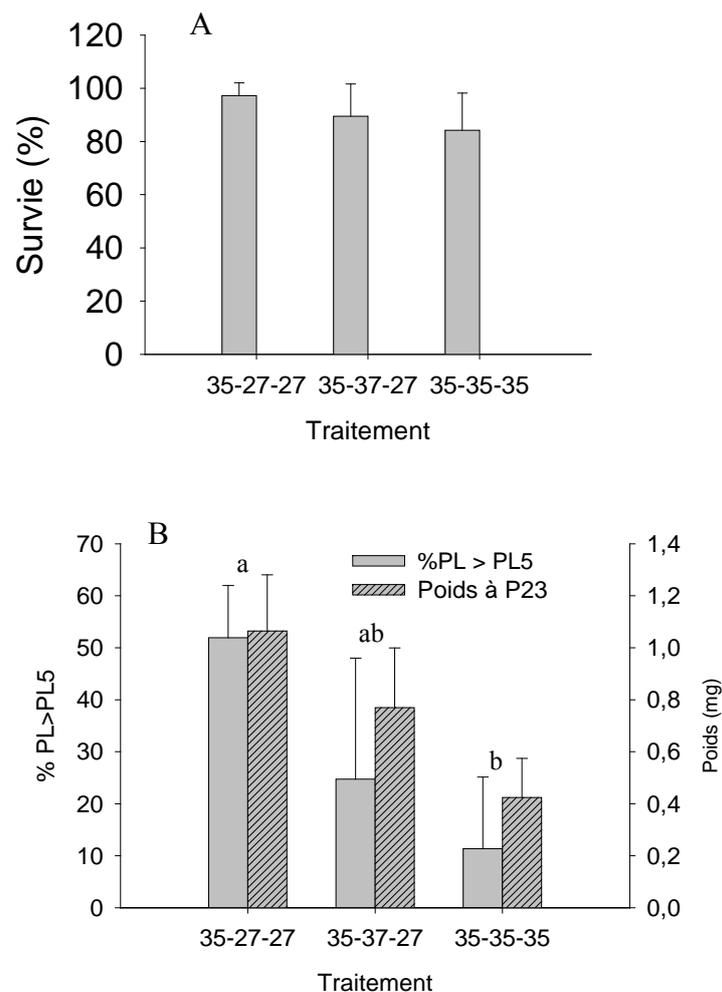


Figure VI.6 : Survie (A), Stade de développement et croissance (B) à J33 en fonction de la salinité. Les lettres indiquent les différences significatives au seuil $\alpha=0,05$.

VI.4 Discussion

Les tests de résistance aux chocs de salinité sur une courte durée avaient permis de fixer la limite basse de salinité pour les expositions en conditions réelles d'élevage (cf. Chap. IV). Les résultats obtenus ici confirment que des salinités inférieures à 25 ppt entraînent rapidement des mortalités. Vingt-quatre heures après le transfert des nauplius de 35 ppt à 25 ppt, le développement est retardé et la mortalité est totale après 3 jours. Lorsque la salinité d'élevage est comprise entre 28 et 30 ppt, les larves survivent mais les résultats sont variables pendant la phase larvaire. Par contre, lorsque les 9 premiers jours d'élevage sont réalisés à 35 ppt, les taux de survies sont proches de 80% et les résultats sont répétables. Nous avons également testé la salinité de 39 ppt car il arrive parfois que l'eau de pompage des écloséries atteigne ou dépasse cette valeur. Le résultat obtenu semble montrer qu'il n'y a pas d'impact négatif de cette sur-salinité sur les paramètres zootechniques dans les premiers jours de l'élevage.

Les résultats obtenus en conditions réelles d'élevage confirment que les salinités proches de l'eau de mer sont les plus propices au bon développement larvaire de *L. stylirostris*. Ces données convergent avec celles acquises chez d'autres pénéidés. Chez *Penaeus merguensis*, Zacharia et Kakati (2004) ont observé que le meilleur développement larvaire est obtenu à la salinité de l'eau de mer. La survie des nauplius à PL1 à 29°C est supérieure à 35 ppt par rapport à 30 ou 25 ppt. Les essais menés sur *Penaeus semisulcatus* révèlent que la croissance et la survie des larves sont affectées lorsque les salinités d'élevage sont inférieures à 30ppt (Kumlu *et al.*, 2000 ; Jackson et Burford, 2003). Les travaux sur d'autres pénéidés telles que *P. kerathurus* (Klaoudatos, 1978), *P. plebejus*, *M. macleayi* (Preston, 1985), *M. ensis* (Chu et So, 1987), *P. penicillatus*, *M. affinis*, *P. monodon* (Parado-Estépa *et al.*, 1993) et *P. styliifera* (Nisa et Ahmed, 2000) conduisent également à la conclusion qu'une salinité au-dessus de 30 ppt est optimale pour le développement des larves. Cette faible tolérance à la dessalure est à relier à l'osmoconformité de la régulation ionique que nous avons mise en évidence chez *L. stylirostris*, caractère probablement commun aux larves de pénéidés. Cette incapacité à osmoréguler pourrait perturber d'autres processus physiologiques. Torres *et al.* (2002) ont ainsi observé une moins bonne assimilation de l'aliment lorsque les larves de différentes espèces de crabes étaient soumises à une réduction de la salinité; par ailleurs, ces auteurs ont également montré que les composés biochimiques des larves sténohalines osmoconformes de *Cancer pagarus* subissaient des variations plus importantes que celle des larves euryhalines hyper-régulatrices de *C. granulata*.

Lorsque *L. stylirostris* atteint le stade post-larve, leur survie n'est pas affectée par un choc de transfert à une salinité de 25,5 ppt (cf. Chap.IV). Cette capacité est à rapprocher de la mise en place progressive des organes osmorégulateurs et une présence très prononcée de la NKA dans les épipodites et le branchiostégite après la métamorphose. Nous avons également estimé que 24,5 ppt était la salinité à laquelle l'animal dépensait le minimum d'énergie pour réguler sa balance hydrominérale. Sans atteindre cette valeur, nous avons donc abaissé la salinité à différentes étapes de l'élevage larvaire. Les résultats obtenus nous confortent dans l'idée que nous nous rapprochons du point isoosmotique chez *L. stylirostris* et donc que nous augmentons son confort physiologique. Les croissances en milieu dessalé se sont avérées meilleures en comparaison à celles en eau de mer et l'écart est d'autant plus important que la dilution est pratiquée précocement après la métamorphose. La différence de croissance entre des animaux soumis à une dessalure à P10 et ceux maintenus à la salinité océanique est de 79%, mais il atteint 143% lorsque la baisse de salinité est pratiquée à P1. Lemos *et al.* (2001) constatent aussi que le gain de poids chez la post-larve de *F. paulensis* est 2,5 fois supérieure à 25 ppt qu'à 34 ppt; ils expliquent la moindre croissance des animaux dans les milieux hypotoniques par une augmentation de l'excrétion ammoniacale consécutive à la combustion des acides aminés libres et par le catabolisme des lipides en milieu hypertonique, contribuant ainsi à la régulation ionique des animaux. Contrairement à la phase larvaire, ce sont dans les milieux les plus salés que la capacité d'assimilation des aliments et que les taux protéiques sont les moins élevés; par contre, ils n'observent pas d'influence de la salinité sur le développement, contrairement à ce que nous avons obtenu. En effet, nous avons observé beaucoup plus d'individus au-delà du stade PL5 dans un environnement dessalé que dans le milieu marin. Les auteurs arrivent toutefois à une conclusion similaire en recommandant d'élever les post-larves de *F. paulensis* entre 15 et 25 ppt. Mc Dair (1980) a montré que les post-larves de différentes espèces de pénéidés sur la côte Pacifique du Mexique dont *L. stylirostris* avaient une préférence pour les milieux de salinité comprise entre 3 et 19 ppt. Pour d'autres auteurs, les salinités recommandées pour une croissance optimale des post-larves de *L. vannamei*, *P. setiferus* ou *P. schmitti* sont comprises entre 15 et 25 ppt (Castille et Lawrence, 1981b ; Boyd, 1989). L'ensemble de ces données confirme la nécessité d'adapter la salinité du milieu environnant aux changements physiologiques qui se produisent au cours de l'ontogenèse chez les pénéidés.

Jusqu'à ce jour, les préconisations en élevage larvaire en Nouvelle-Calédonie se sont essentiellement focalisées sur la température en recommandant de la maintenir entre 29 et

32°C. La salinité était considérée comme un paramètre secondaire malgré les écarts importants qui peuvent être mesurés entre les périodes les plus sèches et celles les plus humides de l'année. La salinité peut ainsi descendre en dessous de 20 ppt en février-mars et atteindre 40 ppt en octobre-novembre (données de la base Stylog). D'après les résultats de nos expérimentations, la salinité devrait être prise en compte au même titre que la température. Selon les études combinant les deux facteurs, certains auteurs considèrent que la température a une influence prépondérante sur la salinité (Kumlu *et al.*, 2000 ; Thyiaragajan *et al.*, 2003), alors que d'autres concluent le contraire (Zacharia et Kakati, 2004). Ces différences d'interprétation dépendent essentiellement de l'amplitude de variations qui a été expérimentée pour chacun de ces paramètres et bien sûr, de la capacité osmorégulatrice de l'animal. Il serait intéressant d'étudier l'effet induit par la baisse de la salinité sur le *preferendum* thermique des animaux en élevage larvaire chez *L. stylirostris*. Chez les zoés 2 du crabe *Armases rubripes*, la mortalité est faible à 20 ppt et à 20°C ; par contre, elle est totale à la même salinité mais à une température de 16°C (Luppi *et al.*, 2003). Young et Hazlett (1978) ont étudié le développement larvaire d'un crabe estuarien *Carcinus vittatus* et ont montré que les combinaisons qui permettaient à la larve d'atteindre le stade de juvénile associaient une salinité de 25 à 30 ppt à une température de 25 à 30°C. Chez *L. vannamei*, l'écart de croissance entre des juvéniles maintenus à 16 ppt et ceux à 10 ppt dépend de la température à laquelle se fait l'observation et le point isoosmotique fluctue entre 20 et 27 ppt en fonction du couple température-salinité (Buckle *et al.*, 2006). Il nous semble important de tenir compte de l'association de ces deux paramètres extrinsèques et de déterminer si un abaissement de la température de quelques degrés à la salinité optimale d'élevage est préjudiciable ou non à la croissance et la survie des post-larves. Ce résultat, s'il s'avérait négatif, permettrait d'alléger la facture énergétique des élevages larvaires.

VI.5 Conclusion

L'abaissement de la salinité à 27 ppt de manière progressive à partir du 10^{ème} jour d'élevage larvaire nous a permis d'améliorer la croissance et le développement de *L. stylirostris*. En appliquant cette procédure, nous avons obtenu des post-larves dont le poids moyen était 2,5 fois plus élevé et 5 fois plus d'animaux ayant dépassé le stade PL5 comparativement à ceux des élevages maintenus à 35 ppt. Il est donc préconisé de pratiquer la première partie de l'élevage larvaire (de nauplius à PL1) à une salinité de 35 ppt, puis d'abaisser graduellement la salinité à partir de PL1 par des renouvellements séquentiels avec de l'eau à 27 ppt. Ces

recommandations en vue d'améliorer le confort physiologique de la crevette sont dictées par les résultats de nos expérimentations et ne font que confirmer les observations sur l'écologie des pénéidés. Dans le milieu naturel, les larves sont délivrées en haute mer et au fur et à mesure de leur développement, les individus se rapprochent des côtes où la nourriture est plus abondante et où ils trouvent refuge. Avant d'atteindre les zones estuariennes, l'animal a acquis la capacité d'hyper-hypo-réguler qui lui permet de supporter les variations de salinité susceptibles de se produire. Ce processus d'adaptation physiologique est cependant énergivore ; et un milieu dont la salinité se rapproche de la salinité interne de l'animal améliore son confort physiologique et par conséquent, sa croissance.

Chapitre VII : Conclusions et Perspectives

VII.1 Principaux résultats obtenus	125
VII.2 Vers un modèle des mécanismes d'osmorégulation chez <i>L. stylirostris</i> ...	127
VII.3 Perspectives.....	129

L'espèce *L. stylirostris* représente moins de 0,1 % de la production mondiale des pénéidés mais constitue le deuxième secteur en valeur marchande à l'exportation pour la Nouvelle-Calédonie avec 11 millions d'euros en 2009. La maîtrise complète de sa reproduction en captivité, dans les années quatre-vingt, a permis aux éleveurs pratiquant des élevages de type semi-intensifs de doubler les rendements en 10 ans, passant de 2 à 4 t/ha/an depuis 1998 (ERPA, 2010). Cette progression a engendré une pression plus importante sur le maillon amont de la filière, représenté par les écloseseries. Des problèmes récurrents de fournitures de juvéniles sont apparus depuis 2005 mettant la filière crevetticole en réel danger. Les origines exactes de ces dysfonctionnements demeurent encore méconnues et pourraient vraisemblablement faire intervenir différents facteurs, tels que des problèmes sanitaires d'origine virale et/ou bactérienne, ou encore des dérives dans l'application des protocoles zootechniques pouvant être liées à un manque de connaissances des cycles d'élevage et/ou de la physiologie du développement. Dans ce contexte, il nous est apparu essentiel de comprendre les interactions existant entre l'animal et son milieu au cours de l'élevage larvaire, en se focalisant sur l'impact d'un facteur abiotique de premier ordre, la salinité. Une approche intégrative associant des aspects zootechniques à des études plus fondamentales au niveau cellulaire (observations macroscopiques, histologiques et immunohistochimie) et moléculaire a donc été initiée dans le but de mieux connaître l'implication de ce facteur dans la réponse physiologique de *L. stylirostris*, notamment au cours de son développement larvaire.

VII.1 Principaux résultats obtenus

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à évaluer **la capacité des juvéniles** de cette espèce à supporter les chocs osmotiques. Les données obtenues nous ont permis de démontrer **qu'une dessalure à court-terme n'était préjudiciable ni à la survie, ni à la croissance de cette espèce**. Un gain significatif en poids humide a même été observé chez les animaux maintenus en eau dessalée par rapport à ceux acclimatés en eau de mer. Des mesures de la capacité osmorégulatrice des animaux réalisées à cette occasion ont établi **l'aptitude de l'animal à absorber activement des sels en milieu dilué et à les excréter en eau de mer**.

Dans un second temps, nous avons donc cherché à déterminer quels étaient les organes à l'origine de cette régulation et les mécanismes biochimiques sous-jacents. En règle général, les échanges ioniques se font au sein de tissus spécifiques possédant des cellules spécialisées

appelées **ionocytes**. Ces cellules, caractérisées par d'abondantes invaginations basales étroitement liées à des mitochondries ainsi que de nombreuses microvillosités apicales, ont pu être formellement identifiées pour la première fois chez *L. stylirostris*, **dans les épipodites**. Nous avons également montré qu'elles se répartissaient de manière plus irrégulière sur le **branchiostégite**. Par contre, les ionocytes typiques n'ont pas été mis en évidence dans les branchies, alors que **différents types de cellules existent dans l'épithélium des lamelles branchiales**.

Afin d'affiner notre compréhension du rôle de ces tissus, nous avons cherché à déterminer, sur la base des connaissances acquises chez d'autres espèces d'invertébrés marins, quels étaient les transporteurs impliqués dans l'osmorégulation chez la crevette bleue. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à 3 protéines transmembranaires : la NKA, considérée par les physiologistes comme le transporteur actif primaire dans l'osmorégulation (Lucu et Towle, 2003), le NKCC1, qui est la forme sécrétrice du co-transporteur NKCC, et le CFTR, ces deux dernières étant **immunolocalisées** pour la première fois chez un crustacé décapode. Nous avons pu établir que la présence des transporteurs variait en fonction du tissu considéré. Ainsi, la **NKA** a été mise en évidence en position basolatérale **dans tous les tissus** (branchies, épipodites et branchiostégite) **et à toutes les salinités**, le **CFTR** en position apicale dans les **branchies et les épipodites** ainsi que dans les **cellules piliers des branchiostégites en eau de mer** tandis que le **NKCC1** est détecté essentiellement dans les **branchies aussi bien en milieu hypertonique qu'en milieu hypotonique**.

Dans le but d'affiner notre compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ce processus, nous avons **caractérisé le gène codant la NKA** chez *L. stylirostris* et entrepris des études de son expression spatio-temporelle et en réponse à des chocs de salinité. A cette occasion nous avons pu établir le **caractère ubiquitaire de l'expression tissulaire de ce gène**, avec toutefois une abondance significativement **plus marquée dans les tissus** suspectés d'intervenir **dans l'osmorégulation**. Confortant nos observations immunologiques, cette approche renforce l'hypothèse d'une implication prépondérante des épipodites et des branchies dans l'osmorégulation. A l'occasion de brusques variations de salinité, nous avons établi l'abondance des transcrits du gène codant la NKA dans les épipodites des animaux maintenus à 35 ppt par rapport aux animaux en milieu isoosmotique, alors qu'aucune variation n'était observée dans le même temps dans les branchies, en dépit d'importants échanges ioniques mesurés entre le milieu extérieur et l'hémolymphe de l'animal. Cette relative stabilité, observée également chez d'autres crustacés soumis à des stress semblables,

tend à indiquer la mise en place, au moins sur un **court-terme**, de **mécanismes de régulation post-transcriptionnelle**.

Compte tenu du rôle prépondérant des épipodites et des branchies dans l'ionorégulation chez les juvéniles et de l'absence de ces tissus chez les larves, nous avons finalement étudié la capacité des stades post-embryonnaires à supporter les chocs osmotiques. Lors de challenges expérimentaux, nous avons établi que la tolérance des larves aux chocs osmotiques était faible. Des observations histologiques ainsi que l'utilisation de marqueurs immunologiques de la NKA ont confirmé l'**absence des épipodites et des branchies de la cavité branchiale chez la larve** et nous ont permis de montrer que **leur apparition successive au cours de l'ontogenèse améliorait la résistance à la dessalure** chez *L. stylirostris*. Des analyses en PCR quantitatives effectuées à différents stades larvaires nous ont permis de démontrer que le gène codant la sous-unité α de la NKA s'exprimait dès le stade nauplius mais que ses **niveaux d'expression ne variaient pas entre les différents stades**.

Nous avons finalement montré que les connaissances acquises sur l'ontogenèse de l'osmorégulation chez *L. stylirostris* ont permis d'aboutir à des **préconisations pratiques** en aquaculture qui se sont traduites par des **gains de croissance en élevage larvaire** de *L. stylirostris*.

VII.2 Vers un modèle des mécanismes d'osmorégulation chez *L. stylirostris*...

L'ensemble de ces résultats, ainsi que les données bibliographiques concernant les mécanismes d'ionorégulation chez les organismes marins, nous permettent, au terme de ce travail de thèse de proposer un modèle au niveau cellulaire, des mécanismes régissant l'osmorégulation chez les juvéniles de crevette *L. stylirostris* en milieu hypertonique (Fig. VII.1). Ces mécanismes cellulaires de l'osmorégulation se produisent essentiellement dans les épipodites et les branchies chez *L. stylirostris*. Ces tissus sont inexistant à l'éclosion et de jusqu'au premier stade post-larvaire. Durant cette phase post-embryonnaire, la survie de l'animal est compromise en milieu dilué par une incapacité à freiner l'entrée massive d'eau par osmose, provoquant la lyse des cellules et la mort de l'animal. Après la métamorphose, l'acquisition progressive de la capacité à hyper-hyporéguler intervient de manière concomitante à la formation des épipodites, puis des branchies permettant ainsi à l'animal de supporter les chocs osmotiques (Fig. VII.2).

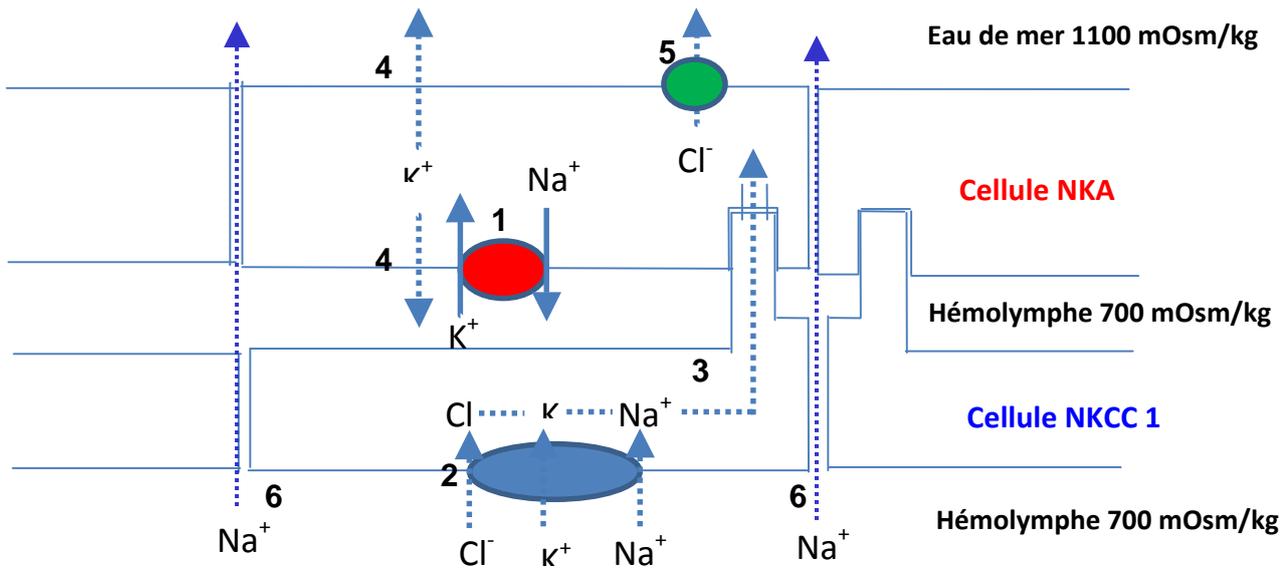


Figure VII.1 : Modèle hypothétique du couplage cellulaire lors du processus d’osmorégulation en milieu hypertonique dans l’épithélium branchial chez *L. stylirostris*.

L’entrée des ions Na⁺ et Cl⁻ se fait du côté apical de la cellule à NKA par diffusion facilitée à la faveur d’un gradient osmotique. L’absorption des ions Na⁺ du cytosol dans l’hémolymphe est activée par la NKA en échange de l’entrée d’ions K⁺ dans la cellule à NKA (1). L’action de la NKA crée le gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement du co-transporteur NKCC1 favorisant le passage de Na⁺ de l’hémolymphe dans le cytosol de la cellule à NKCC1 et le déplacement des ions K⁺ et Cl⁻ contre leur gradient de concentration dans cette même cellule (2). Le transfert des ions Cl⁻, K⁺ et Na⁺ de la cellule à NKCC1 vers la cellule à NKA est possible au travers de canaux inter-cellulaires (3). Les ions Na⁺ sont repris par la pompe à sodium alors que les ions K⁺ sont sécrétés et absorbés par des canaux à fuite (4). Les ions Cl⁻ sont sécrétés par des canaux à chlore ou par l’action du transporteur CFTR en position apicale dans la cellule à NKA (5). Enfin, une voie paracellulaire permet la sécrétion d’ions Na⁺ (7).

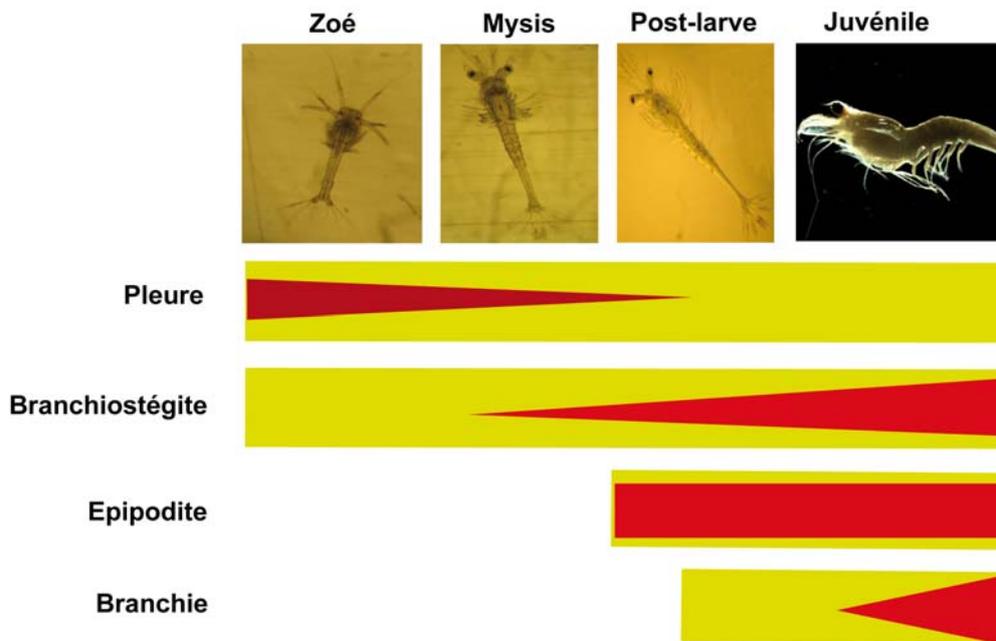


Figure VII.2: Apparition et implication des tissus osmorégulateurs de la cavité branchiale au cours de l’ontogenèse chez *L. stylirostris*. En jaune, présence du tissu chez l’animal ; En rouge, implication du tissu dans l’osmorégulation.

VII.3 Perspectives

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons abordé qu'une infime partie des processus physiologiques qui régissent l'osmorégulation chez les pénéidés. Cependant, les résultats obtenus nous permettent d'envisager d'autres pistes qui sont nombreuses mais réalisables, à court et moyen terme, parmi lesquelles nous mentionnerons :

approfondir le rôle du NKCC et du CFTR dans les activités osmorégulatrices en milieu hypertonique. Très peu de résultats sont disponibles sur l'hypo-osmorégulation chez les crustacés alors que ce processus est largement étudié chez les poissons. Dans un premier temps, il faudrait analyser par **Western-Blot** la spécificité de chacune des protéines vis-à-vis des anti-corps utilisés comme nous l'avons fait pour la NKA. Nous l'avons tenté au cours de ce travail mais nous n'avons pas obtenu de résultats, probablement à cause de la très faible quantité de ces transporteurs comparativement à la pompe à sodium. Il faudra augmenter la taille des échantillons de tissus pour que ces transporteurs soient détectables. Il faudra également localiser de manière plus précise ces deux transporteurs au niveau de l'ultrastructure de l'épithélium branchial. Pour cela, l'utilisation du marquage par **immunogold** devrait permettre de positionner exactement ces différents transporteurs vis-à-vis des cellules à NKA ;

montrer l'implication d'autres effecteurs de l'osmorégulation en milieu hypotonique. Les données sur l'hyper-régulation sont nombreuses grâce aux expérimentations effectuées sur les crabes euryhalins. La V-H⁺-ATPase (Putzenlechner, 1994 ; Putzenlechner *et al.*, 1995; Weihrauch *et al.*, 2001 ; Genovese *et al.*, 2005 ; Tsai et Lin, 2007) et le Cl⁻/HCO₃⁻ (Evans *et al.*, 2005 ; Genovese *et al.*, 2005; Tresguerres *et al.*, 2005; Tresguerres *et al.*, 2006) sont connus pour intervenir dans la régulation ionique des animaux vivant en eau douce. Ces deux transporteurs fonctionneraient conjointement avec l'anhydrase carbonique qui fournirait au premier les ions H⁺ et au second les ions HCO₃⁻ en échange d'ions Cl⁻, jouant ainsi également un rôle dans la régulation acide-base de la cellule. Malheureusement, *L. stylirostris* ne supporte pas le transfert en eau douce, donc une telle étude est impossible. Par contre, en eau de mer diluée et hypotonique pouvant descendre jusqu'à 3 ppt, des études **d'immunolocalisation de la V-H⁺-ATPase et du Cl⁻/HCO₃⁻** ou encore de l'anti-porteur **Na⁺/H⁺** pourront être réalisées afin de déterminer si ces transporteurs sont présents ou si ce sont d'autres transporteurs, notamment des canaux à chlore, qui se mettent en place ;

rechercher la présence des différentes protéines transmembranaires au cours de l'ontogenèse. La localisation des différents transporteurs transmembranaires pourra être effectuée aux divers stades de développement comme cela a été fait pour la NKA. Par contre, cette étude devra être effectuée sur l'animal entier pour tenir compte d'autres organes potentiellement impliqués dans l'osmorégulation tels que la glande antennaire ou la partie distale de l'intestin. Les résultats permettront sans doute de mieux interpréter les différences de tolérance à la salinité entre les stades larvaires ;

étudier l'expression génique des autres transporteurs. Nous avons vu que des transporteurs autres que la NKA pouvaient être localisés dans l'épithélium branchial. Une fois la spécificité démontrée, il sera intéressant d'appliquer la même démarche que celle que nous avons employée pour la NKA, à savoir la caractérisation du gène puis l'étude de son expression en fonction des variations de la salinité. Cette analyse complètera les données qualitatives de l'immunolocalisation. L'expérimentation pourra être améliorée sur deux points, d'une part, en associant les données géniques à des **dosages de l'activité spécifique de l'enzyme** et, d'autre part, en modifiant le **pas de temps entre deux prélèvements** et en allongeant la **durée d'acclimatation**. Dans le premier cas nous pourrons voir si la transcription et la régulation de l'activité spécifique de l'enzyme sont liées et quel est le temps de réponse entre ces deux phénomènes. Dans le deuxième cas, nous saurons si des modifications significatives de l'expression du gène se font sur le plus long terme ;

vérifier la fonctionnalité des gènes. En utilisant des techniques d'**interférence par l'ARN**, il est possible d'inhiber chez les organismes eucaryotes de manière spécifique et transitoire l'expression d'un gène cible par injection d'ARN double-brins correspondants. Cette technique a été adaptée ces dernières années chez les pénéides et a permis de mettre en évidence le rôle fonctionnel de nombreux gènes. Pour cela, des fragments d'ARN interférant sont introduits dans la cellule où ils vont s'apparier avec l'ARNm cible et le dégrader ou inhiber l'élongation de la traduction. L'application d'une telle technique permettra de relier directement la fonctionnalité du gène à l'activité de la protéine transmembranaire pour laquelle il code en soumettant les animaux auxquels on aura injecté de l'ARN interférant à des chocs osmotiques ;

confirmer le rôle prépondérant des épipodites dans l'osmorégulation. Il s'agira de démontrer que les **épipodites sont des tissus majeurs dans l'osmorégulation**. L'expérimentation consistera à enlever les épipodites de l'animal puis à le soumettre à des tests de chocs de salinité afin de vérifier, par des mesures de pression osmotique de

l'hémolymphe et par l'observation de la mortalité, si son aptitude à osmoréguler est fortement modifiée ;

déterminer l'effet de la salinité sur le métabolisme de l'animal. La mise au point des protocoles d'élevage larvaire a été jusqu'à présent effectuée à une salinité de 35 ppt. Nous avons vu que l'abaissement de la salinité à 27 ppt à partir de la phase post-larvaire permettait d'accélérer la croissance des animaux. Nous supposons que l'énergie qui n'a pas servi à l'osmorégulation a été mobilisée pour le développement de la post-larve. Il sera important de quantifier cette moindre **dépense énergétique** en terme de **consommation d'oxygène**. Par ailleurs, les post-larves ont été nourries de manière *ad-libitum* dans nos essais et il sera intéressant d'estimer les **besoins nutritionnels**, notamment en quantité d'*Artemia*, en fonction de la salinité. Ces résultats permettront d'optimiser les intrants et pourront avoir un impact économique ;

estimer les effets de la température sur l'osmorégulation. Nous avons jusqu'à présent étudié la capacité de *L. stylirostris* à osmoréguler à la température de 29°C. Plusieurs études montrent que la **combinaison température-salinité (T-S)** est un facteur primordial dans le développement larvaire (Ismael et Moreira, 1997 ; Jackson et Burford, 2003 ; Zacharia et Kakati, 2004). L'examen de post-larves soumises à des températures de 27 à 34°C associées à des salinités de 25 à 40 ppt nous renseignera sur les conditions optimales du couple T-S en vue d'améliorer les conditions en élevage ;

comparer les performances ultérieures des animaux issus d'élevage larvaire en eau isotonique par rapport à celles des animaux issus d'élevage en eau hypertonique. La **résistance** des animaux à différents **stress** (thermique, osmotique, nutritionnel, anoxique, bactérien...) devra être étudiée pour quantifier l'impact des nouvelles procédures d'élevage sur l'état physiologique global de l'animal.

Toutes ces analyses permettront d'un point de vue fondamental de mieux comprendre la physiologie d'une espèce-cible en crevetticulture, la *Litopenaeus stylirostris*. Ces données pourront ensuite être adaptées au contexte de la production en vue d'améliorer les critères zootechniques des élevages et d'obtenir des résultats plus consistants, assurant ainsi une plus-value économique et une meilleure rentabilité des écloséries. Les travaux et les résultats de cette recherche confortent la position du LEAD comme outil au service du développement de la filière aquacole en Nouvelle-Calédonie, l'Ifremer assumant par la même un des rôles qui lui est confiée au niveau national en concertation avec les autorités locales.

Bibliographie

- A -

- Aladin, N.V. and Potts, W.T.W.**, 1995. Osmoregulation capacity of the Cladocera. *Journal of Comparative Physiology, B*, 164: 671-683.
- Altschul, S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J.**, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389-402.
- Anger, K.**, 2001. The biology of decapod crustacean larvae (Crustacean Issues 14). A.A. Balkema publishers, Rotterdam, Netherlands: 420 pp.
- Anger, K., Spivak, E. and Luppi, T.**, 1998. Effects of reduced salinities on development and bioenergetics of early larval shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 220: 287-304.
- AQUACOP, Le Moullac G. and Damez D.**, 1991. Modélisation de la résistance aux chocs de salinité des postlarves de *Penaeus vannamei*. *Aquatic Living Ressources*, 4 : 169-173.

- B -

- Barradas, C., Dunel-Erb, S., Lignon, J., and Pequeux, A.**, 1999. Superimposed morphofunctional study of ion regulation and respiration in single gill filaments of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19: 14-25.
- Bauer, R.T.**, 1999. Gill-Cleaning Mechanisms of a Dendrobranchiate Shrimp, *Rimapenaeus similis* (Decapoda, Penaeidae): Description and Experimental Testing of Function. *Journal of Morphology*, 242: 125–139.
- Beliaeff, B.**, 2009. Projet DEDUCTION. Bilan 2007-2009: 33 pp.
- Bianchini, A. and Gilles, R.**, 1990. Cyclic AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Marine Biology*, 104: 191–196.
- Blanco, G. and Mercer, R.W.**, 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology*, 275: F633-F650.
- Bodinier, C., Lorin-Nebel, C., Charmantier, G., and Viviane Boulo, B.**, 2009. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile *Dicentrarchus labrax* exposed to seawater and freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 153: 345-351.

- Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J.-P. and Charmantier, G.,** 1994. Ontogeny of Osmoregulatory Structures in the Shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). The Biological Bulletin, 186, n°1: 29-40.
- Boyd, C.E.,** 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquaculture Departmental Series No. 2. Auburn University Press, 70 pp.
- Bradbury, N.A., Jilling, T., Berta, G., Sorscher, E.J., Bridges, R.J. and Kirk, K.L.,** 1992. Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. Science 256: 530-532.
- Bradford, M. M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.
- Bray, W. A., A. L. Lawrence, and Leung-Trujillo, J. R.,** 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHNV virus and salinity. Aquaculture, 122: 133–146.
- Bückle, L.F., Benjamín Barón, B. and Hernández, M.,** 2006. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. Revista de Biología tropical, vol. 54 (3), 745-753.
- Burnett, L.E., Dunn, T.N. and Infantino, J.R.L.,** 1985. The function of carbonic anhydrase in crustacean gills. In: Gilles, R., Gilles-Baillien, M. (Eds.), Transport Processes, Iono- and Osmoregulation. Springer-Verlag, Berlin, 159–168.

- C -

- Calderon-Aguilera, L. E., Marinonea, S. G. and Aragon-Noriega, E. A.,** 2003. Influence of oceanographic processes on the early life stages of the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in the Upper Gulf of California. Journal of Marine Systems, 39: 117-128.
- Castilho, P.C., Martins, I.A. and Bianchini, A.,** 2001. Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). Journal of Experimental Biology and Ecology, . 256: 215–227.
- Castille, F.L. and Lawrence, A.L.** 1981a. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comparative Biochemistry and Physiology, 68A: 75-80.

Bibliographie

- Castille, F.L. and Lawrence, A.L.**, 1981b. A comparison of the osmotic, sodium and chloride concentrations between the urine and hemolymph of *Penaeus setiferus* (L) and *Penaeus stylirostris* Stimpson. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, 70A: 525-528.
- Charmantier, G.**, 1986. Variation des capacités osmoregulatrices au cours du développement post-embryonnaire de *Peaneus japonicus* Bate, 1888 (Crustacea, Decapoda). *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, 303: 217-222.
- Charmantier G.**, 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invert. The Journal of Reproduction and Development*, 33: 177-190.
- Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M.**, 1991. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in *Cancer irroratus*. Elements of comparison with *C. borealis* (Crustacea, Decapoda). *The Biological Bulletin*, 18: 125-134.
- Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M.**, 1995. Osmoregulation and salinity tolerance in zoeae and juveniles of the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Aquatic Living Resources*, 8: 171-179.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. et Aiken, D.E.**, 1984. Variation des capacités osmorégulatrices des larves et post-larves de *Homarus americanus* H. Milne-Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda). *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, 299: 836-866.
- Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P. and Thrilles, J.-P.**, 1988a. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. *European Aquaculture Society Special Publication*, 10: 65-66.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Aiken D.E. and Thrilles, J.-P.**, 1988b. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *The Biological Bulletin*, 175, n°1: 102-110.
- Charmantier, G., Haond, C., Lignot, J. H. and Charmantier-Daures, M.**, 2001. Ecophysiological adaptation to salinity throughout a life cycle: a review in homarid lobsters. *Journal of Experimental Biology*, 204: 967-977.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., and Towle, D.**, 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. In "Osmotic and ionic regulation. Cells and animals", D. H. Evans, Ed., CRC Press, NewYork, NY, Oxford, UK: 165-230.

Bibliographie

- Chen, J.-C. and Lin J.-L.**, 1994. Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 179: 267-278.
- Chen, J.-C. and Lin, J.-L.**, 1998. Osmotic concentration and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles reared at different salinity and temperature levels. *Aquaculture* 164: 173–181.
- Chen, J.-M., Cutler, C., Jacques, C., Boeuf, G., Denamur, E., Lecointre, G., Mercier, B., Cramd, G., and Férec, C.**, 2001. A combined analysis of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: implications for structure and disease models. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (9): 1771-1788.
- Chu, K.H. and So, B.S.H.**, 1987. Changes in salinity tolerance during larval development of the shrimp *Metapeneus ensis* (De Haan). *Asian Marine Biology*, 4: 41–48.
- Chung, K.-F. and Lin, H.-C.**, 2006. Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, 144: 48-57.
- Cieluch U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures M., Charmantier G.**, 2004. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Biology*, 207: 325-336.
- Cieluch U., Charmantier G., Grousset E. and Charmantier-Daures M.**, 2005. Osmoregulation, Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase and ultrastructure of branchial epithelia in the developing Brown Shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(6): 1017-1025.
- Cieluch, U., Anger, K., Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G.**, 2007. Osmoregulation and immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase during the ontogeny of the mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea). *Marine Ecology Progress Series*, vol. 329: 169–178.
- Collectif DAC.** (2007). Pourquoi élever la crevette *Litopenaeus stylirostris* plutôt qu'une autre espèce en Nouvelle-Calédonie ? Fiche Biotechnique 2007-05: 2 pp.
- Cortas, N., Arnaout, M., Salon, J. and Edelman, I.S.**, 1989. Isoforms of Na,K-ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue Distribution and Kinetic Characterization. *Journal of Membrane Biology*, 108: 187-195.

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

Cutler, C. P., and Cramb, G., 2008. Differential expression of absorptive cation-chloride cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 149 (1): 63-73.

- D -

Dall, W., 1974. Osmotic and ionic regulation in the Western rock lobster *Panulirus longipes* (Milne-Edwards). *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 15: 97–125.

Dall, W. (1981). Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some penaeid prawns. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 54: 55-64.

Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. and Staples, D.J., 1990. The biology of the Panaeidae. *Advances in Marine Biology*, Academic Press, London, 27: 1-489

Dakin, W.J., 1938. The habits and life –history of a penaeid prawn (*Peanaeus plebejus* Hesse). *Proceedings of the Zoological Society in London*, vol. A, 108: 163-183.

Dawirs, R., 1986. Influence of limited food supply on growth and elemental composition (CHN) of *Carcinus maenas* larvae reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series* 31: 301– 308.

Debenay, J.-P. et Della Patrona, L., 2009. The impact of easily oxidized material (EOM) on the meiobenthos: Foraminifera abnormalities in shrimp ponds of New Caledonia; implications for environment and paleoenvironment survey. *Marine Pollution Bulletin*, 59 : 323–335.

De Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachere, E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular Immunology*, 45(12): 3438-3445.

De Renzis, G. and Bornancin, M., 1984. Ion transport and gill ATPases. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) *Fish physiology gills*, vol XB. Academic, Orlando: 65–104.

Dore, I. and Frimodt, C., 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Van Nostrand Reinhold Company, New York: 229 p.

Dunel-Erb, S., Barradas, C. and Ligon, J., 1997. Morphological evidence for the existence of two distinct types of mitochondria rich cells in the gill of the crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz. *Acta Zoologica*, vol. 78, n°3: 195-203.

- E -

Eckhardt, E., Pierrot, C., Thuet, P., Van Herp, F., Charmanteir-Daures, M., Trilles, J.P. and Charmantier, G., 1995. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General and Comparative Endocrinology*, 99: 169-177.

Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Review*, 85: 97-177.

- F -

Faleiros, R.O., Goldman, M.H.S., Furriel, R.P.M. and McNamara, J.C., 2010. Differential adjustment in gill Na⁺K⁺-ATPase and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology*, 213: 3894-3905.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Flik, G. and Haond, C., 2000. Na⁺ and Ca²⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute seawater. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 213-220.

Foskett, J. K. and Scheffey, C., 1982. The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. *Science*, 215: 164-166.

Freire CA and McNamara J.-C., 1995. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 103-116.

Freire, C.A., Onken, H., and McNamara, J.C., 2008. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, 151: 272–304.

Fujinaga, M., 1955. Life history of *Peaneus japonicus*. In papers presented at the international technical conference on the conservation of the living resources of the sea, April/may 1955, U.N., New-York: 89-91.

- G -

Garcia, S. and Le Restre, L. 1981. Life cycles, dynamics, exploitation and management of coastal penaeid shrimp stocks. *FAO Fisheries Technical Paper*, 203:1-215.

Genovese, G., Ortiz, N., Urcola, M.R. and Luquet, C.M., 2005. Possible role of carbonic anhydrase, VH^+ -ATPase and Cl^-/HCO_3^- exchanger in electrogenic ion transport across the gills of euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142A: 362-369.

Gilles, R. and Pecqueux, A., 1985. Ion transport in crustacean gills: Physiological and ultrastructural approaches. In: Gilles, R., Gilles-Baillien, M. (Eds.), *Transport Processes: Iono- and Osmoregulation*. Springer Verlag, Berlin: 136–158.

Gimenez, L., 2000. El efecto de la salinidad y la biomasa inicial en el desarrollo larval del cangrejo estuarino *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). Dissertation, PEDECIBA—Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica, Montevideo.

Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R. and Marteau, A.L., 1998a. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture*, 169 (3-4): 291-296.

Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F. and De Decker, S., 1998b. Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture*, 253: 105-113.

Goarant, C., Merien, F., Berthe, F., Mermoud, I. and Perolat, P., 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. Pathogenic for shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1145-1151.

- H -

- Haas, M. and Forbush, B.,** 2000. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia (Review). *Annual Review of Physiology*, 62: 515-534.
- Henry, R.P. and Wheatly, M.G.,** 1992. Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *American Zoology* 32, 407-416.
- Herbland, A., Harache, Y. et coord.,** 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, 144 p.
- Herlin, J.,** 2010. La biosécurité à l'Ifremer LEAD, Station de Saint-Vincent. Fiche biotechnique 2010-01 : 4pp.
- Herlin, J. et Marteau, A.-L.,** 2000. Enquête sur la présence de *Vibrio nigripulchritudo* dans les écloseries de Nouvelle-Calédonie. Fiche biotechnique 2000-13. 10 pp.
- Hiroi, J., McCormick, S. D., Ohtani-Kaneko, R., and Kaneko, T.,** 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl cotransporter and CFTR anion channel. *Journal of Experimental Biology*, 208: 2023-2036.
- Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S. D., Hwang, P.-P., and Kaneko, T.,** 2008. Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 211 (16): 2584-2599.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., and Takei, Y.,** 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 136: 593-620.
- Horng, J.-L. and Lin L.-Y.,** 2008. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter in branchial mitochondrion-rich cells of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) subjected to varying chloride conditions. *Zoological Studies*, 47(6): 733-740.
- Huber, M., Cardona, E., Fersing, P., Lemaire, P., Brun, P., Mailliez, J.R., Broutoi, F., Peignon, J.M., Marteau, A.L., Goguenheim, J. and Chim, L.,** 2010. Premiers géniteurs de *L. stylirostris* issus d'élevages hyper-intensifs en floc en Nouvelle-Calédonie : performances comparées avec les géniteurs des élevages traditionnels. Fiche biotechnique 2010-02 : 3pp.

Huong, D.T.T., Jasmani, S., Jayasankar, V., Wilder, M., 2010. Na/K-ATPase activity and osmo-ionic regulation in adult whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to low salinities. *Aquaculture*, 304: 88-94.

- I -

Ismael, D. and Moreira, G.S., 1997. Effect of temperature and salinity on respiratory rate and development of early larval stages of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 118A (3): 871-876.

- J -

Jackson, C.J. and Burford M.A., 2003. The effects of temperature and salinity on growth and survival of larval shrimp *Penaeus semisulcatus* (decapoda: penaeoidea). *Journal of Crustacean Biology*, 23 (4): 819-826.

Jayasundara N, Towle DW, Weihrauch D, Spanings-Pierrot C., 2007. Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *Journal of Experimental Biology* 210(Pt 12):2070-81.

Juncker, M. and Poupin, J., 2009. Crustacés de Nouvelle-Calédonie (Décapodes et Stomatopodes). Rapport scientifique CRISP. 116 pp.

Jury, S.H., Kinnison, M.T., Huntting Howell, W.H. and Watson, W.H. III., 1994. The effects of reduced salinity on lobster (*Homarus americanus* Milne-Edwards) metabolism: implications for estuarine populations. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 176: 167-185.

- K -

- Kalber, F.A.**, 1970. Osmoregulation in decapod larvae as a consideration in culture techniques. Helgol. Wiss. Meeresunters n° 20: 697-706.
- Kaplan, J.H.**, 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. Annual Review of Biochemistry.;71:511-35.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., et al.**, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science, 245: 1073-1080.
- Keys, A. B., and Willmer, E. N.**, 1932. Chloride-secreting cells in the gills of fishes with special reference to the common eel. Journal of Physiology in London, 76: 368-378.
- Kikuchi, S. and Matsumasa, M.**, 1993. Two ultrastructurally distinct types of transporting tissues, the branchiostegal and the gill epithelia, in an estuarine tanaid, *Sinelobus stanfordi* (Crustacea, Peracarida). Zoomorphology, 113: 253-260.
- Kikuchi, S. and Shiraishi, K.**, 1997. Ultrastructure and ion permeability of the two types of epithelial cell arranged alternately in the gill of the fresh water branchiopod *Caenestheriella gifuensis* (Crustacea). Zoomorphology, 117: 53–62.
- Kinne, O.**, 1963. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals: I. Temperature. Oceanography and Marine Biology Annual Review, 1: 301– 340.
- Kinne, O.**, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. Oceanography and Marine Biology Annual Review, 2: 281-339.
- Kinne, O.**, 1971. Salinity: Animal Invertebrates. In: Kinne, O. (Ed.), Marine Ecology, vol. I: Environmental Factors. Wiley Interscience, London: 821-995.
- Kirschner, L.B.**, 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. Journal of Experimental Biology, 207 : 1439–1452.
- Khodabandeh, S., Kutnik, M, Aujoulat, F, Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M.**, 2005. Ontogeny of the antennal glands in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase. Cell Tissue Research, 319: 167-174.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M.**, 2006. Immunolocalization of Na⁺K⁺-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and

Bibliographie

post-embryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. Journal of Crustacean Biology, 26 (4): 515–523.

Klaoudatos, S., 1978. Breeding of *Penaeus kerathurus* in the laboratory as a proposition to culture them on a commercial scale. Thalassographica 2 (1): 99– 113.

Kleizen, B., Braakman, I., and de Jonge, H. R., 2000. Regulated trafficking of the CFTR chloride channel. European Journal of Cell Biology, 79 (8): 544-556.

Kozak, M., 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation . Journal of Biological Chemistry, 266: 19867-19870.

Kumlu, M. and Jones, D.A., 1995. Salinity tolerance of hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* H.Milne Edwards originating from India. Aquaculture, 130: 287–296.

Kumlu, M., Eroldogan, O.T. and Aktas, M., 2000. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. Aquaculture, 188: 167-173.

Kumlu, M., Eroldogan, O.T. and Saglamtimur, B., 2001. The effects of salinity and added substrates on growth and survival of *Metapenaeus monoceros* (Decapoda: Penaeidae) postlarvae. Aquaculture, 196: 177–188.

- L -

Laramore, S., Laramore, C.R. and Scarpa, J., 2001. Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society, 32, 4.

Le Balle, V., 1989. La Station d'Aquaculture de Saint-Vincent (SASV) et la culture des Pénéides en Nouvelle-Calédonie. Travaux sur l'acclimatation des post-larves. Rapport de stage de DESS Exploitation des ressources vivantes et côtières. Université de Caen.

Lee, T.H., Tsai, J.C., Fang, M.J., Yu, M.J. and Hwang, P.P., 1998. Isoform expression of Na⁺-K⁺-ATPase α -subunit in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. American Journal of Physiology, 275: R926–R932.

Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.A. and Chim, L., 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. Aquaculture, 209: 307–317.

Bibliographie

- Lemonnier, H., Courties, C., Mugnier, C., Torrétón J. P. and Herbland, A., 2010.** Nutrient and microbial dynamics in eutrophying shrimp ponds affected or unaffected by vibriosis. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 402-411.
- Lemos, D., Phan, V.N. and Alvarez, G., 2001.** Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 261: 55-74.
- Leroux, F., Labreuche, Y., Davis, B.M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D., and Waldor, M.K., 2010.** Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environmental Microbiology*, 13 : 296-306.
- Levenson, R., 1994.** Isoforms of the Na-K-ATPase: family members in search of function. *Review of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 123: 1-45.
- Lignot, J. H., Charmantier-Daures, M. and Charmantier, G., 1999a.** Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the european lobster *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Cell Tissue Research*, 296: 417-426.
- Lignot, J.-H., Cochard, J.-C., Soye, C., Lemaire, P. and Charmantier, G., 1999b.** Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 170: 79-92.
- Lignot, J. H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000.** Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191: 209-245.
- Lignot, J.-H. and Charmantier, G., 2001.** Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49: 1013-1023.
- Lignot, J.-H., Nugroho Susanto, G., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., 2005.** Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Research*, 319: 331-339.
- Linder, M.J., and Anderson, W.W., 1954.** Biology of commercial shrimps in Gulf of Mexico: its origin, waters and marine life, edited by P.s. Galtsoff. *Bulletin of Bureau of Fisheries in Washington*, 55, n°89: 457-461.

Bibliographie

- Liu, H.Y., Pan, L.Q. and Zheng, D.B.**, 2009. Effects of injection of biogenic amines on expression of gill related ion transporter mRNA and alpha-subunit protein in *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 154: 29-36.
- Lorin-Nebel, C., Boulo, V., Bodinier, C., and Charmantier, G.**, 2006. The Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *Journal of Experimental Biology*, 209 (24): 4908-4922.
- Lovett, D.L., Colella, T., Cannon, A.C., Lee, H., Evangelisto, A., Muller, E.M. and Towle, D.W.**, 2006. Effect of salinity on osmoregulatory patch epithelia in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biology Bulletin*, 210: 132–139.
- Lucu, C. and Flik, G.**, 1999. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *American Journal of Physiology*, 276: R490–R499.
- Lucu, C. and Towle, D. W.**, 2003. Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of aquatic crustacea. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, 135A: 195-214.
- Lucu, C., Devescovi, M., Skaramuca, B. and Kozul, V.**, 2000. Gill Na⁺/K⁺-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 246: 163–178.
- Luppi, T.A., Spivak, E.D. and Bas, C.C.**, 2003. The effects of temperature and salinity on larval development of *Armases rubripes* Rathbun, 1897 (Brachyura, Grapsoidea, Sesarmidae), and the southern limit of its geographical distribution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58: 575–585.
- Luquet, C.M., Weihrauch, D., Senek, M. and Towle, D.W.**, 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimatation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Experimental Biology*, 208: 3627-3636.
- Lytle, C., Xu, J.-C., Biemesderfer, D., and III, B. F.**, 1995. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *The American Physiological Society*, 269: C1496-C1505.

- M -

- Madsen, S.S., Küllerich, P., Tipsmark, C.K.**, 2009. Multiplicity of expression of Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change. (2009) Journal of Experimental Biology, 212, (Pt 1): 78-88.
- Mair, J.-McD.**,1980. Salinity and water-type preferences of four species of postlarval shrimp (Penaeus) from West Mexico. Journal of Experimental Biology and Ecology, 45: 69-82.
- Mantel, L.H. and Farmer, L.L.**, 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L.H. (Ed.), The Biology of Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation, vol. 5, Academic Press, New York: 53–161.
- Marshall, W. S.**, 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. Journal of Experimental Zoology, 293: 264-283.
- Marshall, W. S., and Singer, T. D.**, 2002. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in teleost fish. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1566 (1-2): 16-27.
- Marshall, W. S., Lynch, E. M., and Cozzi, R. R. F.**, 2002. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. Journal of Experimental Biology, 205 (9): 1265-1273.
- Marshall, W. S., Watters, K.D., Hovdestad, L.R., Cozzi, R.R. and Katoh, F.**, 2009. CFTR Cl⁻ channel functional regulation by phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 407 in osmosensitive ion transporting mitochondria rich cells of euryhaline killifish. Journal of Experimental Biology, 21: 2365-2377.
- Martin, J.W., Liu, E.M. and Striley, D.**, 2007. Morphological observations on the gills of denrobranchiate shrimps. Zoologischer Anzeiger, 246: 115-125.
- Martinez, A-S., Charmantier, G., Compère, P., and Charmantier-Daures, M.**, 2005. Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. Tissue and Cell, 37: 153–165.
- Marty-Ordonez, A.**, 1972. Estudio sobre las preferencias de temperatura y salinidad de *P. stylirostris* en estado adulto. Thesis, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de

Bibliographie

Monterrey, Escuela de Ciencias Maritimas y Tecnologia de Alimentos, Guaymas, Son, Mexico, 52 pp.

Masui, D.C., Furriel, R.P.M., Mantelatto, F.L.M., McNamara, J.C. and Leone, F.A., 2005. K^+ -phosphatase activity of gill (Na^+, K^+)-ATPase from the blue crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the α -subunit. *Journal of Experimental Zoology*, 303A: 294-307.

McCormick, S. D., Sundell, K., Björnsson, B. T., Brown, C. L., and Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the location of Na^+/K^+ -ATPase, $Na^+/K^+/2Cl$ cotransporteur (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *Journal of Experimental Biology*, 206: 4575-4583.

McNamara, J.C. and Lima A.G., 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 192: 321–331.

McNamara, J.C. and Torres, A.H., 1999. Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*, 284: 617–628.

Mendoça, N.N., Masui, D.C., McNamara, J.C., Leone, F.A. and Furriel, R.P.M., 2007. Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill (Na^+, K^+)-ATPase α -subunit expression and K^+ -phosphatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: 534-543.

Mermoud, I., Costa, R., Ferré, O., Goarant, C., and Haffner, P., 1998. Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of the three major outbreaks. *Aquaculture*, 164: 323-335.

Mistakidis, M. N., 1969. Proceedings of the world scientific conference on the biology and culture of shrimps and prawns. *FAO Fisheries Report Series*, n° 57: 164-182.

Mo, J.L. and Greenaway, P., 2001. cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 129: 843-849.

Mo, J. L., Devos, P. and Trausch, G., 1998. Dopamine as a modulator of ionic transport and Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Crustacean Biology*, 18: 442–448.

Bibliographie

Mo, J.L., Devos P. and Trausch, G., 2003. Active absorption of Cl^- and Na^+ on posterior gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*: modulation by dopamine and cAMP. Journal of Crustacean Biology, 23: 505-512.

Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air breathing in decapod crustaceans. Journal of Experimental Biology, 204: 979-989.

Morritt, D. and Spicer, J.I., 1995. Changes in the pattern of osmoregulation in the brackish water amphipod *Gammarus duebeni* Lilljeborg (Crustacea) during embryonic development. Journal of Experimental Zoology, 273: 271-281.

- N -

Nisa, Z. and Ahmed, M., 2000. Hatching and larval survival of important penaeid shrimps of Pakistan in different salinities. Pakistan Journal of Zoology, 32 (2): 139– 143.

- O -

Onken, H. and Mc Namara, J.C., 2002. Hyperosmoregulation in the red freshwatercrab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. Journal of Experimental Biology, 205: 167-175.

Onken, H., Tresguerres, M. and Luquet, C., 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnatus granulatus*. Journal of Experimental Biology, 206: 1017-1023.

- P -

Palacios, E. and Racotta, I.S., 2007. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. Aquaculture, 268: 123-135.

Parado-Esteva, F.D., Llobrera, J.A., Villaluz, A. and Salde, R., 1993. Survival and metamorphosis of *Penaeus monodon* larvae at different salinity levels. Israelian Journal of

Bibliographie

- Parado-Esteva, F.D., Llobrera, J.A., Villaluz, A. and Salde, R.,** 1993. Survival and metamorphosis of *Penaeus monodon* larvae at different salinity levels. *Israelian Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 45 (1), 3–7.
- Pelis, R. M., Zydlewski, J., and Cormick, S. D. M.,** 2001. Gill Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *American Journal of Physiology, Reg I*, 28: R1844-R1852.
- Péqueux, A.,** 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15: 1–60.
- Peterson, G.L., Edwing, R.D. and Conte, F.P.,** 1978. Membrane differentiation and de novo synthesis of the (Na⁺+K⁺)-activated adenosine triphosphate during development of *Artemia salina nauplii*. *Developmental Biology*, 67: 90-98.
- Pham, D., Vourey, E., Ansquer, D. and Walling, E.,** 2008. Biosécurité en éclosion : le rinçage des *Artemia*. Fiche biotechnique 2008-02: 3pp.
- Pham D., Wabete N., Lemaire P., Mailliez J-R., Broutoi F. and Chim L.,** 2009a. Could antioxidant status and oxidative stress bio-indicators be used to assess shrimp offspring quality ? Larvi 2009, 5th fish and shellfish larviculture symposium, September 7-10, 2009, Ghent University, Belgium. Minipaper : 4 pp.
- Pham D., Wabete N., Mailliez J-R., Broutoi F., Chim L.,** 2009b. Live preys in shrimp culture : nutritional and sanitary considerations on the use of *Artemia* in New Caledonia. 11^{ème} Inter-Congrès des Sciences du Pacifique/2^{ème} Assises de la Recherche Française dans le Pacifique, Papeete, Tahiti, 2-5 mars 2009. Poster.
- Piermarini, P. M. and Evans, D. H.,** 2000. Effects of environmental salinity on Na⁺/K⁺-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *Journal of Experimental Biology*, 203: 2957–2966.
- Poitras, E., Houde, A.,** 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2 (2): 2-11.
- Preston, N.,** 1985. The effects of temperature and salinity on survival and growth of larval *Penaeus plebejus*, *Metapenaeus macleayi* and *M. bennettiae*. In: Rothlisberg, P.C., Hill, B.J., Staples, D.J. (Eds.), *Second Australian National Prawn Seminar. NPS2*, Cleveland, Australia: 31–40.
- Prosner, C.L.,** 1973. Inorganic ions. In: Prossner, C.L. Ed., *Comparative Animal Physiology*. Saunders, Philadelphia, PA: 79–110.

Putzenlechner, M., 1994. Charakterisierung und Lokalisation einer Protonen-ATPase des V-typs in den Kiemen dekapoder Krebse (Crustacea, Dekapoda). Ph.D. Dissertation, Freien Universität, Berlin.

Putzenlechner, M., Onken, H., Klein, U. and Graszynski, K., 1995. Electrogenic Cl⁻ uptake across the gill epithelium of *Eriocheir sinensis*: energized by a V-type ATPase? Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft, 85, 160.

- R -

Read, G.H.L., 1984. Intraspecific variation in the osmoregulatory capacity of larval, post-larval juvenile and adult *Macrobrachium petersi* (Hilgendorf). Comparative Biochemistry and Physiology, 78A: 501-506.

Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S. and Schulte, P. M., 2003. Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. Journal of Experimental Biology, 206: 4475–4486.

Riestenpatt, S., Onken, H. and Siebers, D., 1996. Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-flux studies. Journal of Experimental Biology, 199: 1545-1554.

Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z, Zielenski, J, et al., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science, 245: 1066-1073.

Robertson, O., Bray, W., Leung-Trujillo, J. and Lawrence, A., 1987. Practical molt stg of *Penaeus setiferus* and *P. stylirostris*. Journal of Aquaculture Society, vol. 18, n° 3:180-185.

Romano, N. and Zeng, C., 2006. The effects of salinity on the survival, growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. Aquaculture, 260: 151-162.

Rothlisberg P.C., 1999. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. Aquaculture 164: 49–65.

- S -

- Saitou, N. and Nei, M.**, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Samocha, T. M., Guajardo, H., Lawrence, A. L., Castille, F. L., Speed, M., Mckee, D. A. and Page, K. I.**,1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 165: 233–242.
- Sang, H.M. and Fotedar, R.**, 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) reared at different salinities. *Aquaculture*, 234: 601-614.
- Santos, L.C.F., Belli, N.M., Augusto, A., Masui, D.C., Leone, F.A., Mc Namara, J.C. and Furriel, R.P.M.**, 2007. Gill (Na⁺,K⁺)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps : species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, A* 148: 178-188.
- Saoud, I. P., Davis, D. A. and Rouse, D. B.**, 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture*, 217: 373–383.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P. and Vonau, V.**, 2000. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *Diseases of aquatic organisms*, 40 (2): 109-115
- Scott, G. R., Richards, J. G., Forbush, B., Isenring, P., and Schulte, P. M.**, 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 287: C300-C309.
- Serrano, L., Towle, D.W., Charmantier, G. and Spannings-Pierrot, C.**, 2007. Expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit mRNA during embryonic development of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 2: 126-134.
- Singer, T. D., Clements, K. M., Semple, J. W., Schulte, P. M., Bystriansky, J. S., Finstad, B., Fleming, I. A., and McKinley, R. S.**, 2002. Seawater tolerance and gene expression in two strains of Atlantic salmon smolts. *Journal of Canadian Fisheries and Aquatic Science*, 59: 125-135.

Sommer, M. J. and Mantel, L. H., 1988. Effect of dopamine, cyclic AMP and pericardial organs on sodium uptake and Na⁺K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* (L). *Journal of Experimental Zoology*, 248: 272–277.

Sommer, M. J. and Mantel, L. H., 1991. Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab, *Carcinus maenas* (L). *General and Comparative Endocrinology*, 82: 364–368.

Soulard, B., Frappier, J., Herlin, J. et Beliaeff B., 2009. STYLOG, : base de données pour le suivi des élevages de crevettes de Nouvelle-Calédonie. 11^{ème} Inter-Congrès des Sciences du Pacifique/2^{ème} Assises de la Recherche Française dans le Pacifique, Papeete, Tahiti, 2-5 mars 2009. Poster.

Shull, G. E., Schwartz, A. and Lingrel, J. B., 1985. Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺+K⁺)ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature*, 316: 691–695.

Shull, G. E., Lane, L. K. and Lingrel, J. B., 1986. Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na⁺K⁺)ATPase deduced from a cDNA. *Nature*, 321: 429–431.

Siebers, D., Leweck, K., Markus, H. and Winkler, A., 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Marine Biology*, 17: 291–303.

Silva, P., Solomon, R., Spokes, K. and Epstein, F. 1977. Ouabain inhibition of gill Na-K-ATPase: relationship to active chloride transport. *Journal of Experimental Zoology*, 199: 419-426.

Spanings-Pierrot, C., Soyeux, D., Herp, V.F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. and Charmantier, G., 2000. Involvement of crustacean hyperglycaemic neurohormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 340-350.

- T -

Tackaert, W., Abelin, P., Dhert, P., Leger, P., Grymonpre, D., Bombeo, R. and Sorgeloos, P., 1989. Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feeding procedures. *Aquaculture* 89 Feb 12, 1989. World Aquaculture Society, Los Angeles, CA : 1– 15.

- Tamura, K., Dudley J., Nei, M. and Kumar, S.,** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tang, C. H., and Lee, T. H.,** 2007. The effect of environmental salinity on the protein expression of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, A*, 147(2): 521-528.
- Taylor, H.H. and Taylor, E.W.,** 1992. Gills and lungs: The exchange of gases and ions. In: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol 10. Decapod Crustacea. Wiley-Liss, New York: 203–293.
- Therien, A.,G. et Blostein, R.** (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 279: C541-C566.
- Thiyagarajan, V., Harder, T. and Qian, P.-Y.,** 2003. Combined effects of temperature and salinity on larval development and attachment of the subtidal barnacle *Balanus trigonus* Darwin. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 287: 223-236.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. et Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22 (22):4673-4680.
- Thuet, P., Charmantier-Daures, M. et Charmantier, G,** 1988. Relation entre osmoregulation et activités d'ATPase Na⁺-K⁺ et d'anhydrase carbonique chez les larves et les postlarves de *Homarus gammarus* (L.) (Crustacez : Decapoda). *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 115: 249-261.
- Tipsmark, C. K., Madsen, S. S., Seidelin, M., Christensen, A. S., Cutler, C. P., and Cramb, G.,** 2002. Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺-ATPase expression in the branchal epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology*, 293: 106-118.
- Torres, G., Luis Gimenez, L., and Anger, K.,** 2002. Effects of reduced salinity on the biochemical composition (lipid, protein) of zoea 1 decapod crustacean larvae. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 277: 43-60.
- Torres, G., Charmantier-Daures, M., Chifflet, S. and Anger, K.,** 2007. Effects of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the

gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, (147): 460–465.

Towle, D.W. and Weihrauch, D., 2001. Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. American Zoology, 41 : 770-780.

Towle, D.W, Paulsen, R.S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J.H. and Spanings-Pierrot, C. 2001. Na^+K^+ -ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. Journal of Experimental Biology , 204: 4005–4012 .

Tresguerres, M., Katoh, F., Fenton, H., Jasinska, E. and Goss, G.G., 2005. Regulation of branchial V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase and NHE2 in response to acid and base infusions in the Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). Journal of Experimental Biology, 208: 345–354.

Tresguerres, M., Parks, S.K. and Goss, G.G, 2006. V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase and NHE2 immunoreactivity in the gill epithelium of the Pacific hagfish (*Epatretus stoutii*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 145: 312–321.

Tsai, J.R. and Lin, H.C., 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. Journal of Experimental Biology, 210, 620-627.

Tse, W.K.F., Au, D.W.T. and Wong, C.K.C., 2006. Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill chloride and pavement cells of seawater acclimating eels. Biochemical and Biophysical Research Communication, 346 (4): 1181-1190.

- V -

Villegas, C. T. and Kanazawa, A., 1980. Rearing of the larval stages of prawn, *Penaeus japonicus* BATE, using artificial diet. Memoirs of the Kagoshima University Research Center, South Pacific 1: 43–49.

- W -

- Wabete, N., Chim, L., Pham, D., Lemaire and P., Massabuau, J.-C.**, 2006. A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress. *Aquaculture*, 260: 181-193.
- Wang, W-N, Wang, A-L, Wang, D-M., Wang, L-P., Liua, Y. and Sun, R-Y.**, 2003. Calcium, phosphorus and adenylate levels and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*: 297–305.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., and Towle, D.W.**, 2001. Molecular characterization of V-Type $\text{H}^+\text{-AT-Pase}$ (β -subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *Journal of Experimental Biology*, 204: 25-37.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D. and Towle, D.W.**, 2002. Active ammonia excretion across the gills of the green shore crab *Carcinus maenas*: participation of $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$, V-type $\text{H}^+\text{-ATPase}$ and functional microtubules. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2765–2775.
- Weihrauch, D., McNamara, J.C., Towle, D.W. and Onken, H.**, 2004. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *Journal of Experimental Biology*, 207: 4623-4631.
- Wilson, J. M., Laurent, P., Tufts, B. L., Benos, D. J., Donowitz, M., Vogl, A. W. and Randall, D. J.**, 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *Journal of Experimental Biology*, 203, 2279–2296.
- Wu, Y.-C., Lin, L.-Y., and Lee, T.-H.**, 2003. Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransporter : a novel marker for identifying freshwater- and seawater-type mitochondria-rich cells in gills of the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoological Studies*, 42(1): 186-192.
- Wyban, J.**, 2008. World shrimp farming revolution : industry impact of domestication and breeding of SPF *P. vannamei*. World Aquaculture Society, Busan, South Korea, 19-23 mai 2008.

- X -

Xie Y., Langhans-Rajasekaran, S. A., Bellovino, D. et Morimoto T.(1996). Membrane Translocation of the Newly Synthesized Polypeptide: implications for the membrane topology. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 2563–2573.

- Y -

Ye, L., Jiang, S., Zhu, X., Yang, Q., Wen, W. and Wu, K., 2009. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 290: 140-144.

Young, A.M. and Hazlett, T.L.III., 1978. The effect of salinity and temperature on the larval development of *Clibanarius Vittatus* (Bose) (Crustacea : Decapoda: Diogenina). *Journal of Experimental Biology and Ecology*, vol. 34: 131-141.

- Z -

Zacharia, S. and Kakati, V.S., 2004. Optimal salinity and temperature for early developmental stages of *Penaeus merguensis* De man. *Aquaculture*, 232: 373–382.

Zhang, P., Zhang, X., Li, J. and Tianxiang Gao, T., 2009. Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 40, 1419-1427.

Ziegler, A., (1997). Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁺-ATPase in the calcium transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L. (Crustacea). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45: 437-446.

Bibliographie

Résumé

L'étude de l'ontogenèse de l'osmorégulation a été entreprise chez la crevette bleue *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. L'implication des tissus de la cavité branchiale dans la régulation ionique a été déterminée au préalable chez des juvéniles par immunolocalisation de trois transporteurs protéiques d'ions, (la NKA, le co-transporteur NKCC1 et le CFTR) et par la détection de ionocytes en microscopie électronique. Le rôle de la NKA a été particulièrement étudié et son implication a été examinée au cours du développement post-embryonnaire par une approche intégrative associant des études physiologiques, histologiques, immunologiques et moléculaires. Cette démarche nous a permis de proposer un modèle d'osmorégulation chez *L. stylirostris*: de faible régulatrice dans les premiers jours de sa vie, cette espèce évolue vers l'hyper-hypo-régulation après la métamorphose avec le développement progressif des épipodites et des branchies. L'immunofluorescence prononcée de la NKA ainsi que l'abondance des transcrits du gène codant la NKA dans les tissus de ces deux organes suggèrent leur implication fonctionnelle dans l'ionorégulation. Les résultats de ce travail nous ont permis d'accroître nos connaissances sur l'osmorégulation chez les pénéidés et de proposer des améliorations zootechniques visant à augmenter leur confort physiologique. Ces préconisations ont fait l'objet de premiers essais en conditions d'élevage et se sont traduites par un doublement de la croissance des post-larves de 19 jours.

Abstract

The ontogeny of osmoregulation was studied in the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia. The implication of branchial organs in ionic regulation was first demonstrated in juveniles by immunolocalization of three ion transporting proteins (namely NKA, co-transporter NKCC1 and CFTR) and ionocyte detection was done by means of electron microscopy. The role of the main ion transporting enzyme, NKA, was subsequently investigated during post-embryonic development using an integrative approach associating physiological, histological, immunological and biomolecular studies. Results obtained allowed us to propose a model of the osmoregulatory pattern in *L. stylirostris* based on weak regulation in the early stages, then progressively this species acquires the adult pattern of hyper-hypo-regulation after metamorphosis with the concurrent development of epipodites and gills. Strong NKA immunofluorescence and abundance of NKA transcripts in these two tissues compared to others organs suggest their functional implication in osmoregulatory processes. The results of this study allow us to increase our knowledge of the penaeid shrimp osmoregulation and to propose zootechnical measures to improve the animal physiological comfort. These propositions have been already tested during larval rearing trials, leading a two-fold-growth in 19 days-old postlarvae.