



**Evaluation des conséquences  
d'une situation hypoxique simulée  
sur la Capacité Osmorégulatrice  
des crevettes d'élevage,**

*Penaeus stylirostris et Penaeus vannamei.*



Centre Océanologique du Pacifique

B.P. 7004 TARAVALO - TAHITI - Polynésie Française  
Tél. 57 12 74 - Télécopie : (689) 57 24 77

**Evaluation des conséquences  
d'une situation hypoxique simulée  
sur la Capacité Osmorégulatrice  
des crevettes d'élevage,**

*Penaeus stylirostris et Penaeus vannamei.*

*par*

*Claude SOYEZ*

**FICHE DOCUMENTAIRE**

Type de rapport : Rapport interne	
Numéro d'identification du rapport : <u>DRV/AQ/TAH 97.31</u> Diffusion : libre Validé par : Adresse électronique :	date de publication 17/07/1997 nombre de pages: 55 bibliographie : Oui illustration(s) : Oui langue du rapport : Français
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> Evaluation des conséquences d'une situation hypoxique simulée sur la Capacité Osmorégulatrice des crevettes d'élevage, <i>Penaeus stylirostris</i> et <i>Penaeus vannamei</i>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Soyez Claude, Aquacop	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> DRV/RA/Aquaculture Tropicale
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche : Programme : Convention : Projet : Autres (préciser) : Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	
<b>Résumé :</b> Les résultats exposés dans ce rapport apportent des informations sur la Capacité Osmorégulatrice des crevettes d'élevage, <i>Penaeus stylirostris</i> et <i>P. vannamei</i> , face à un abaissement de l'oxygénation ambiante. Ces résultats s'appliquent à des juvéniles placés dans des conditions optimum en laboratoire mais à niveau métabolique bas : animaux à jeun, en stade d'intermue C, adaptés après dissipation du stress induit par la pêche et le transfert dans un nouvel environnement. Les mesures ont confirmé que les crevettes présentent une zone d'indépendance osmorégulatrice au-dessus de 3 mg O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> et une zone de dépendance osmorégulatrice qui commence au-dessous de cette valeur. Ces résultats vont également dans le sens de ceux obtenus sur les tests de croissance et de survie (Aquacop, 1988) qui ont montré qu'une influence s'exerçait sur les gains de poids et la survie au-dessous de la même valeur.  Au total, les juvéniles de crevettes de <i>P. stylirostris</i> et de <i>P. vannamei</i> présentent une bonne tolérance à l'hypoxie ambiante, que celle-ci résulte d'une exposition accidentelle de courte durée ou bien d'un traitement à longue durée qui semble par ailleurs la renforcer. Les résultats de croissance obtenus à long terme chez <i>P. stylirostris</i> sur la capacité osmorégulatrice et la croissance à une concentration moyenne de 2 mg O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> semblent repousser au-dessous de 3 mg O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> la limite adaptative des crevettes à l'hypoxie.	
<b>Mots-clés :</b> Aquaculture tropicale, péneïdes, respiration, hypoxie, stress, osmorégulation, adaptation	
Commentaire :	

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	4
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODE</b> .....	7
2.1. TAXONOMIE DE L'ESPÈCE ÉTUDIÉE .....	7
2.2. CYCLE BIOLOGIQUE .....	7
2.3. RÉPARTITION ET ÉLEVAGE.....	8
2.4. PHYSIOLOGIE DE LA RESPIRATION CHEZ LES CREVETTES PÉNÉIDES .....	8
2.4.1. Appareil respiratoire.....	8
2.4.2. Transport de l'oxygène .....	9
2.4.3. Influence de l'hypoxie sur le transport de l'oxygène.....	9
2.5. PHYSIOLOGIE DE L'OSMORÉGULATION .....	10
2.5.1. Osmorégulation, Capacité Osmorégulatrice (CO).....	10
2.5.2. L'activité de la $Na^+ - K^+$ ATPase .....	11
2.5.3. Principe de la mesure de la pression osmotique.....	12
2.6. ETUDE PRÉLIMINAIRES SUR LES CRITÈRES DE VARIATION .....	14
2.6.1. Pêche et stabulation.....	14
2.6.2. Choix du stade d'intermue .....	16
2.6.2.1. Généralités.....	16
2.6.2.2. Détermination des stades d'intermue .....	18
2.6.3. Choix de la taille.....	21
2.6.4. Alimentation .....	22
2.7. PROTOCOL EXPÉRIMENTAL .....	22
2.7.1. La salle expérimentale et bacs expérimentaux .....	22
2.7.2. Régulation du taux d'oxygène dissous.....	23
2.7.3. Initialisation des expériences au niveau des bacs hypoxiques .....	24
2.7.4. Acquisition de l'information .....	25
2.7.5. Expression des résultats.....	25
2.8. INFLUENCE D'UN STRESS HYPOXIQUE PROLONGÉ SUR LA CAPACITÉ OSMORÉGULATRICE CHEZ <i>P. STYLIROSTRIS</i> 26	
2.8.1. Protocole.....	26
2.8.2. Plan expérimental.....	26
<b>3. RESULTATS</b> .....	27
3.1. INFLUENCE D'UN STRESS HYPOXIQUE COURT SUR LA CAPACITÉ OSMORÉGULATRICE.....	27
3.1.1. Influence de la teneur en oxygène combinée à la durée d'exposition sur la CO chez <i>P. stylirostris</i> .....	27
3.1.1.1. Analyse de variance .....	27
3.1.1.2. Résultats bruts des moyennes des expériences.....	28
3.1.1.3. Effet de la concentration de l'oxygène.....	28

3.1.1.4. Effet de la durée d'exposition .....	29
3.1.1.5. Interaction des facteurs testés .....	30
3.1.1.6. Survie .....	31
3.1.2. Influence de la teneur en oxygène combinée à la durée d'exposition sur la CO chez <i>P. vannamei</i> .....	32
3.1.2.1. Résultats bruts des moyennes des expériences.....	33
3.1.2.2. Effet de la concentration de l'oxygène.....	33
3.1.2.3. Effet de la durée d'exposition .....	34
3.1.2.4. Interaction des facteurs testés .....	35
3.1.2.5. Survie .....	36
3.1.3. Résultats de l'exposition prolongée à l'hypoxie chez <i>P. stylirostris</i> .....	36
3.1.3.1. Homogénéité des paramètres physico-chimiques .....	36
3.1.3.2. La croissance.....	38
3.1.3.3. La Capacité Osmorégulatrice .....	41
<b>4. DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>	<b>43</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUCTION

En aquaculture, des variations nyctémérales du taux d'oxygène dissous sont fréquemment observées. Les apports alimentaires et l'accumulation des déchets, proportionnels à la charge des élevages en sont directement responsables. Ils génèrent une eutrophisation des milieux et de fortes hypoxies en phase nocturne. Plus la charge est élevée plus l'eutrophisation est intense. L'élimination des déchets d'élevage passe par une voie oxydative, la nitrification qui fait appel à des bactéries aérobies. Une bonne gestion des bassins est primordiale notamment le contrôle des déchets organiques et du phytoplancton qui concurrencent fortement l'animal dans l'utilisation de l'oxygène. (Aquacop et al., 1988). En l'absence de ce contrôle, les baisses d'oxygène peuvent affecter considérablement la croissance et la fréquence de mue (Seidman et Laurence, 1985 ; Clark, 1986 ; Aquacop et al., 1988 ; Allan et Maguire, 1991) et provoquer des mortalités dans les élevages (Wickins, 1976 ; Madenjian et al., 1987). Le niveau létal d'oxygène dissous a été rapporté pour plusieurs espèces de crevettes péneides incluant *Penaeus japonicus* (Egusa, 1961 ; Tournier, 1972), *P. kerathurus* (Tournier, 1972), *P. schmitti* (MacKay, 1974), *P. monodon* (Liao et Huang, 1975 ; Allan et Maguire, 1991), *P. vannamei* (Boyd, 1989, cité par Hopkins et al., 1991) varie entre 0,2 et 1,0 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. En ce qui concerne l'espèce *P. vannamei*, susceptible de culture intensive (Aquacop et al., 1977, Sandifer et al., 1987, 1988), la concentration pour l'oxygène dissous létal serait de 1 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> (Hopkins et al., 1991). Des études ont montré que le potentiel de croissance n'est pas atteint pour une valeur constante d'oxygène dissous de 2 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> (Seidman et Lawrence, 1985). Aquacop et al. (1988) rapportent que la survie et la croissance d'adultes et de juvéniles de *P. vannamei* diminuent pour une valeur constante de 1,5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> ou pour une fluctuation de l'oxygène dissous (6 heures à une teneur de 1,5 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> et 18 heures à saturation). Pour une teneur constante de 3 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> ou des régimes fluctuants (6 heures à 1,5 O<sub>2</sub> mg.l<sup>-1</sup> et 18 heures à 20 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>) (6 heures à 3 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> et 18 heures en hyperoxie à 20 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>), Aquacop et al. (1988) constatent que la survie et la croissance d'adultes et de juvéniles ne sont pas affectés. Le taux de croissance augmente chez des juvéniles (3 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> constant) et chez des adultes (fluctuations nyctémérales 3-20mg.O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>).

Ces résultats justifient de maintenir au niveau des élevages, une teneur minimale de 3.mg.O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. Un système d'aération (*Paddle Wheel*<sup>®</sup>, *Aire-O<sub>2</sub>*<sup>®</sup>) ne régulant l'oxygène qu'à

partir de ce seuil limite influencera de façon positive le bilan d'exploitation d'une ferme par le gain d'énergie qu'il induit.

Il a été nécessaire de recourir à des tests de croissance et de survie pour déterminer cette valeur de  $3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ . La croissance et la survie à elles seules ne renseignent sur l'état de stress des animaux qu'à l'issue d'expériences menées à long terme (Aquacop, 1988). Ce type de stress continu ne se rencontre jamais dans les élevages. De façon plus pratique pour les aquaculteurs, une appréciation instantanée de l'état physiologique des péneides paraît d'avantage souhaitable.

La Capacité Osmorégulatrice (CO), a été proposée comme indicateur de condition de l'état des organismes (Charmantier et al., 1989, 1993 ; Lin et al., 1991 ; Young-Lai et al., 1991, Cochard et al., 1992). Elle a été précédemment utilisée afin de déterminer le stress de polluants (Lin et al., 1992) et de toxiques (Cochard et al., 1996) sur des crevettes péneides d'élevages. La mesure de la CO, qui est le gradient osmotique entre la pression osmotique (PO) de l'hémolymphe et la PO du milieu extérieur pour une salinité donnée a été utilisée dans l'étude de l'effet subléthal de plusieurs stress et de certains toxiques chez différentes espèces de crustacés (Charmantier-Daures et al., 1988 ; Charmantier et al., 1989, 1993 ; Young-Lai et al., 1991 ; Lin et al., 1991, 1993 a, 1993 b ). L'effet de la réduction de l'oxygène dissous sur la pression osmotique a été reporté chez *Carcinus maenas* (Spaargaren, 1977), *Palaemon adspersus* (Hagerman et Uglow, 1981), et *Crangon crangon* (Hagerman et Uglow, 1981). Chez ces deux dernières espèces, la régulation ionique est influencée par l'hypoxie. L'osmorégulation est susceptible d'être affectée par le cycle de mue (Mantel et Farmer, 1983 ; Charmantier et al., 1993). L'ammoniaque diminue l'hyper-CO (CO chez des animaux en eau diluée) et l'hypo-CO (CO chez des animaux en eau de mer) chez *P. japonicus* après 48h LC<sub>50</sub> d'exposition (16 (1,3) et 32 mg (2,2 NH<sub>3</sub>-N.l<sup>-1</sup>) et davantage pour une valeur 96h LC<sub>50</sub> de 52,7 mg N.l<sup>-1</sup> (.3,1 NH<sub>3</sub>-l<sup>-1</sup>). La turbidité (35 NTU), après 3 semaines d'exposition, influence significativement l'hypo-CO à 42‰ de salinité et l'hyper-CO à 15‰ de salinité (Charmantier et al., 1989 ; Lin et al., 1991). Chez une espèce fortement osmorégulatrice, une diminution de la capacité osmorégulatrice peut être considérée comme indicatrice d'un dysfonctionnement de ces mécanismes de régulation (Charmantier et al., 1994).

Ce travail s'est donc attaché à définir la capacité adaptative des crevettes *P. stylirostris* et *P. vannamei* à l'hypoxie en utilisant la Capacité Osmorégulatrice comme indice de

condition. Cette capacité adaptative est mesurée par la pression osmotique de l'hémolymphe et par la croissance à l'occasion d'un stress à long terme.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'objectif prioritaire de l'équipe d'écophysiologie du LAT (Laboratoire d'Aquaculture Tropicale) au Centre Océanologique du Pacifique à Tahiti qui s'attache, entre autres, à la mise au point de méthodes pratiques permettant l'évaluation de l'état physiologique des crevettes.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 2.1. Taxonomie de l'espèce étudiée

La position systématique des crevettes *Penaeus stylirostris* et *P.vannamei* est la suivante :

Embranchement : Arthropodes

Classe : Crustacés

Sous classe : Malacostracés

Super ordre : Eucarides

Ordre : Décapodes

Sous ordre : Natantia

Famille : Penaeidae

Sous famille : Penaeidae

Genre : *Penaeus* (Fabricius, 1789)

Espèce : *stylirostris* (Stimpson, 1874)

Espèce : *vannamei* (Boone, 1931)

Les souches de *P. stylirostris* et *P. vannamei* utilisées dans le cadre de ce travail sont élevées en captivité au COP (Centre Océanologique du Pacifique) depuis une vingtaine d'année. La souche *P. stylirostris*, référencée SPR 43, a notamment développé une résistance au virus IHHN (Weppe et al., 1992).

### 2.2. Cycle Biologique

La ponte a lieu en mer. Après une courte période de développement embryonnaire allant des stades zoe à mysis, les larves mènent une vie pélagique pendant une quinzaine de jours. Les jeunes crevettes âgées de 20 jours, généralement appelées post-larves, se concentrent près des côtes et pénètrent fréquemment dans les estuaires et les lagunes d'eau saumâtre. Après quelques semaines de croissance, les crevettes cherchent à retrouver la mer où se poursuivra leur cycle biologique (Laubier, 1986). Les pénéides, euryhalines, subissent au cours de leur développement des variations de salinité allant de 5 à 45 ‰.

### 2.3. Répartition et élevage

*Penaeus stylirostris* et *P. vannamei* se trouvent à l'état naturel, le long des côtes Pacifique de l'Amérique latine; Du Pérou à Baja au Mexique pour la première et du nord péruvien jusqu'à Sonora au Mexique pour la seconde.

L'élevage de ces deux espèces s'est considérablement développé ces 20 dernières années essentiellement en Equateur dont la production dépasse les 95 000 tonnes/an. La Colombie, le Honduras ainsi que le Mexique en produisent chacun environ 8000 tonnes/an. Le Pérou et les Etats-Munis en produisent 3000 et 2000 tonnes/an respectivement.

Les TOM Français du Pacifique produisent également des crevettes pénéides mais à une échelle plus réduite. La production a atteint 1000 tonnes en 1996. En Nouvelle Calédonie, la mise au point d'une technique semi-intensive a permis le développement de plusieurs fermes de moyenne importance.

### 2.4. Physiologie de la respiration chez les crevettes Pénéides

#### 2.4.1. Appareil respiratoire

Les Crustacés utilisent l'oxygène pour leurs besoins énergétiques. Le principe même de leur respiration repose sur la nécessité d'approvisionner cet oxygène et d'éliminer le dioxyde de carbone, résidu du processus oxydatif. Les crustacés respirent l'oxygène dissous dans l'eau. Chez la plupart des animaux, vertébrés ou invertébrés, la réponse la plus brève face à une réduction de l'oxygène ambiant est marquée par une hyper ventilation se traduisant par une plus grande quantité d'oxygène affluant au niveau des surfaces d'échange des branchies.

Les branchies sont contenues dans deux cavités branchiales qui assurent leur protection et la circulation de l'eau. Les branchies sont composées de fines lamelles organisées symétriquement autour d'un axe central dont la surface décroît de la base vers l'apex de la branchie. Cet axe contient les vaisseaux sanguins afférents et efférents.

L'échange gazeux au niveau de la branchie s'effectue par diffusion. Celle-ci n'est pas suffisante pour les besoins respiratoires d'un animal qui évolue dans un milieu ambiant, l'eau,

dont le coefficient de diffusion est infiniment plus faible que celui de l'air d'où la nécessité d'une ventilation forcée : les battements rythmiques de certaines pièces buccales, les *scaphognathites*, induisent un mouvement d'eau permanent vers les branchies et l'oxygénation de celles-ci. Cette ventilation qui dépend de la demande en énergie de l'animal, est affectée par des facteurs externes comme le pH, la température, la teneur en oxygène ou des stress (présence de toxiques dans l'eau, manipulation, etc.).

Il existe également une respiration tégumentaire, difficilement quantifiable chez les adultes mais qui existe chez les larves avant que les branchies ne soient pleinement formées et actives.

#### 2.4.2. Transport de l'oxygène

Une fois passée la barrière branchiale, l'oxygène est transporté dans le sang (ou hémolymphe) par une protéine dissoute dans le plasma, l'hémocyanine. Constituant du plasma chez certains crustacés, dont les décapodes, l'hémocyanine sert, tout comme l'hémoglobine du sang chez les vertébrés, à véhiculer l'oxygène vers les différents tissus. L'hémocyanine est responsable de 92% de l'oxygène transporté chez le crabe *Leptograpsus variegatus* (Greenaway P. et al., 1992). Sa biosynthèse prend place dans les cyanocytes qui sont des cellules définies des tissus hématopoétiques et sont localisées à la base du rostre chez les Natantia (Bauchau et Mengeot, 1978).

#### 2.4.3. Influence de l'hypoxie sur le transport de l'oxygène

L'étude des réponses à l'hypoxie du système de transport de l'oxygène par le sang chez les Crustacés Décapodes démontrent l'intérêt adaptatif d'une augmentation de l'affinité du pigment respiratoire pour l'oxygène dans un environnement hypoxique. Les facteurs intrinsèques, comme la salinité et l'oxygène du milieu ont une influence sur la concentration de l'hémocyanine dans l'hémolymphe du crabe *Callinectes sapidus*. La dépression de la salinité et de l'oxygène ou simplement un manque d'oxygène ont révélé en laboratoire une augmentation de l'hémocyanine chez celui-ci (Defur et al. 1990). En condition hypoxique, l'hyperventilation induite conduit à une légère alkalose respiratoire (réduction de la pression partielle de CO<sub>2</sub> et augmentation du pH sanguin) et augmente l'affinité de l'oxygène de l'hémolymphe par effet Bohr (McMahon et al, 1974 ; Burnett, 1979). Depuis il a été

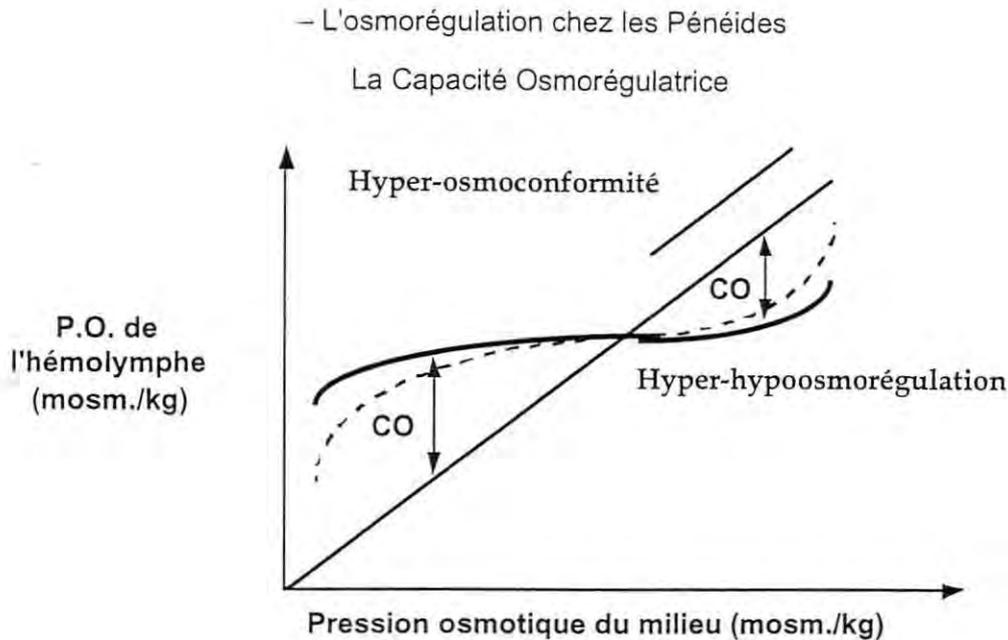
démontré que la concentration en hémocyanine est directement corrélée à la qualité de l'environnement et peut être utilisée comme indicateur de stress chez *C. sapidus* (Engel et Brouwer 1993).

Un certain nombre de travaux, réalisés en physiologie respiratoire ces dix dernières années, a démontré que de nombreux animaux aquatiques vivaient avec des pressions partielles d'oxygène dans le sang artériel beaucoup plus faibles que prévu (de l'ordre de 0,5 à 1,5 kPa) et cela indépendamment de la variation d'oxygène dans le milieu (entre 20 et 1,5 mg.O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>) (Massabuau et Burtin, 1984, Forge, Truchot et Massabuau, 1992). Ce fait a été démontré depuis chez *Peaneus japonicus* (Massabuau et al., sous presse). Cette valeur contrôlée jouerait un rôle clef dans le maintien de la consommation d'oxygène en conservant l'homéostasie du milieu intérieur, malgré des conditions d'oxygénation variables. Cela suggère, dans le cas d'une hypoxie sévère, qu'il y aurait diffusion constante vers le sang artériel tant que la pression de l'oxygène dissous dans le milieu ambiant reste supérieure à celui-ci.

## 2.5. Physiologie de l'osmorégulation

### 2.5.1. Osmorégulation, Capacité Osmorégulatrice (CO)

Les crevettes Pénéides présentent pour la plupart une régulation *hyper-osmotique* en milieu dilué et *hypo-osmotique* en milieux concentrés (schéma 1). Elles sont *euryhalines* et fortement *osmorégulatrices* (Charmantier, 1987). La capacité osmorégulatrice (CO) est l'aptitude de la crevette à maintenir un gradient de pression osmotique entre son hémolymphe et le milieu extérieur.



**Schéma 1** : Représentation schématique chez les pénéides de la régulation de la pression osmotique de l'hémolymphe en fonction de la pression osmotique du milieu ambiant. La Capacité Osmorégulatrice (CO) d'un animal stressé apparaît en traits pointillés.

### 2.5.2. L'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase

Les crustacés hypo-osmotiques, pour se débarrasser des ions qui les envahissent, doivent les transporter vers l'extérieur contre un gradient de concentration. Il est admis que la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase joue un rôle fondamental dans les transports ioniques actifs et donc dans l'osmorégulation chez les divers espèces aquatiques (Péqueux et Gilles, 1977; Towle, 1981, 1984; Mantel et Farmer, 1983; Péqueux et al., 1988). Elle est localisée au niveau des membranes baso-latérales des cellules épithéliales branchiales à l'interface entre le milieu extracellulaire et intracellulaire (Towle, 1981, 1984, 1990 ; Péqueux et al., 1988). Cette activité est variable en fonction du mode d'osmorégulation des crustacés mais également en fonction de la salinité du milieu extérieur. L'étude de l'activité de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase peut être nécessaire à la compréhension des phénomènes d'osmorégulation :

**En milieu hyper-osmotique :** L'animal est menacé par une entrée massive d'eau et une perte d'ions massive ; les pertes en ions sont le plus souvent compensées par une augmentation de leur absorption. Les faibles salinités provoquent une baisse de la perméabilité ionique des branchies et une augmentation du transport actif des ions  $\text{Na}^+$  (surtout). L'énergie nécessaire à ce transport est libérée par la lyse de l'ATP en ADP +  $\text{P}_i$ , réaction catalysée par la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase.

**En milieu hypo-osmotique :** La pression osmotique du milieu extérieur est forte et celle de l'hémolymphe plus faible, la tendance passive est à une perte d'eau et une invasion d'ions. Pour maintenir son équilibre ionique, l'organisme devra excréter cette surcharge saline.

### 2.5.3. Principe de la mesure de la pression osmotique

La mesure de la PO par l'osmomètre *Wescor 5500*<sup>®</sup> est basée sur la détermination de l'abaissement de la tension de vapeur d'une solution par rapport à la tension de vapeur du solvant. La mesure se fait en plaçant 10 $\mu\text{l}$  d'échantillon dans une chambre étanche de l'appareil (photo 7) dont le plafond contient un thermocouple.

Les animaux sont essuyés avec du papier absorbant. L'hémolymphe est prélevé sous la cuticule à la limite du dernier segment thoracique et du premier segment abdominal à l'aide d'une seringue à insuline de 1 ml (photo 6). L'hémolymphe est déposée sur un morceau de *Parafilm*<sup>®</sup> propre. Une quantité de 10 $\mu\text{l}$  est aussitôt reprise à l'aide d'une pipette et déposée sans délai dans l'osmomètre afin d'éviter la coagulation de l'hémolymphe. Pendant la mesure de la pression osmotique, le poids de l'animal est également déterminé.



Photo 1 : Prélèvement de l'hémolymphe.

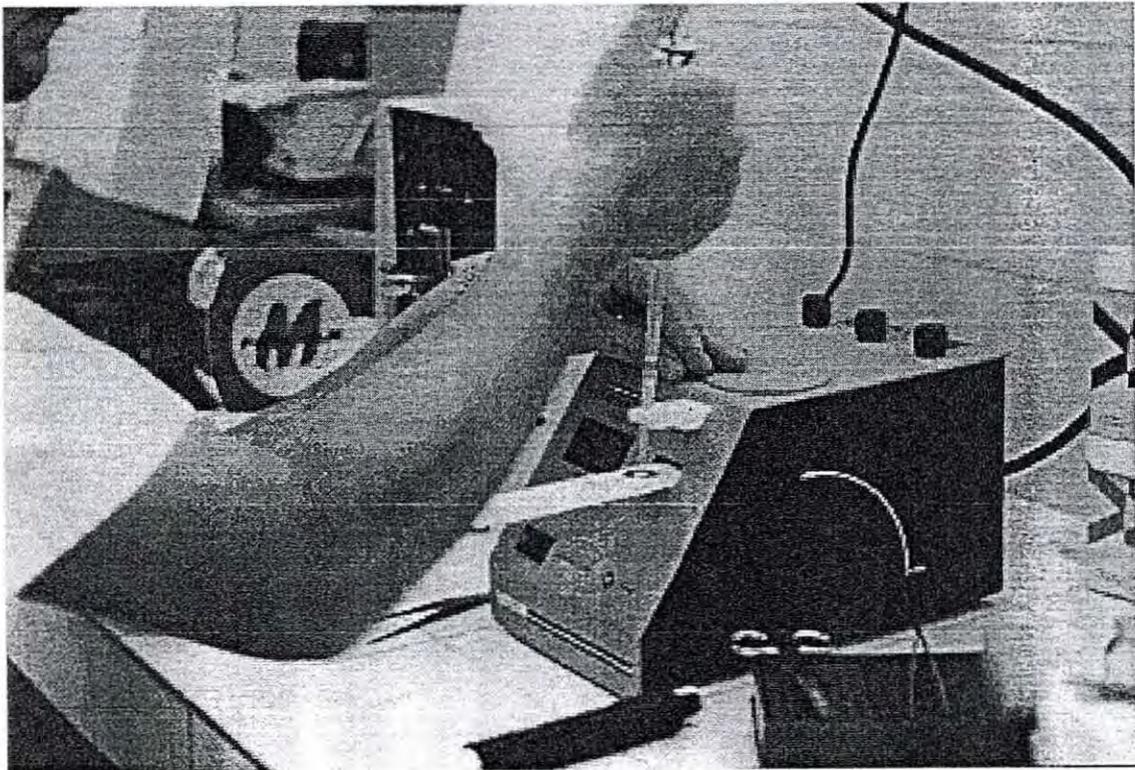


Photo 2 : Mesure de l'hémolymphe à l'osmomètre Wescor 5500.

## 2.6. Etude préliminaires sur les critères de variation

Le pouvoir de régulation métabolique des crustacés s'affaiblit aux niveaux métaboliques élevés induits par les activités locomotrice, trophique, de croissance (mue), etc (Taylor, 1976 ; Bridges et Brand, 1980). Aussi une étude en préliminaire à toute expérimentation a été entreprise pour éliminer les bruits de fond pouvant masquer l'effet réel que l'on désire mettre en évidence. Les connaissances acquises permettent de réduire considérablement la variance du phénomène étudié et donc augmenteront dans les mêmes proportions la puissance du test.

### 2.6.1. Pêche et stabulation

Les juvéniles de *P. stylirostris* et *P. vannamei* ont été produites par l'écloserie du Centre Océanologique du Pacifique (C.O.P) à Tahiti. Ils ont été élevés de façon semi-intensive dans des bassins de terre. Le milieu était continuellement renouvelé.(30%) L'alimentation est basée sur des aliments secs en granulés, optimisés en protéines, lipides et cendres (formulé au COP).

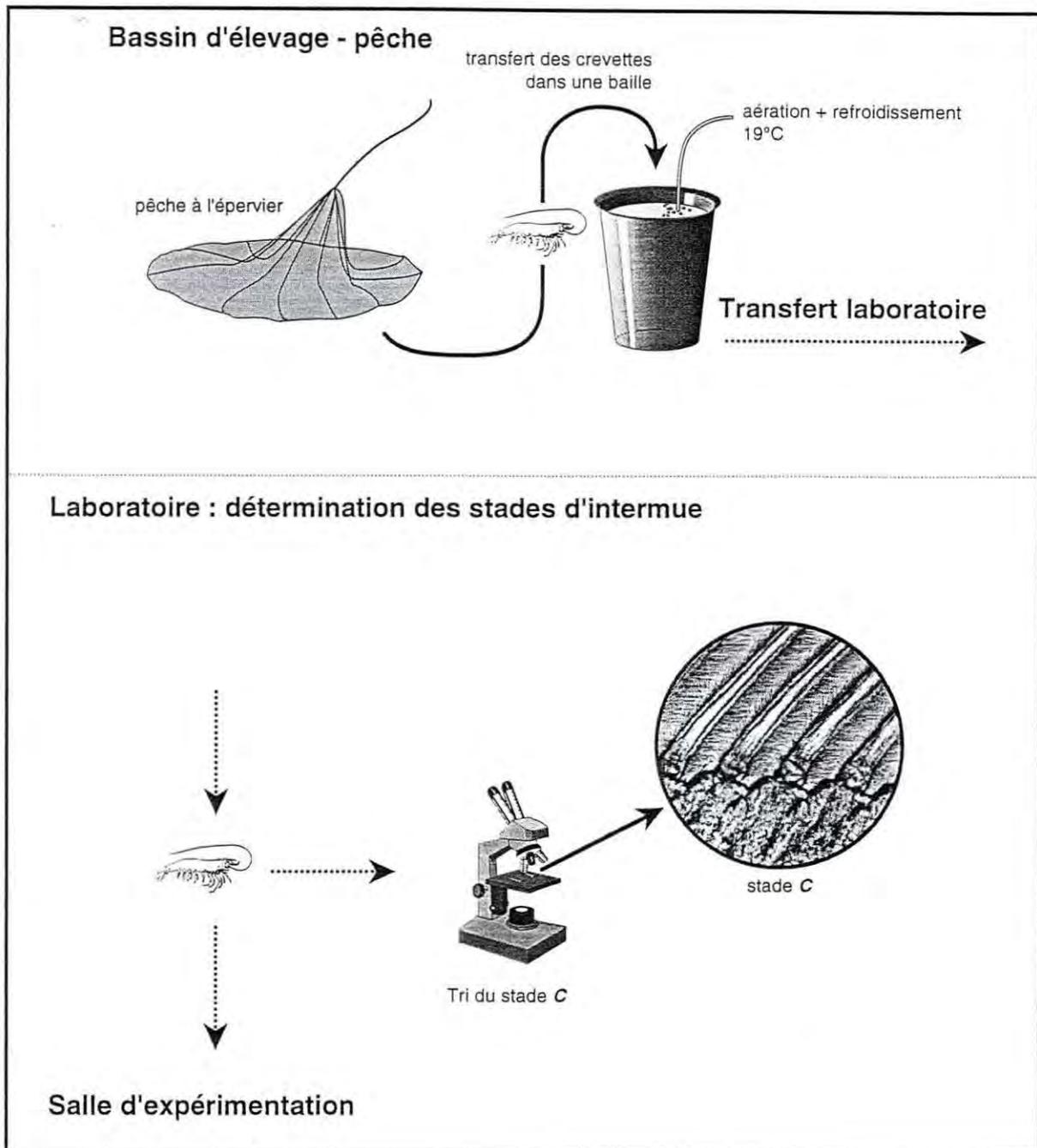


Schéma 2 : Protocole de la pêche et du transfert des crevettes

Les crevettes sont pêchées dans leur bassin d'origine à l'aide d'un filet de type « épervier ». Les crevettes sont aussitôt immergées dans de l'eau de mer refroidie à 19°C. Cette baisse de température calme les animaux en ralentissant leur métabolisme. Le stress manipulateur dû à la pêche et au transfert est ainsi réduit. Les crevettes sont ensuite très rapidement acheminées vers le laboratoire.

Pour que les crevettes puissent récupérer du stress induit par le transfert une stabulation s'avère nécessaire. Après un contrôle rapide des stades d'intermue, les crevettes sont réparties au hasard dans les bacs expérimentaux. Une vérification des mortalités occasionnées par le transfert est effectuée deux heures après celui-ci. Les mortes sont retirées des bacs et sont immédiatement remplacées. De façon générale, grâce au transfert en eau refroidies, les taux de mortalité restent très inférieurs à 5%.

Les crevettes sont maintenues en normoxie durant les 24 heures de stabulation. Des résultats concernant l'effet du stress de la pêche sur les CO suivant le temps de récupération, confirment que les CO doivent être mesurées soit directement après le pêche soit directement après une période d'adaptation d'au moins 24 heures (Cochard et al., 1996).

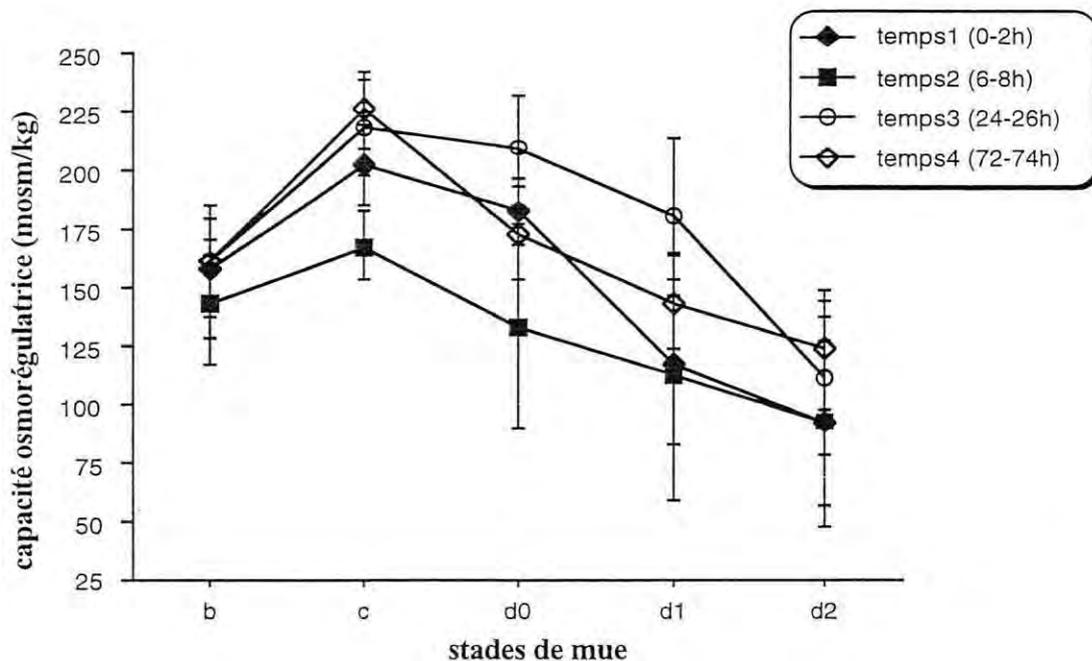


Figure 1 : Effet de la pêche sur la capacité osmorégulatrice au cours du temps.

## 2.6.2. Choix du stade d'intermue

### 2.6.2.1. Généralités

Au cours de leur croissance, tous les crustacés doivent régulièrement se dépouiller du squelette externe rigide, ou carapace, qui les empêche d'avoir une croissance continue. C'est

la présence à la mue d'une nouvelle carapace ou cuticule, fine et élastique qui permettra l'expansion du corps de l'animal.

C'est l'ensemble des modifications internes de l'animal pendant la phase séparant deux mues successives que l'on appelle cycle de mue. La longueur de cette période d'intermue dépend de l'âge de l'animal, de son environnement (température, oxygène, composition du milieu) et de son stade de maturité..

La croissance chez les crustacés résulte, à la mue, d'une importante entrée d'eau dans le corps, vraisemblablement via le tube digestif, ce qui a pour conséquence un accroissement considérable du volume du fluide corporel. Cet afflux d'eau provoque un gonflement des tissus qui, dans les stades suivants, gagneront en poids à concurrence du volume établi au moment de cette hydratation. L'augmentation de l'entrée d'eau durant la mue est vraisemblablement l'une des causes de l'augmentation de la sensibilité de l'animal aux substances toxiques (pesticides, ammoniacque, nitrites, etc.) ainsi qu'aux variations des facteurs environnementaux. De nombreux accidents en rapport avec la présence de toxiques dans le milieu se produisent en effet à la mue même en l'absence de modifications du milieu. A la mue, la demande en énergie, donc en oxygène, de l'animal est importante à un moment où ses surfaces respiratoires sont dans l'impossibilité de fonctionner normalement : chez de nombreux Crustacés, on note une augmentation de la concentration en pigments respiratoires avant la phase d'exuviation, ce qui seraient une manière de stocker provisoirement de l'oxygène (Phyllis, 1980). Pour illustrer cette demande supplémentaire d'oxygène, on peut noter certaines expériences effectuées chez des juvéniles de *Macrobrachium rosenbergii* : la consommation d'oxygène (à 26°C) s'accroît à partir du stade d'intermue (1,99 mg O<sub>2</sub>/g/h), passe par un pic à la mue (4,43 mg O<sub>2</sub>/g/h), puis décroît rapidement en postmue (3,27 mg O<sub>2</sub>/g/h). L'accroissement de cette consommation en oxygène est due à la dépense énergétique nécessaire pour l'entrée d'eau importante à l'exuviation et l'accroissement du métabolisme de base. Par rapport à la demande de base, le besoin au moment de la mue est donc multiplié par 2,2 dans cet exemple.

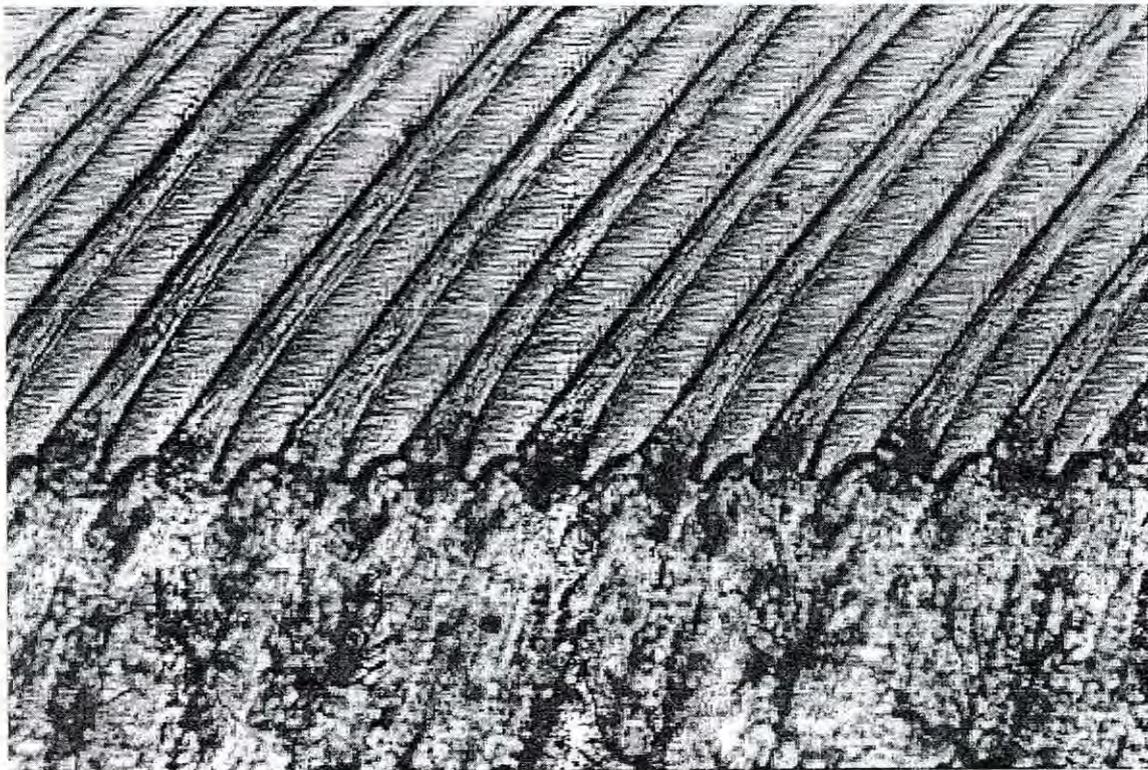
De très nombreux travaux font état des répercussions du déroulement du cycle de mue sur la pression osmotique et la composition ionique de l'hémolymphe. De façon générale, la pression osmotique atteint un maximum en fin de prémue et à la postmue pour diminuer et atteindre un minimum stable en stades d'intermue C et D0. Par conséquent la Capacité

Osmorégulatrice atteint un maximum à ce stade d'intermue (Charmantier et al., 1994, Cochard et al, 1996).

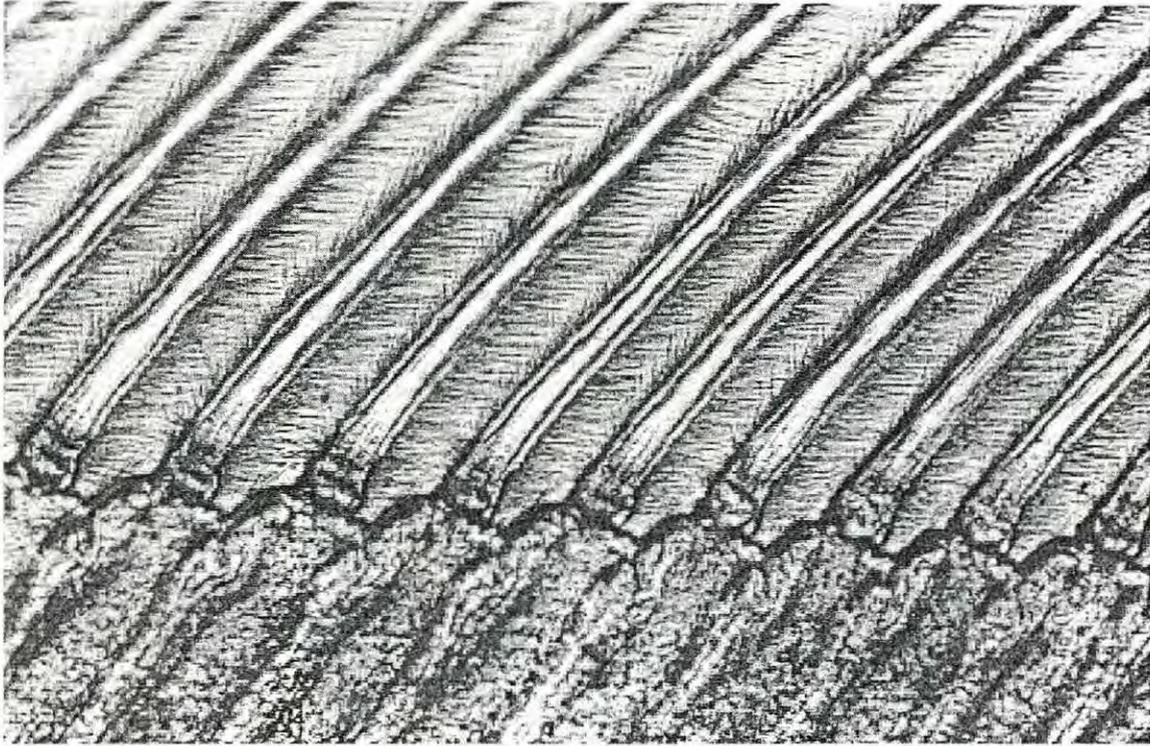
Il est clair que l'exuviation est un processus stressant et consommateur d'énergie, ce stress est accentué dans des conditions environnementales limitantes. Du fait de la grande variabilité de la PO hémolympatique au cours du cycle d'intermue, les mesures ont été effectuées uniquement sur des crevettes en stade C.

#### **2.6.2.2. Détermination des stades d'intermue**

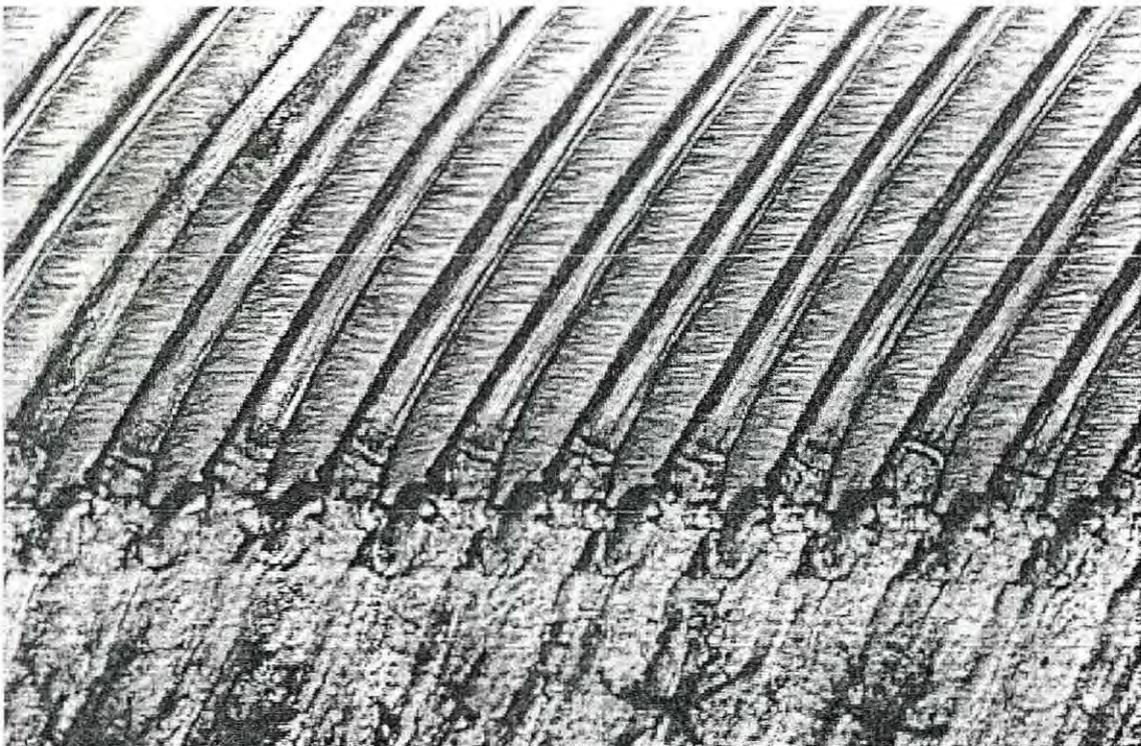
Le cycle de mue, riche en modifications internes chez l'animal, a été divisé en stades principaux dont une classification simplifiée a été proposée par Charmantier pour la détermination des stades d'inter-mue chez les pénéides (non publié) ; elle est basée sur les descriptions de Drach (1939) et Drach et Tchernigovtzeff (1967). Les photos de 3 à 7 représentant les stades A-B, C, D0, D1 et D2 illustrent les caractéristiques essentielles de ces stades.



**Photo 3** : Soies d'une écaille antennaire d'un juvénile en stade A-B d'intermue. Ici, les stades A et B ont été regroupés suivant un critère : Les soies sont remplies de matériel cellulaire.



**Photo 4 :** Soies d'une écaille antennaire d'un juvénile en stade C d'intermue. Les soies sont vides, le matériel cellulaire s'est rétracté.



**Photo 5 :** Soies d'une écaille antennaire d'un juvénile en stade D0 d'intermue. Décollement de l'épiderme visible en retrait sous la cuticule. Il forme une ligne continue et rectiligne.

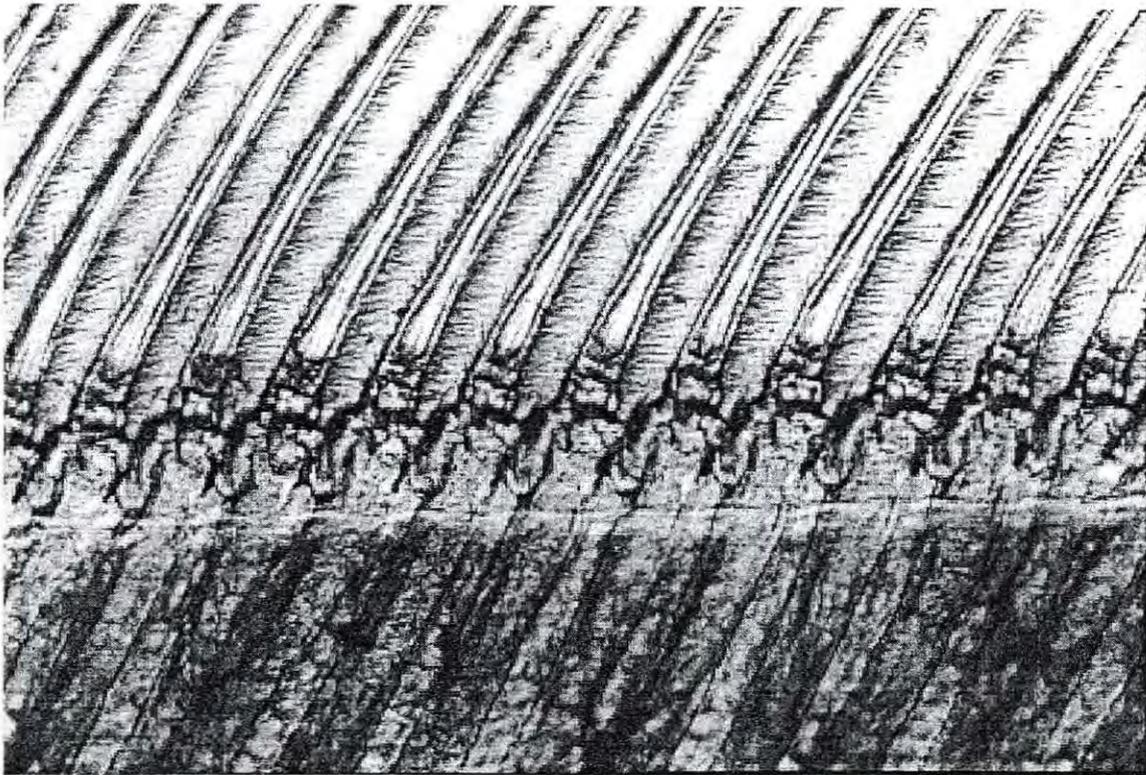


Photo 6 : Soies d'une écaille antennaire d'un juvénile en stade D1 d'intermue. L'épiderme sous la cuticule commence à s'invaginer et forme des ondulations.

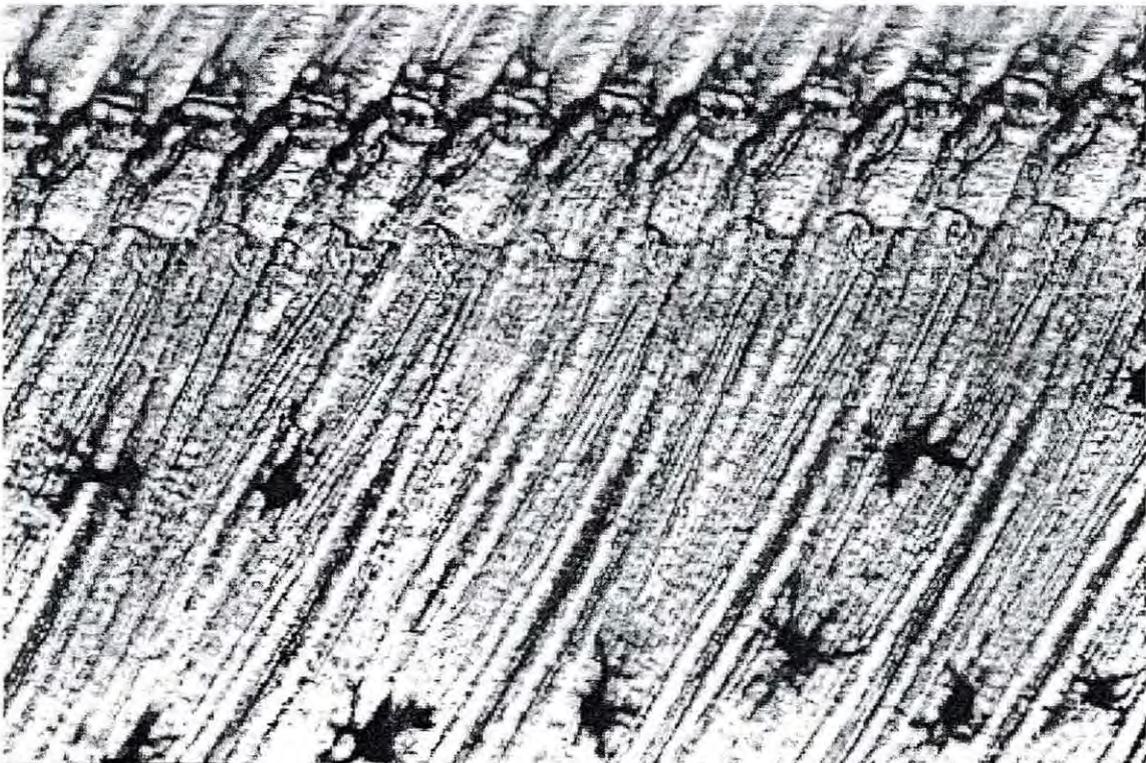
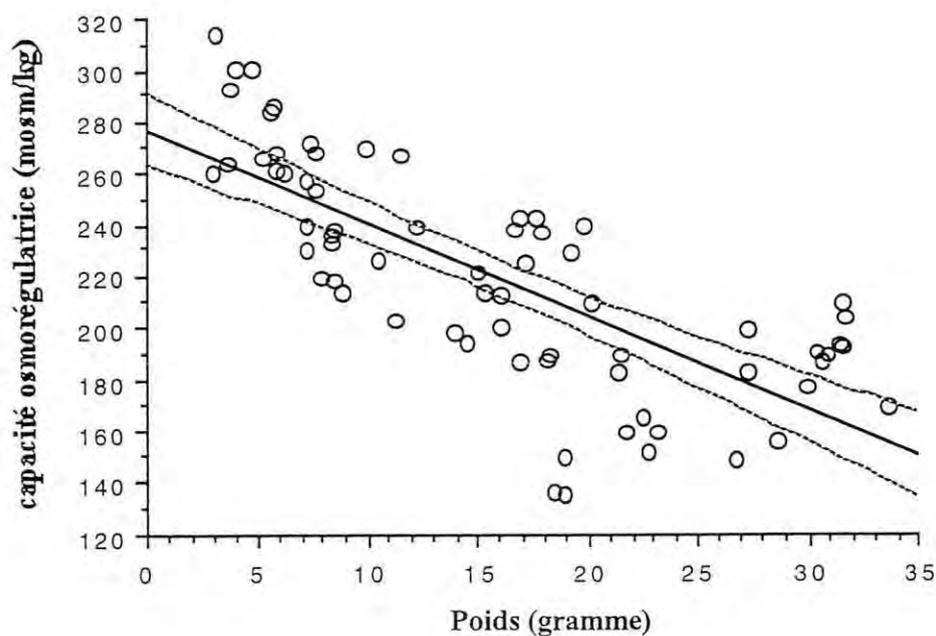


Photo 7 : Soies d'une écaille antennaire d'un juvénile en stade D2 d'intermue. Les invaginations sont prononcées. Apparition des nouvelles soies.

Dans les premières expériences, une section de la partie interne de l'écaille antennaire était utilisée pour la détermination du stade d'inter-mue. Désormais, la détermination est faite à la loupe binoculaire en maintenant la crevette dans la main et en plaquant directement l'écaille antennaire à l'aide de l'index sur la platine d'observation. Ce moyen présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide et de nous affranchir d'une mutilation stressante.

### 2.6.3. Choix de la taille

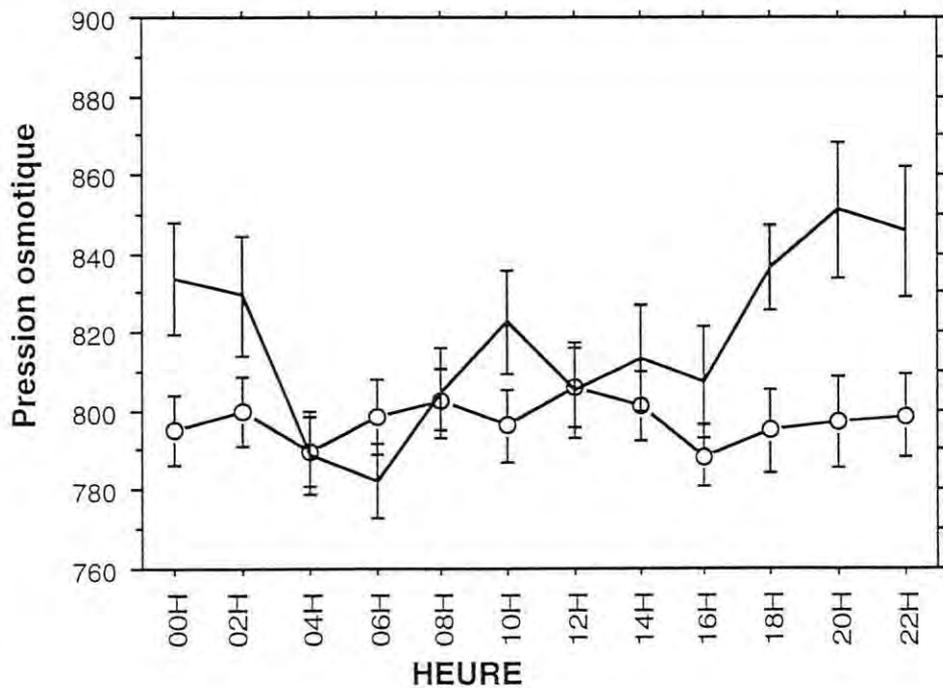
Afin de réduire la variance dans les résultats de la CO, nous avons essayé de réduire autant que possible les écarts de poids entre les crevettes. Chez des juvéniles en stade C et de poids frais se situant entre 8 et 24 g, la distribution des hypo-CO montre une décroissance régulière liée au poids des animaux (Cochard et al., 1996). La valeur absolue de CO passe de 125 mOsm.kg<sup>-1</sup> pour un juvénile de 8 g de poids frais à 50 mOsm.kg<sup>-1</sup> pour un juvénile de 23g de poids frais (diminution de 60%).



**figure 2** : Relation poids/C.O. au stade C d'intermue. La droite de régression ainsi que les bandes de confiances à 95% sont représentées.

### 2.6.4. Alimentation

Il a été constaté une augmentation sensible de la PO en phase post-prandiale. Cette augmentation pourrait masquer le niveau réel que l'on désire mettre en évidence par le stress hypoxique. Les travaux sur le terrain démontrent (Figure 1) que lorsque les crevettes sont maintenues à jeun la pression osmotique de leur hémolymphe reste pratiquement constante (Cochard et al., 1996). C'est pour cette raison que les crevettes ont été maintenues à jeun durant les expériences.



**Figure 3 :** Variations comparées de la pression osmotique de l'hémolymphe de crevettes maintenues à jeun (o) ou nourries. Données cumulées sur 48 et 72 heures respectivement. La PO ne varie pas significativement ( $p=0,234$ ) lorsque les crevettes sont maintenues à jeun.

## 2.7. Protocol expérimental

### 2.7.1. La salle expérimentale et bacs expérimentaux

La salle expérimentale est thermorégulée à 26°C en permanence. Une photopériode artificielle simule la photophase nyctémérale de 12 heures de jour.

Dans cette salle, six bacs rectangulaires de 75 litres permettent l'étude simultanée de six niveaux d'oxygénation. Ils sont munis d'un couvercle. A chacun des bacs est attribué un système de régulation de l'oxygène excepté le bac en normoxie.

### 2.7.2. Régulation du taux d'oxygène dissous

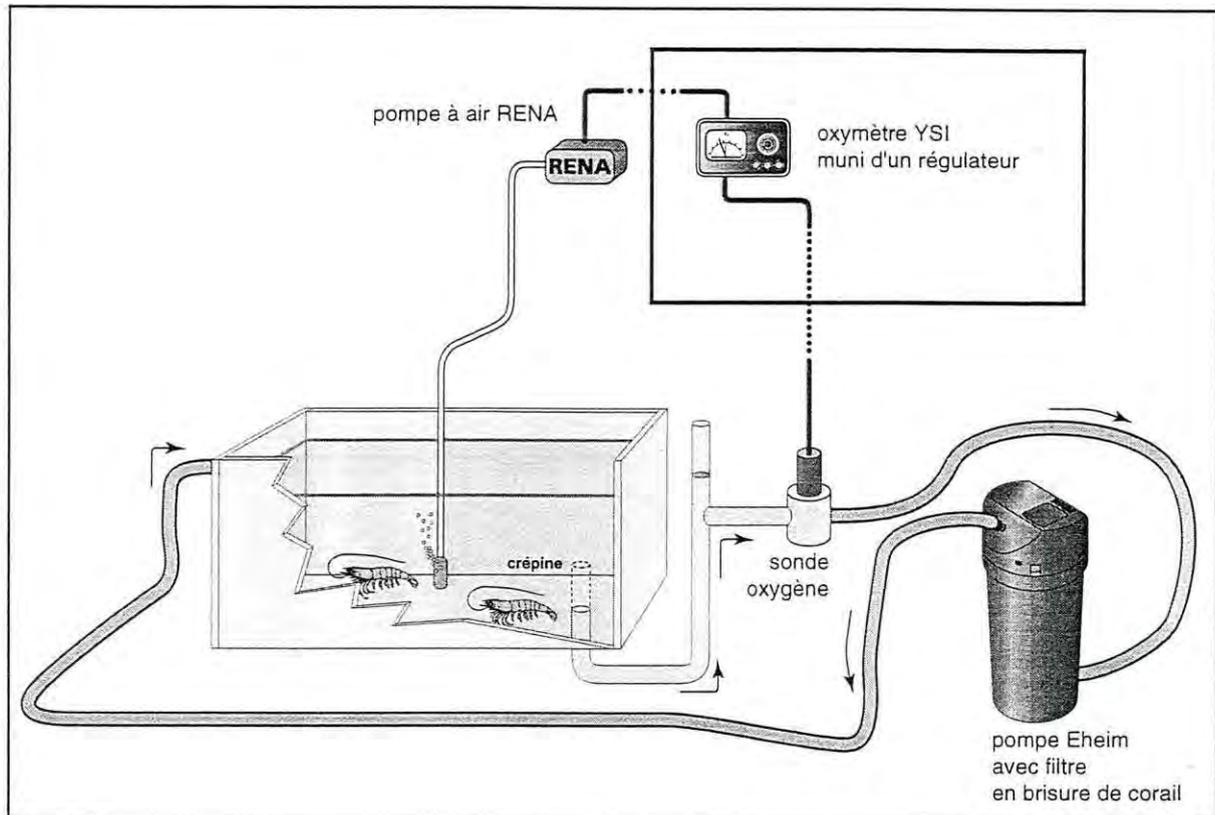
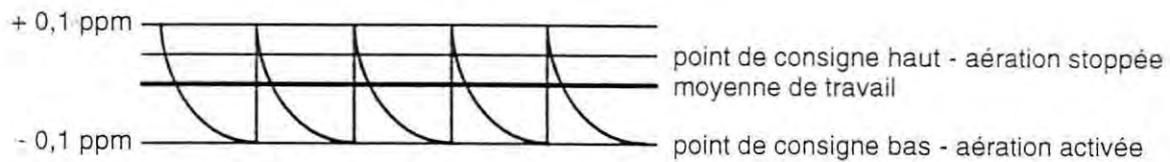


Schéma 3 : Un bac expérimental et son système de régulation de l'oxygène

Le maintien de l'oxygène à un seuil constant de quelques heures à plusieurs jours est obtenu de façon naturelle (Aquacop, 1987, Charmantier et al, 1993) sans avoir recours aux classiques colonnes de régulation par l'azote gazeux utilisées par de nombreux auteurs (schéma 3). Le seuil d'oxygénation souhaité est ici obtenu en utilisant un oxymètre muni d'un régulateur à point de consigne (*Consort-O<sub>2</sub> controller R321*) ; lorsque la concentration se trouve abaissée au dessous du point de consigne bas, l'oxymètre compense la perte en oxygène en provoquant un afflux d'air au moyen d'un aérateur d'aquarium électrique (*Rena 301*). Ce dernier est automatiquement stoppé lorsque le niveau d'oxygénation est parvenu au dessus du point de consigne haut. C'est l'alternance des points extrêmes de concentration hauts et bas ( $\pm 0,1 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ ) qui donne une moyenne d'oxygénation stable (schéma 4).



**Schéma 4** : Variation de la concentration d'oxygène dans les bacs expérimentaux.

La chute de la concentration d'oxygène dans le milieu est assurée par la respiration des crevettes placées dans le bac expérimental, mais aussi par la flore aérobie nitrifiante. Celle-ci a été fixée au préalable sur du corail mort concassé et calibré, immergé dans un bac de stockage. La flore est entretenue durant deux semaines par un apport quotidien de sulfate d'ammonium, le corail est placé dans le corps d'une pompe d'aquarium (*Eheim*<sup>®</sup> 2213) peu avant les expériences. Cette pompe assure une circulation en circuit fermé et autorise, en plus de la filtration biologique, trois fonctions essentielles :

- La correction du pH par la présence du corail réduit le risque d'une acidification du milieu due à l'activité bactérienne. Les ions  $H^+$  sont neutralisés par le calcaire du corail ( $CaCO_3$ ).

- L'homogénéisation constante du milieu évite toute stratification dans le bac. Ce fait prend toute son importance dans des hypoxie sévères où l'hétérogénéité du milieu peut être sanctionnée par des mortalités, elle aura une incidence importante sur les résultats de la CO.

- La circulation du fluide qui alimente en permanence la sonde de l'oxymètre. Cette dernière est positionnée dès la sortie du bac. Elle procure une lecture de la concentration en oxygène qui prévaut dans tout le milieu et permet par conséquent une régulation précise.

**L'oxygénation du bac témoin en normoxie** : Le bac témoin est dépourvu de régulation de l'oxygène. Un aérateur électrique (*Rena 301*) fonctionne en permanence, il assure le maintien de la saturation du milieu en oxygène.

### 2.7.3. Initialisation des expériences au niveau des bacs hypoxiques

La stabulation s'achevant, l'oxygène est abaissé en réglant simplement le point de consigne à la valeur désirée. Le décompte de la durée d'exposition de l'expérience commence

dès que le taux d'oxygène est parvenu à la teneur que l'on désire étudier. Un décalage de trois quarts d'heure est observé entre chacun des bacs expérimentaux. C'est l'intervalle de temps nécessaire pour effectuer, plus tard, les prélèvements d'hémolymphe et les mesures de la pression osmotique sur l'ensemble des crevettes d'un bac expérimental. La durée de la chute de l'oxygène dépend de la concentration que l'on désire obtenir, mais également de la charge en crevettes et de l'activité bactérienne des biofiltres au moment de l'expérience.

#### **2.7.4. Acquisition de l'information**

Le nombre d'oxymètres disponible n'a permis d'équiper que six bacs expérimentaux. Chaque expérience donne six points moyens de l'effet de la concentration en oxygène sur la CO. Afin d'augmenter la puissance du test, il a été nécessaire d'effectuer plusieurs expériences successives. L'attribution des différentes teneurs hypoxiques au niveau des bacs a été effectuée au hasard. Chaque expérience décrira les réponses à l'hypoxie sur la base des teneurs en oxygène suivantes :  $\pm 6$ (saturation), 5, 4, 3, 2 et 1 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. Des points intermédiaires ont été étudiés comme 0,5 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>.

#### **2.7.5. Expression des résultats**

L'ensemble des résultats sont exprimés en terme de « dépression de la CO par rapport au témoin ». Malgré toutes les précautions prises pour obtenir aussi peu de variation que possible, il peut subvenir entre chaque expérience des différences de niveau. Ces différences sont essentiellement dues aux variations de l'état des crevettes dans le temps (expériences successives, différence de taille et de condition) mais aussi dans l'espace (provenance des souches, différentes origines de bassin). La dépression par rapport au témoin permet donc de gommer les différences de niveau qui sont susceptibles d'apparaître entre les expériences. Dans une expérience, elle s'exprime en faisant la différence entre la la pression osmotique moyenne de l'hémolymphe des crevettes du bac témoin et la pression osmotique de l'hémolymphe de chacune des crevettes placées dans les bacs en hypoxie.

## 2.8. Influence d'un stress hypoxique prolongé sur la Capacité Osmorégulatrice chez *P.stylirostris*

Cette expérimentation a été menée afin de vérifier sur un mois le niveau d'adaptation à l'hypoxie par la mesure de la CO dans l'hémolymph. D'autre part, l'effet de l'hypoxie sur la croissance a été mesuré.

### 2.8.1. Protocole

Les bacs utilisés pour cette expérience à long terme ont un volume de 1,5 m<sup>3</sup> et sont placés sous un toit translucide, ils profitent de la photopériode naturelle. Comme dans les expériences précédentes, le brassage de l'eau était assuré par des pompes électriques (4 pompes *Eheim*) qui servaient en même temps de filtre biologique. La concentration de l'oxygène était régulée (comme décrit dans le paragraphe 2.7.2). Pour limiter les échanges gazeux au niveau de l'interface air-eau, un film plastique flottait sur toute la surface de l'eau.

Les concentrations d'oxygène étaient relevés quotidiennement ainsi que le pH et la température. Le nombre de mortes, de mues et le taux de consommation de l'aliment ont été également évalués. Les animaux étaient alimentés quotidiennement à satiété, avec un granulé (PGN) peu polluant, utilisé en routine dans les bassins d'élevage.

### 2.8.2. Plan expérimental

Trois bacs étaient placés en hypoxie (H1 à H3) et deux bacs témoins en normoxie (N4 et N5). A l'intérieur de chacun de ces bacs 45 crevettes étaient mises en élevage. Les poids moyens initiaux sont consignés dans le tableau 3. Les régulateurs ont été programmés pour obtenir une concentration de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> d'oxygène à l'intérieur des bacs placés en hypoxie.

### 3.RESULTATS

#### 3.1. Influence d'un stress hypoxique court sur la Capacité Osmorégulatrice

##### 3.1.1. Influence de la teneur en oxygène combinée à la durée d'exposition sur la CO chez *P. stylirostris*

La dépression de CO enregistrée chez les crevettes soumises à différentes concentrations d'oxygène pendant des périodes comprises entre 6 et 48 heures est étudiée par une analyse de variance à 2 facteurs. L'interaction est étudiée en fonction de l'adaptation des animaux aux facteurs testés.

##### 3.1.1.1. Analyse de variance

Tableau n° 1 : Analyse de variance pour la dépression de la CO en fonction de la durée d'exposition et de la concentration en oxygène dissous.

Analyses	DDL	Somme des carrés	Carrés moyens	Valeur de F	Valeur de p
O2 (mg.l <sup>-1</sup> )	4	598618,783	149654,696	147,489	<,0001
Durée (H)	2	25114,08	12557,04	12,375	<,0001
Durée (H) * O2 (mg.l <sup>-1</sup> )	8	23695,481	2961,935	2,919	0,0035
Résidus	453	459650,36	1014,681		

L'analyse de variance (tableau 1) met en évidence de manière significative ( $p < 0,0001$ ) l'effet de la concentration en oxygène sur la dépression de la CO entre 1 et 6 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. D'autre part, la durée d'exposition aux différentes concentrations est un facteur de variation significative de la dépression ( $p < 0,0001$ ), pondérant ainsi la réponse à l'hypoxie. L'interaction entre ces deux facteurs est significative ( $p = 0,0035$ ).

### 3.1.1.2. Résultats bruts des moyennes des expériences

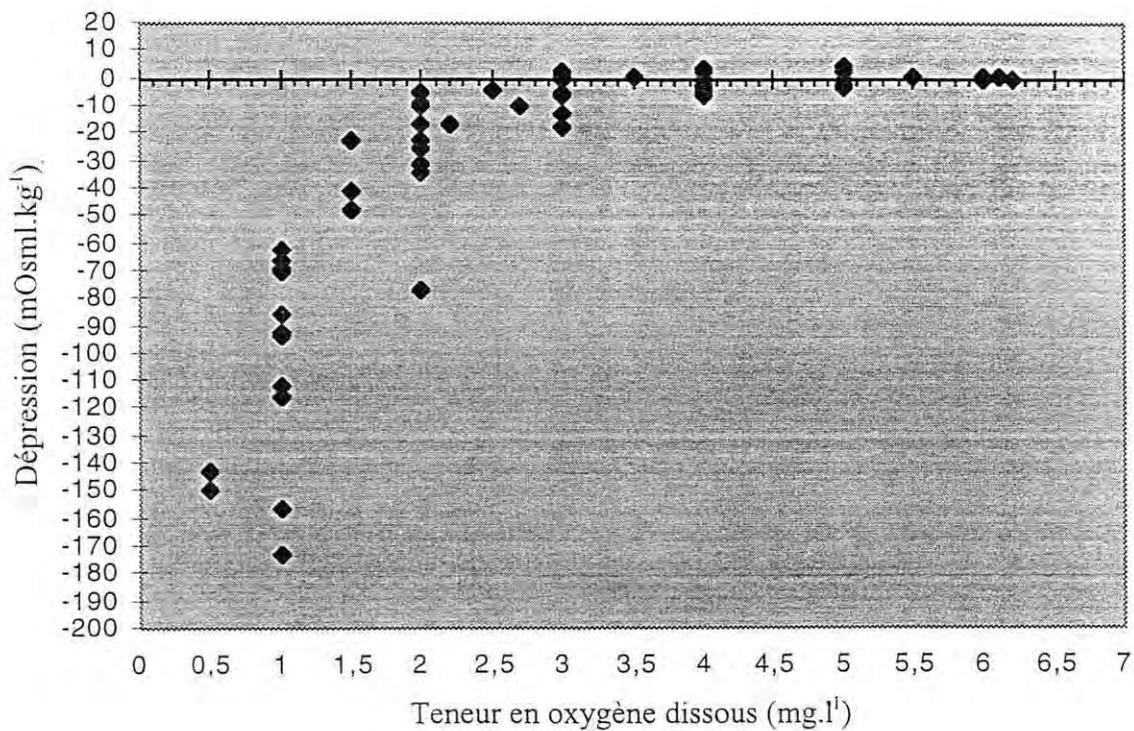
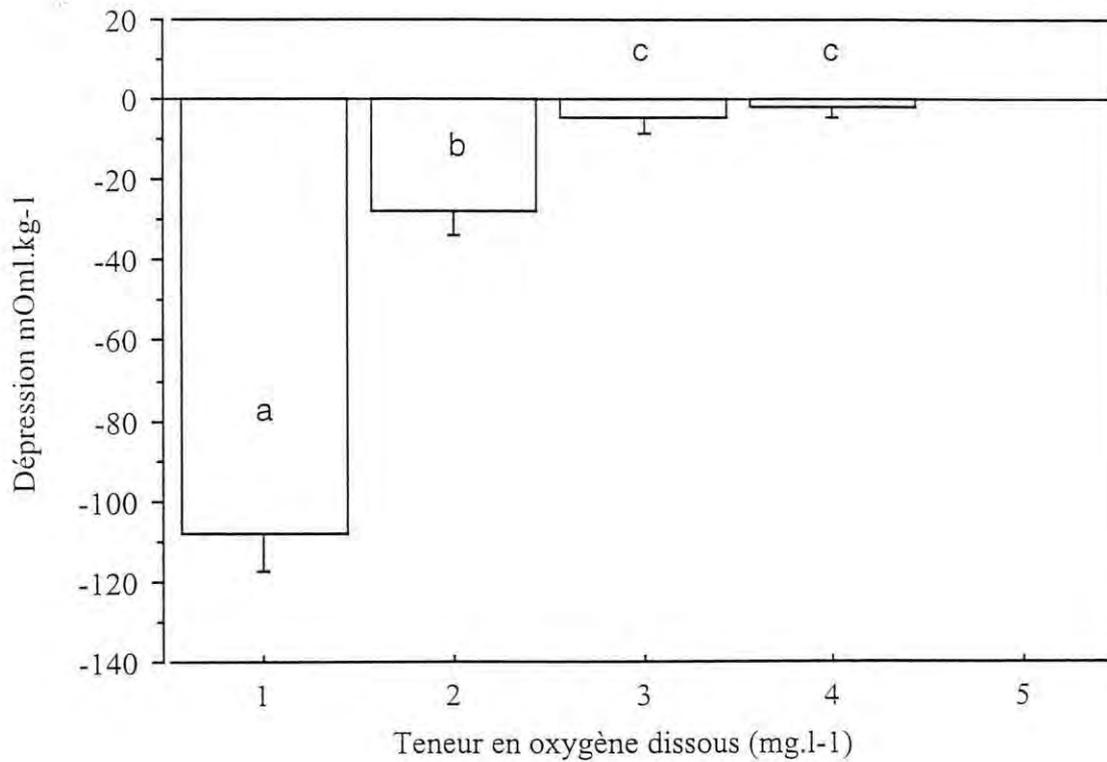


Figure 4 : Expression de l'ensemble des moyennes collectés sur la totalité des expériences (n par moyenne).

### 3.1.1.3. Effet de la concentration de l'oxygène

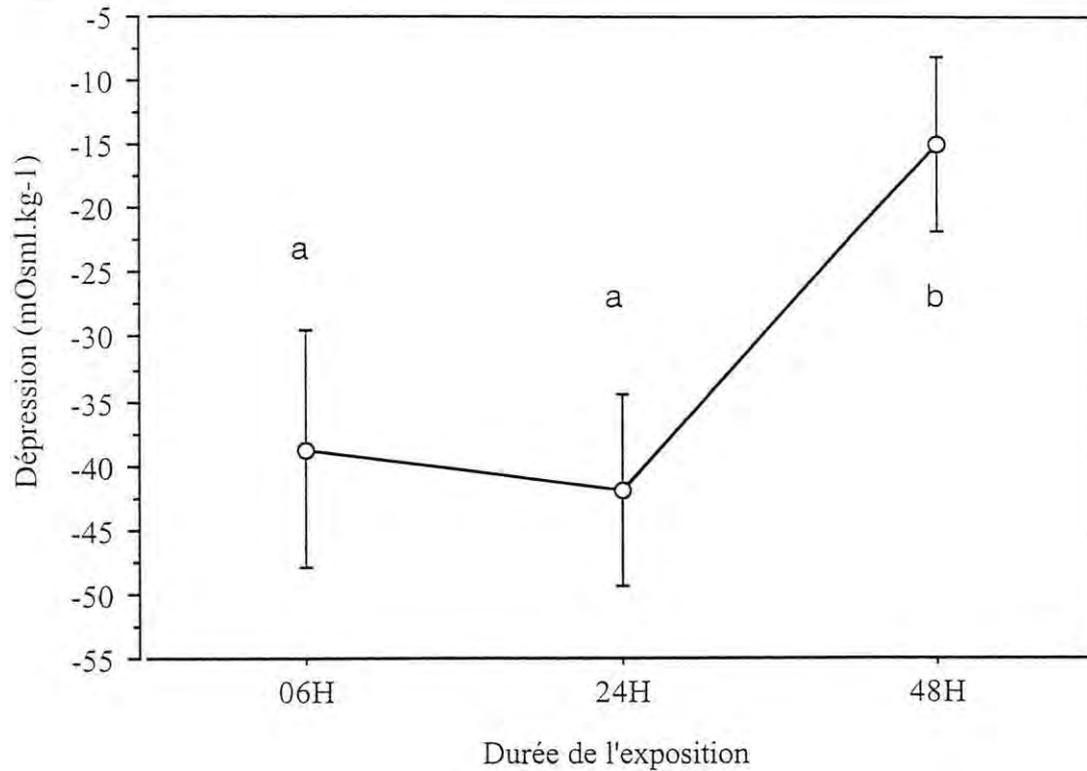
La figure 5 illustre les variations de la dépression de la CO en fonction de la teneur en  $O_2$  ambiant. Le test à posteriori (Protected Least Significant Difference) établit 3 groupes de moyennes. Le premier groupe (c) apparaît entre 3 et 6  $mg\ O_2.l^{-1}$  où la dépression est nulle. Les crevettes apparaissent stressées au dessous de 3  $mg\ O_2.l^{-1}$  formant 2 autres groupes distincts à 2 (b) et à 1  $mg\ O_2.l^{-1}$  (a). La dépression chez les crevettes soumises à 1  $mg\ O_2.l^{-1}$  est significativement plus forte ( $-113\ mOsm.kg^{-1}$ ).



**Figure 5** : Expression des moyennes globales pour la dépression de la CO en fonction de la teneur en oxygène dissous. Les différentes lettres indiquent l'appartenance des moyennes à des groupes significativement différents ( $P < 5\%$ ). Les barres verticales représentent l'erreur  $\pm$  standard.

#### 3.1.1.4. Effet de la durée d'exposition

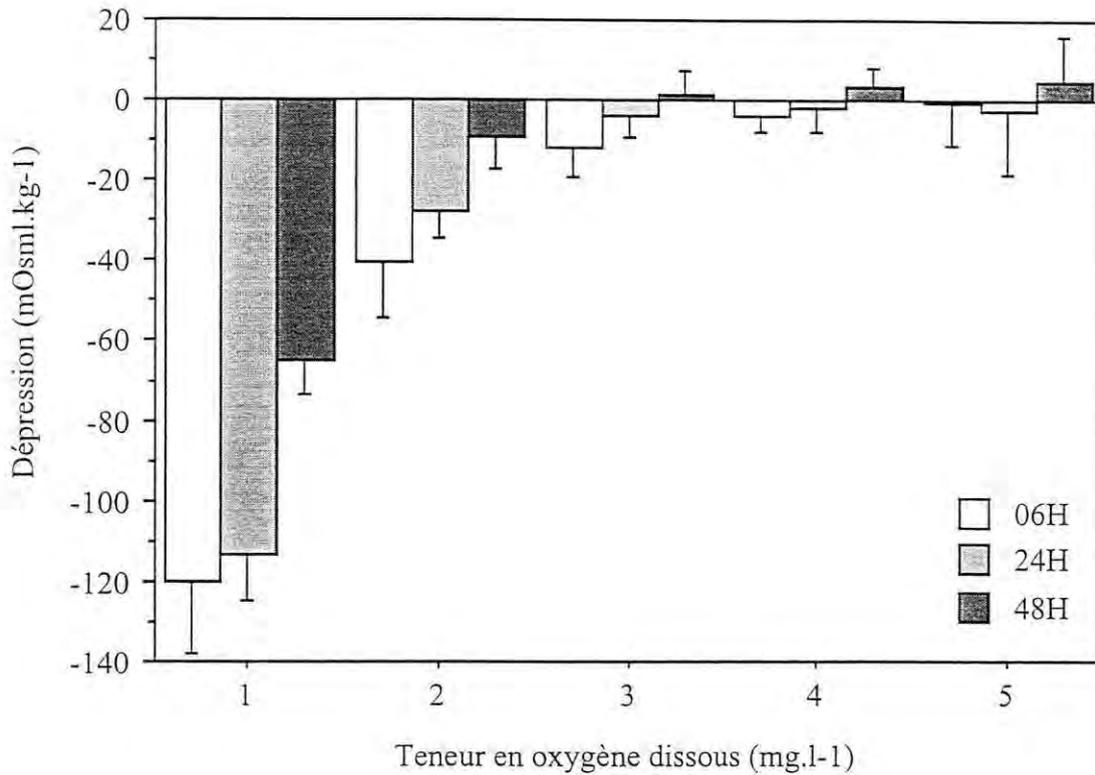
La durée d'exposition à l' $O_2$  ambiant influence significativement la dépression de la CO. Il apparaît qu'après 48 h d'exposition aux différents teneurs en  $O_2$  la dépression est moins forte comme le montre la figure 6.



**Figure 6 :** Effet de la durée d'exposition à l'O<sub>2</sub> ambiant sur la dépression de la CO toutes concentrations confondues. Les différentes lettres indiquent l'appartenance des moyennes à des groupes significativement différents (P < 5%). Les barres verticales représentent ± l'erreur standard.

### 3.1.1.5. Interaction des facteurs testés

Les moyennes des dépressions de la CO en fonction de la teneur en O<sub>2</sub> et de la durée d'exposition sont présentées dans la figure 7. L'interaction significative entre ces 2 facteurs indique que les moyennes de dépression de la CO sont pour une durée d'exposition de 48h à 1 et 2 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> significativement différentes des autres moyennes aux mêmes concentrations à 6 et 24 heures d'exposition.



**Figure 7** : Interactions pour la dépression de la CO en fonction de la durée d'exposition et de la concentration en oxygène dissous. Les barres verticales représentent  $\pm$  l'erreur standard.

L'interaction significative ( $p= 0,0035$ ) entre les facteurs testés,  $O_2$  et durée, a une signification physiologique que l'on peut traduire comme une récupération au stress hypoxique des crevettes *P. stylirostris* après une période d'adaptation de 48 heures.

### 3.1.1.6.Survie

Sur l'ensemble des expériences réalisées, aucune mortalité n'a été notée si ce n'est un léger cannibalisme dans les bacs régulés au dessus de  $1,5 \text{ mg } O_2.l^{-1}$ . Ce fait est probablement dû au jeûne. Au dessous de cette valeur, le comportement est influencé : les crevettes se groupent sur le fond du bac les unes contre les autres et restent immobiles. Au dessus de  $1,5 \text{ mg } O_2.l^{-1}$ , la mobilité des crevettes est normale.

### 3.1.2. Influence de la teneur en oxygène combinée à la durée d'exposition sur la CO chez *P. vannamei*

**Tableau 2** : Analyse de variance pour la dépression de la CO en fonction de la durée d'exposition et de la concentration en oxygène dissous

Analyses	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
O <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	3	158409,487	52803,162	37,94	<,0001
Durée (H)	2	16758,486	8379,243	6,021	0,0027
Durée * O <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	6	26721,249	4453,542	3,2	0,0046
Résidus	311	432833,297	1391,747		

L'analyse de variance (tableau 2) met en évidence de manière significative ( $p < 0,001$ ) l'effet de la concentration en oxygène sur la dépression de la CO entre 1 et 6 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. La durée d'exposition aux différentes concentrations est un facteur de variation significative de la dépression ( $p = 0,0027$ ), pondérant la réponse à l'hypoxie. L'interaction entre ces deux facteurs est significative ( $p < 0,0046$ ).

### 3.1.2.1. Résultats bruts des moyennes des expériences

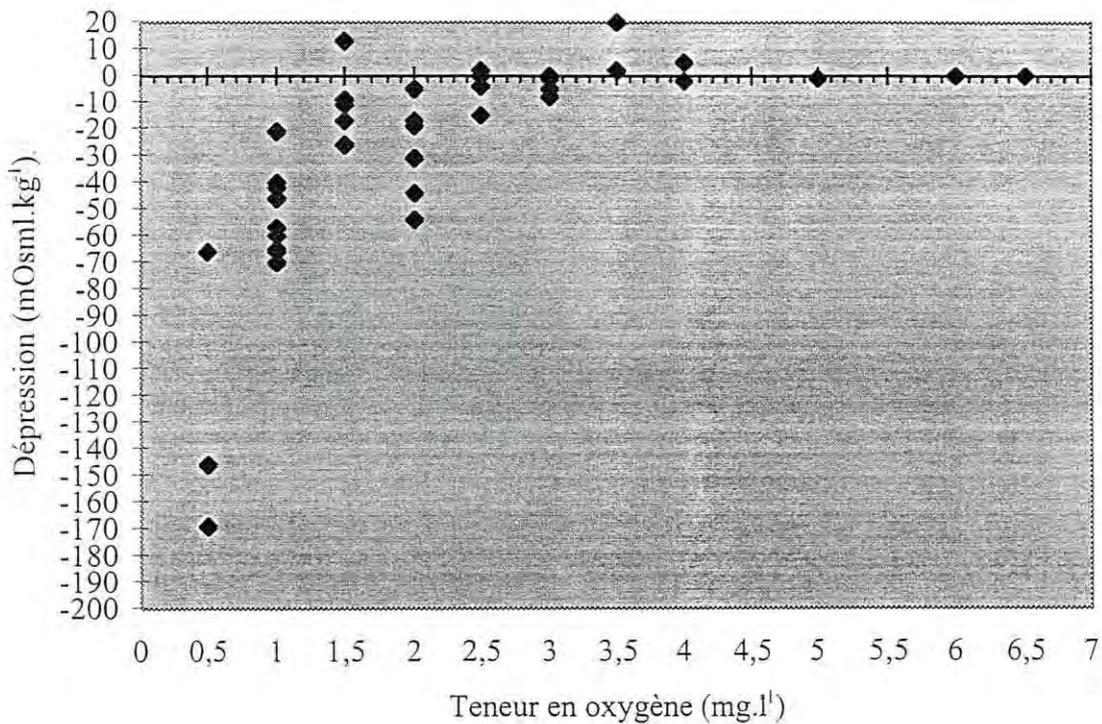
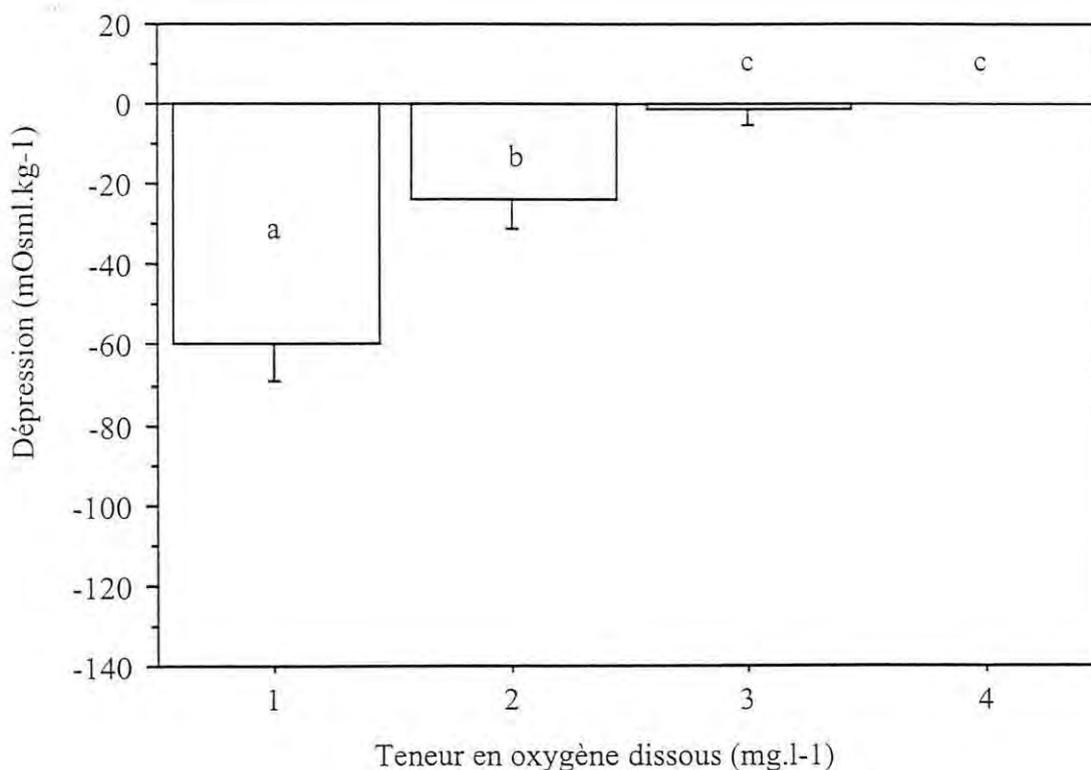


Figure 8 : Expression de l'ensemble des moyennes collectés sur la totalité des expériences (n par moyenne).

### 3.1.2.2. Effet de la concentration de l'oxygène

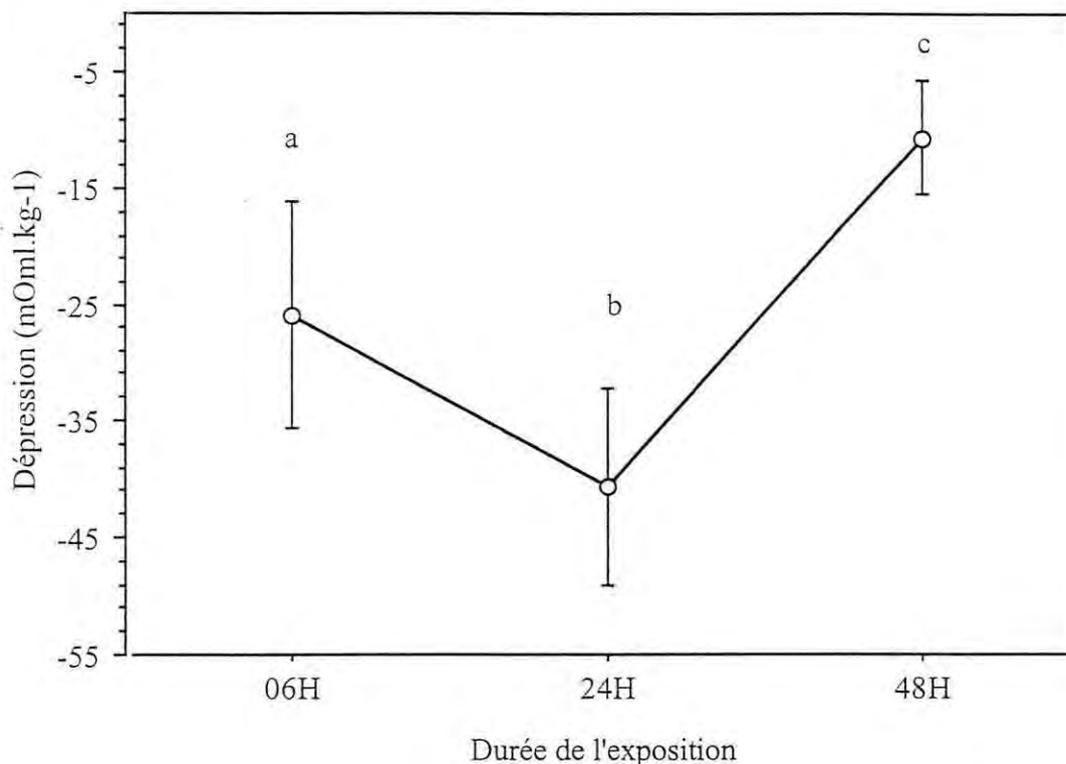
Tout comme la figure 5, la figure 9 nous montre les variations de la CO en fonction de la teneur en  $O_2$  ambiant. Le test a posteriori (PLSD) donne également chez *P.vannamei* trois groupes de moyennes. Le premier groupe (c) apparaît entre 3 et 6  $mg\ O_2.l^{-1}$  où la dépression est nulle. Le stress commence à manifester ses effets en dessous de 3  $mg\ O_2.l^{-1}$  en formant deux autres groupes distincts à 2 (b) et à 1  $mg\ O_2.l^{-1}$  (a). La dépression de la CO chez les juvéniles soumises à 1  $mg\ O_2.l^{-1}$  est la plus importante. On peut cependant remarquer par rapport à la figure 5 que l'effet de la concentration à 1  $mg\ O_2.l^{-1}$  s'exerce de façon moins importante chez *P. vannamei* ( $-59\ mOsm.l.kg^{-1}$ ).



**Figure 9** : Expression des moyennes globales pour la dépression de la CO en fonction de la teneur en oxygène dissous. Les différentes lettres indiquent l'appartenance des moyennes à des groupes significativement différents ( $P < 5\%$ ). Les barres verticales représentent  $\pm$  l'erreur standard.

### 3.1.2.3. Effet de la durée d'exposition

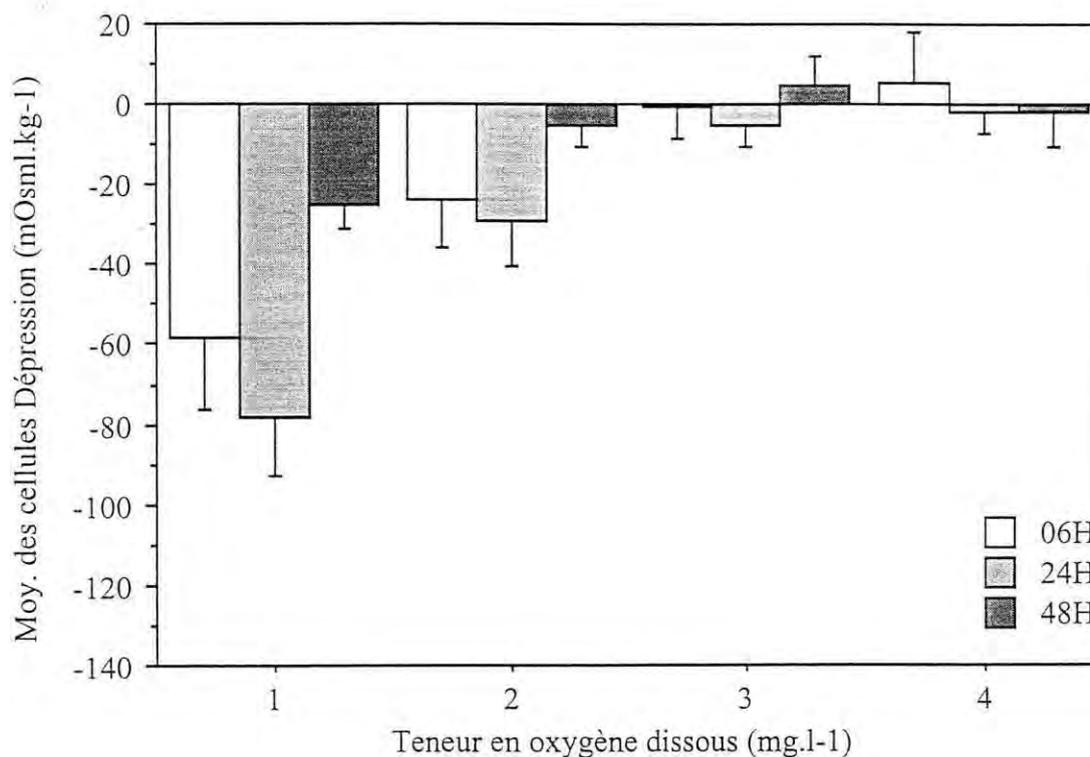
La durée de l'exposition à l'oxygène ambiant influence significativement la dépression de la CO. Par rapport à la figure 2, il faut simplement remarquer que, dans ce cas, l'influence est beaucoup moins marquée à 6 heures. Les durées d'exposition forment 3 groupes significativement différents. A 6 heures d'exposition, les crevettes n'ont pas atteint le niveau maximum de stress, tel qu'il apparaît à 24 heures. A 48 heures, la dépression de la CO diminue significativement montrant un effet de récupération.



**Figure 10** : Effet de la durée d'exposition à l'O<sub>2</sub> ambiant sur la dépression de la CO toutes concentrations confondues. Les différentes lettres indiquent l'appartenance des moyennes à des groupes significativement différents (P < 5%). Les barres verticales représentent ± l'erreur standard.

#### 3.1.2.4. Interaction des facteurs testés

Les moyennes des dépressions de la CO en fonction de la teneur en O<sub>2</sub> et de la durée d'exposition chez *P. vannamei* sont présentés dans la figure 5. L'interaction entre ces 2 facteurs indique également que les moyennes de dépression de la CO sont pour une durée de 48 heures à 1 et 2 mg O<sub>2</sub>. l<sup>-1</sup> significativement différentes des autres moyennes aux mêmes concentrations à 6 et 24 heures d'exposition. On peut également noter le retour à la normale de la moyenne de la dépression de la CO concernant la durée d'exposition de 48 heures pour une concentration de 2 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>.



**Figure 11** : Interactions pour la dépression de la CO en fonction de la durée d'exposition et de la concentration en oxygène dissous. Les barres verticales représentent  $\pm$  l'erreur standard.

L'interaction significative ( $p < 0,0046$ ) des facteurs testés,  $O_2$  et durée, a une signification physiologique que l'on peut traduire comme le début de l'adaptation à l'hypoxie des crevettes *P. vannamei* après une période de 48 heures.

### 3.1.2.5. Survie

Aucune mortalité correspondant à un effet de la teneur en oxygène n'a été constaté.

### 3.1.3. Résultats de l'exposition prolongée à l'hypoxie chez *P. stylirostris*

#### 3.1.3.1. Homogénéité des paramètres physico-chimiques

##### L'oxygène

L'analyse de variance réalisée sur les mesures de concentration d'oxygène met en évidence les points suivants. Les trois bacs en hypoxie présentent des valeurs

significativement différentes : le bac H2 a la plus forte valeur moyenne avec  $2,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , suivi du H3 à  $1,9 \text{ mg.l}^{-1}$  et du H1 à  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$ . Les bacs en normoxie et en hypoxie forment deux groupes bien distincts.

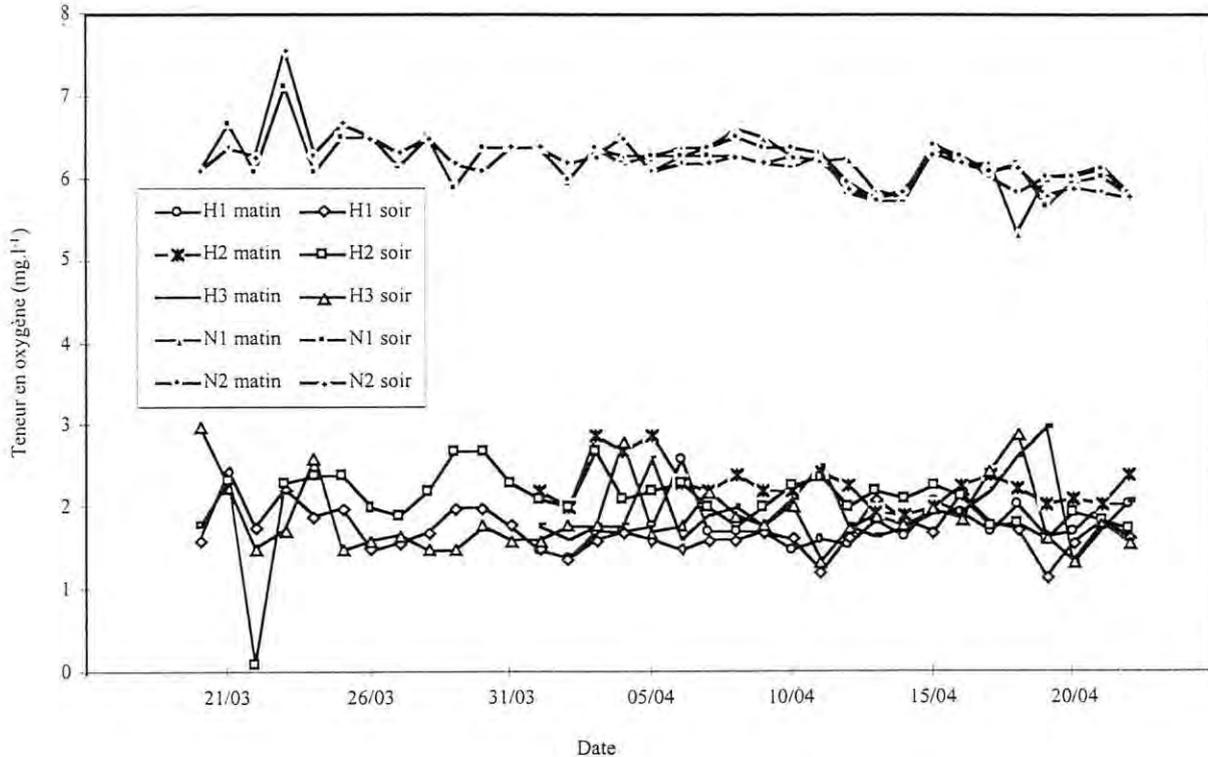


Figure 12 : Expression des relevés journaliers d'oxygène

### La température

Contrairement à l'oxygène, la température ne diffère pas significativement d'un bac à l'autre. Les variations globales la font varier entre  $26,5^{\circ}\text{C}$  et  $28,5^{\circ}\text{C}$ .

### Le pH

En ce qui concerne le pH de l'eau, un groupe statistique est formé par les deux bacs en normoxie, les bacs en hypoxie ont des pH significativement plus faible et sont différents entre eux. Ces différences peuvent s'expliquer par les différences de niveau d'oxygène.

**Tableau 3** : Comparaison des valeurs moyennes du pH de l'eau des bacs

Bac	pH	N	Groupes
H1	7,30	32	<b>d</b>
H2	7,40	32	<b>c</b>
H3	7,51	32	<b>b</b>
N4	7,74	32	<b>a</b>
N5	7,75	32	<b>a</b>

### **3.1.3.2. La croissance**

Un échantillonnage complet a été réalisé en fin d'expérience, dont le résumé statistique est donné dans le tableau 4

**Tableau 4** : Comparaison des poids moyens au début et à la fin de l'expérience

Bac	O <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	Poids (g)	Début ±s	Groupe	Poids (g)	Fin ±s	N	Groupe
N5	Normoxie	19,13	5,04	<b>a</b>	25,13	4,02	41	<b>a</b>
N4	Normoxie	21,19	4,34	<b>a</b>	27,14	4,49	41	<b>a</b>
H1	1,7	15,68	5,43	<b>b</b>	21,31	5,79	36	<b>b</b>
H2	2,1	15,56	5,06	<b>b</b>	21,92	6,80	25	<b>b</b>
H3	1,9	15,43	5,83	<b>b</b>	21,13	5,47	34	<b>b</b>

Une première analyse menée sur les résultats de l'échantillonnage final (tableau 4) montre une différence très significative entre les poids moyens des crevettes en hypoxie et en normoxie. Cependant, il convient de noter que, lors de l'échantillonnage initial, on notait aussi des différences significatives de poids moyens entre les bacs.

Afin de s'affranchir des conditions initiales, la croissance moyenne a été calculée en effectuant la différence entre les poids moyens finaux et initiaux (tableau 5). La variabilité ne permet pas de distinguer de différences entre animaux en hypoxie et en normoxie.

Tableau 5 : Croissance bac par bac

Bac	O <sub>2</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	Croissance (g)	Ecart type	Groupes
H1	1,7	5,64	2,21	<b>a</b>
H2	2,1	6,75	3,06	<b>a</b>
H3	1,9	5,78	2,25	<b>a</b>
N1	Normoxie	6,09	1,64	<b>a</b>
N2	Normoxie	5,70	1,76	<b>a</b>

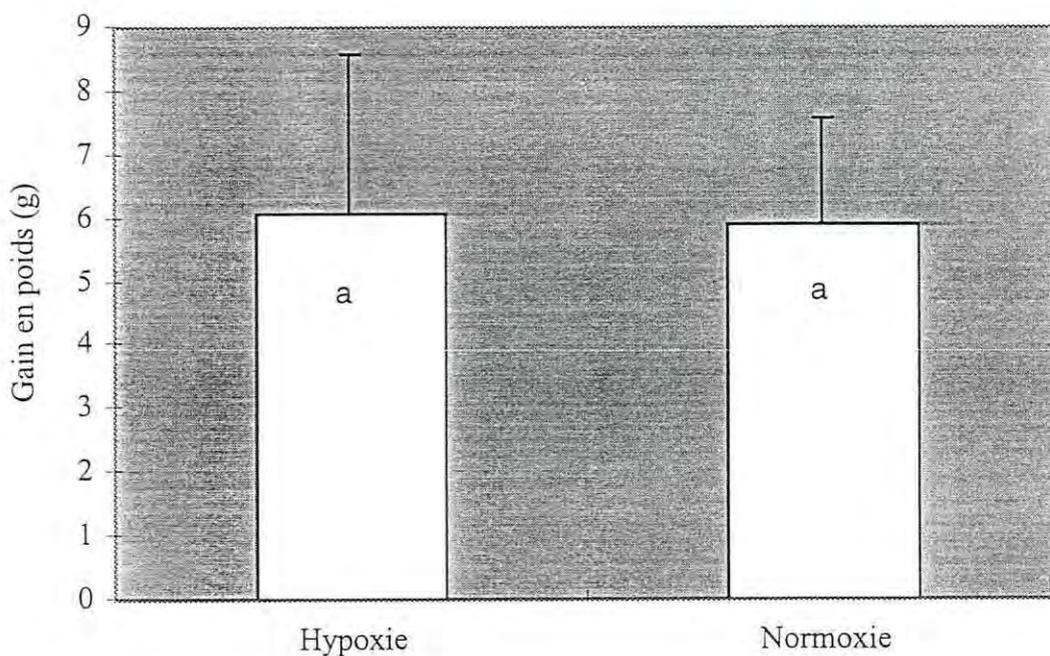


Figure 12 : Comparaison de l'accroissement moyen en poids des deux traitements. Les barres verticales représentent  $\pm$  l'erreur standard.

### 3.1.3.3. La Capacité Osmorégulatrice

Tableau 6 : Capacités Osmorégulatrices moyennes bac par bac

Bac	O2 (mg.l <sup>-1</sup> )	CO (mOsm.kg <sup>-1</sup> )	Dev. St	Groupes
H1	1,7	257,5	19,51	<b>a</b>
H2	2,1	271,1	23,49	<b>a</b>
H3	1,9	245,6	26,88	<b>a</b>
N1	Normoxie	259,1	20,04	<b>a</b>
N2	Normoxie	261,6	24,58	<b>a</b>

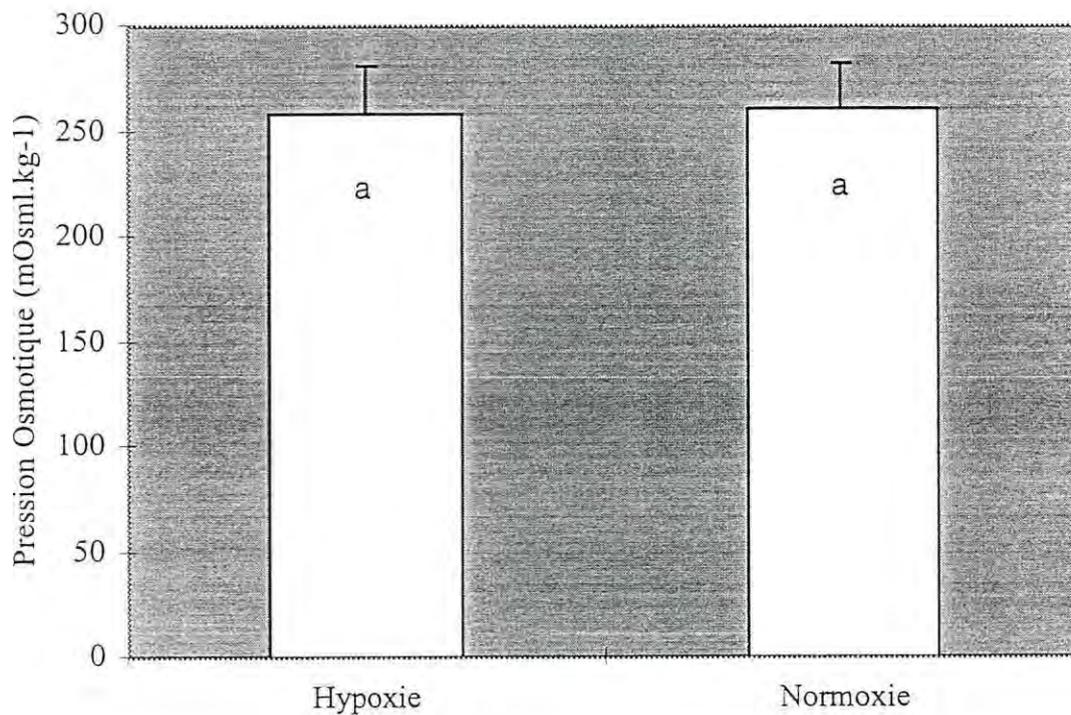


Figure 13 : Comparaison des PO moyennes obtenues en fonction des deux traitements. Les barres verticales représentent  $\pm$  l'erreur standard.

Dans cette expérience, la mesure de la CO des animaux a été effectuée après un mois d'exposition à l'hypoxie. Les résultats montrent (figure 8) que l'on ne retrouve pas ces différences de réponse. On ne peut d'ailleurs pas tirer de conclusions en terme de différence de stress hypoxique qui n'est pas mesurable en terme de dépression de la CO par rapport au témoins puisque les juvéniles en hypoxie et en normoxie ne présentent pas de différences significatives : les niveaux moyens étant respectivement de  $254 \text{ mOsm.kg}^{-1}$  et  $260 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ . Ces données traduites en dépression de la CO ( $-6 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ) entre les crevettes en hypoxie et les crevettes en normoxie montre que la différence est statistiquement nulle. On peut donc supposer que les crevettes étaient complètement adaptés à leur environnement après 33 jours d'exposition.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Kulkarni et Joshi (1980) suggéraient que la consommation de *P. japonicus* s'abaisse proportionnellement à la concentration de l'oxygène ambiant (animaux "oxyconformeurs"). Ce qui pouvait rendre la tolérance à l'hypoxie de cette espèce très limitée. Il a été démontré depuis que l'intensité du métabolisme respiratoire de ces crevettes péneïdes était maintenue constante au-dessus d'une teneur en oxygène ambiante comprise entre 2 et 3 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> (Truchot, 1983). Le débit ventilatoire induit par les scaphognathites augmente parallèlement, proportionnellement à l'abaissement de la teneur en oxygène jusqu'à une teneur d'environ 1,5mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. En dessous, le débit ventilatoire décroît. Montrant des limites respiratoires repoussées à des niveaux hypoxiques de plus en plus bas, les crevettes péneïdes ont depuis conforté leur appartenance aux groupes des crustacés "oxyrégulateurs".

Les résultats exposés dans ce travail apportent des informations supplémentaires quant aux capacités de régulation des crevettes juvéniles de *P. stylirostris* et de *P. vannamei* face à un abaissement de l'oxygénation ambiante. Ces résultats s'appliquent à des juvéniles placés dans des conditions reproduisant au mieux le comportement naturel durant la photophase du cycle nyctéméral mais cependant à niveau métabolique bas : animaux au repos et à jeun, en stade d'intermue C, adaptés après dissipation du stress induit par la pêche et le transfert dans un nouvel environnement. Les mesures ont confirmé que nos crevettes se comportent en organisme "oxyrégulateur" : comme le montrent la figure 1 et 4, elles présentent une zone d'indépendance osmorégulatrice au dessus de 3 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> et une zone de dépendance osmorégulatrice qui commence au-dessous de cette valeur. Ces résultats vont également dans le sens de ceux obtenus sur les tests de croissance et de survie (Aquacop, 1988) qui ont montrés qu'aucune influence ne s'exerçait sur les gains de poids au dessus de la même valeur.

En ce qui concerne l'effet de la teneur en oxygène, la CO de *P. vannamei* apparaît beaucoup moins influencée en valeur de dépression de CO que celle de *P. stylirostris* pour la concentration de 1 mg O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. Quant au niveau de la durée d'exposition, l'influence est nettement moins marquée à 6 heures d'exposition où *P. vannamei* n'a pas encore atteint le

niveau maximum de stress à l'inverse de *P. stylirostris* qui l'affiche déjà. *P. vannamei* présenterait donc une plus grande résistance à l'hypoxie que la *P. stylirostris*.

Aucune mortalité significative n'a été observée tout au long des expériences aussi bien chez *P. stylirostris* que chez *P. vannamei* placés en hypoxie jusqu'à une teneur de  $0,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$  (testée à des durées d'exposition de 6 et 24 heures). Au dessous de  $1,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ , le comportement des crevettes regroupées les unes à côté des autres, parfaitement immobiles sur le fond des bacs mais ne présentant aucun signe de faiblesse, était en opposition à celui des crevettes placées dans un milieu plus riche en oxygène qui étaient beaucoup plus actives.

Au total, les juvéniles de crevettes de *P. stylirostris* et de *P. vannamei* présentent une bonne tolérance à l'hypoxie ambiante, que celle-ci résulte d'une exposition accidentelle de courte durée ou bien d'un traitement à longue durée qui semble par ailleurs la renforcer. Les résultats de croissance obtenus à long terme à la concentration moyenne de  $2 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$  semblent repousser au dessous de  $3 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$  la limite adaptative des crevettes à l'hypoxie.

Quoiqu'il en soit, il doit être noté que les conclusions doivent se limiter aux conditions d'inactivité des animaux dans lesquelles les données ont été acquises, c'est à dire aux conditions de laboratoire ou l'on ne faisait varier qu'un facteur unique, l'oxygène ambiant. Il est connu que le pouvoir de régulation métabolique des crustacés s'affaiblit aux niveaux métaboliques élevés induits par les activités locomotrices et trophiques (Taylor, 1976 ; Bridges et Brand, 1980). Mais désormais, il est clair qu'on ne pourra pas attribuer systématiquement aux problèmes d'hypoxie la seule responsabilité des fortes mortalités survenant dans les bassins d'élevage.

Ces tests, enfin, permettent de mesurer très rapidement les conséquences d'une perturbation de l'environnement et confirme l'utilisation de la Capacité Osmorégulatrice comme indice de condition des élevages de pénéides. Il devrait, à terme, trouver son utilisation pratique dans les fermes de production. L'investissement dans un osmomètre est à l'échelle d'une ferme de moyenne importance. Ce test permet de mesurer très rapidement in situ les conséquences d'une perturbation de l'environnement, à la condition qu'un témoin soit disponible ou que les variations normales de la Capacité Osmorégulatrice soient précisées.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

Allan G. L. et Maguire G. B., (1991). Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 94, p. 27-37.

Aquacop, 1983. Ten years of experimental rearing of penaeid shrimp in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). *Journal of the W.M.S.*, 15 : 73-91

Aquacop, Bédier E., Soyez C.(1988). Effects of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc.*, Vol. 19, pp. 13A.

Boyd C.E. (1989). Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquacultures Department Series n° 2, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, Alabama.

Boyd C.E. et Watten B.J. (1989). Aeration systems in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.*, Vol. 1, pp. 425-472.

Bridges C. R., et Brand A.R., 1980. Oxygen consumption and oxygen - independence in marine crustaceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2, p. 133-141.

Brouwer M. (1992). Oxygen carriers as molecular models of allosteric behavior. *Adv. comp. environ. Physiol.* 13 : 1-26.

Burnet L.E. (1979). The effects of environmental oxygen levels on respiratory function of hémocyanin in the spider crab, *Libinia emarginata*, and the ghost crab, *Ocypode quadrata*. *J. Exp. Biol.* 210, 289-299.

Cebrian C., Andreu-Moliner E. (1990). Changes of oxygen consumption on *Procambarus clarkii* exposed to methidathion : Effect on isolated gills. *J. Environ. Sci. Health*, b25(6), 767-775.

Charmantier G, Charmantier-Daures M, Bouaricha N, Thuet P, Aiken DE, Trilles J-P (1988). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *Biol Bull* 175: 102-110

Charmantier G., Bouaricha N., Charmantier-Daures M., Thuet P. et Thrilles J.P. (1989). Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.*, Vol. 10, pp. 65-66.

Charmantier G., Soyez C., Aquacop. (1994). Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 178, pp. 233-246.

Charmantier G., L'osmorégulation chez les crevettes Penaeidae (Crustacea, Decapoda). Oceanis, Vol.13, Fasc. 2, 1987, pp. 179-196.

Charmantier-Daures M., Thuet P., Charmantier G., et Thrilles J.P. (1988). Tolérance à la salinité et osmorégulation chez les post-larves de *Penaeus japonicus* et *P. chinensis*. Effet de la température. Aquat. Liv. Res., Vol. 1, pp. 267-276.

Clark J.V. (1986). Inhibition of moulting in *Peneaus semisulcatus* (De Haan) by long-term hypoxia. Aquaculture, Vol. 52, pp. 253-254.

Cochard J.C., Lignot J.-H., Soyez, C., Lemaire, P. and Charmantier. (à paraître). Haemolymph osmolality according to nutritional status, molting stage and body weight of *Penaeus stylirostris*.

Cochard J.C., Soyez C., Lemaire P., Thuet P., Thrilles J.P., Charmantier G. (1992). Un nuevo taller diagnostico : La capacidad osmo-reguladora como indicador de estrés en el camaron. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, pp. 215-220.

Defur P.L., Mangum C.P., Reese J.E. (1990). Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long term hypoxia. Biol. Bull. 178 : 46-54.

Drach P., Tchernigovtzeff C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie Milieu. 18A: 595-610

Egusa S. (1961). Studies on the respiration of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Bate). II. Preliminary experiments on its oxygen consumption. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., Vol. 27, pp. 650-659.

Ellerton D.H., Ellerton N.F., Robinson H.A. (1983). Hemocyanin - a current perspective. Prog. Biophys. mol. Biol. 41 : 143-248.

Engel D.W. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus* : copper, zinc and metallothionein. Biol. Bull. 172 :69-81.

Engel D.W. , Brouwer M., McKenna S. (1993). Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as function of environmental conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol.93 : 235-244.

- Engel D.W., Brouwer M. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus* : metallothionein function in metal metabolism. Biol. Bull. 173 : 339-351.
- Engel D.W., Brouwer M. (1991). Short-term metallothionein and copper changes in the blue crabs at ecdysis. Biol. Bull. 180 : 447-452.
- Forgue J., Truchot J.P. et Massabuau J.C. (1992). Low arterial Po<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood oxygen-affinity. J. Exp. Biol. Vol. 170, pp. 257-264.
- Greenaway, P., Morris S., Sanders N. (1992). Blood gas transport and oxygen consumption in a supralittoral crab, *Leptograpsus variegatus* (Crustacea : Brachyura). Aust. J. Mar. Freshwater Res., 43 : 1573-84.
- Hagerman L. et Uglow R.F. (1981). Ventilatory behaviour and chloride regulation in relation to oxygen tension in the shrimp *Palaemon adspersus* maintained in hypotonic medium. Ophelia, Vol. 20, pp. 193-200.
- Hopkins J.S., Stokes A.D., Browdy C.L., et Sandifer P.A. (1991). The relationship between feeding rate, paddle-wheel aeration rate and expected dawn dissolved oxygen in intensive shrimp ponds. Aquacult. Eng., Vol. 10, pp. 281-290.
- Houlihan D.F., Waring C.P., Mathers E. and Gray C. (1990) - Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiol. Zool.* (63) 4 : 735-736.
- Kaushik S.J. and Medale F. (1994) - Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*. 124 : 81-97.
- Kulkarni G. K. et Joshi P. K., 1980. Some aspects of respiratory metabolism of a penaeid prawn, *Penaeus japonicus* (Bate) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Hydrobiologia*, 75 p 27-32.
- Lallier F. et Truchot J.P. (1989). Modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-Lactate and Urate in the prawn *Penaeus japonicus*. J. Exp. Biol. Vol. 147, pp. 133-146.
- Liao I.C. et Huang H.P. (1975). Studies on the respiration of economic prawns in Taiwan. I. Oxygen consumption and lethal dissolved oxygen of egg up to young prawn of *Penaeus monodon* (Fabricius). J. Fish. Soc. Taiwan, Vol. 4, pp.33-50.

Lin H.P., Charmantier G. et Thrilles J.P. (1991). Toxicité de l'ammonium au cours du développement post-embryonnaire de *Penaeus japonicus*. Effets sur l'osmorégulation. C. R. Acad. Sci., Paris, Vol. 312, pp. 99-105.

Lin H.P., Charmantier G., Thuet P. et Thrilles J.P. (1992). Effects of turbidity on survival, osmoregulation and gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase in the shrimp *Penaeus japonicus*. Mar. Ecol., Progr. Ser., Vol. 90, pp. 31-37.

Lin H.P., Thuet P., Thrilles J.P., Mounet-Guillaume R. et Charmantier G. (1994). Effects of ammonia on survival and osmoregulation at various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. Mar. Biol., Vol. 117, pp. 591-598.

Lin H.P., Thuet P., Trilles J.P., Mounet-Guillaume R., Charmantier G., (1993). Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. Marine Biology 117: 591-598

MacKay R.D. (1974). A note on minimal levels of oxygen required to maintain life in *Penaeus schmitti*. Proc. Ann. Meet. World Maricult. Soc., Vol. 5, pp. 451-452.

Madenjian C.M., Rogers G.L. et Fast A.W. (1987). Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn ponds of Hawaii : Part I. Evaluation of traditional methods. Aquacult. Eng., Vol. 6, pp. 191-208.

Mantel L.H. Farmer L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. 53-161 In Farmer, L.L. (eds): Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press.

Massabuau J.C. et Burtin B. (1984). Regulation of oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* at different levels of oxygenation : role of peripheral  $\text{O}_2$  chemoreception. J. Comp. Physiol. B., Vol. 155, pp. 43-49.

Massabuau J.C., Soyez C. (à paraître). How is blood oxygenation regulated in the prawn *Penaeus japonicus*. European Society and Comparative Physiology and Biochemistry.

McMahon, B. R., Burggren, W. W., and Wilkens, J. L. (1974). Respiratory responses to long term hypoxic stress in the Crayfish *Orconectes virilis*. J. Exp. Biol. 60, 195-206.

Pequeux A.J. et Gilles R. (1984). Control of extracellular fluid osmolality in crustaceans. In, *osmoregulation in estuarine and marine animals*, edited by Pequeux A. and al., Springer-Verlag, Berlin, pp. 17-34.

Sandifer P.A., Hopkins J.S. et Stokes A.D. (1987). Intensification of shrimp culture in earthen ponds in South Carolina : progress and prospects. *J. World Aquac. Soc.*, Vol. 19, pp 218-226.

Sandifer P.A., Hopkins J.S. et Stokes A.D. (1987). Intensive culture potential of *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, Vol. 18, pp. 94-100.

Seidman E.R. et Lawrence A.L. (1985). Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *P. monodon* grown at different dissolved oxygen levels. *J. World Maricult. Soc.*, Vol. 16, pp. 333-346.

Spaargaren D.H. (1977). On the metabolic adaptation of *Carcinus maenas* to reduced oxygen tensions in the environment. *Neth. J. Sea Res.*, Vol. 11, PP. 325-333.

Taylor A. C., 1976. The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. *J. exp. Biol.*, 65, p. 309-322.

Taylor A.C. et Brand A.R., (1975). Effect of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve *Arctica islandica* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 19, p. 187-196.

Tournier H. (1972). Conditions d'acclimatation des crevettes *Penaeus kerathurus* et *P japonicus* dans les eaux du littoral languedocien. *Sci. Pêche, Bull. Inst. pêches Marit.*, Vol. 213, pp. 1-13.

Trausch G., Forget M. Cl., Devos P. (1989) - Biamines-stimulated phosphorylation and (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the gills of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 94b, N<sup>o</sup>. 3, pp. 487-49.

Truchot J.P. (1993). Crustaceans as experimental animals for metabolic and transport physiology. *Aquat. Living Ressour.*, Vol. 6, pp. 343-349.

Truchot J.P. et Jouve-Duhamel A. (1983). Consommation d'oxygène de la crevette japonaise, *Penaeus japonicus*, en fonction de l'oxygénation du milieu : Effets de la température et de l'acclimatation à des conditions ambiantes hypoxiques. *Bases biologiques de l'aquaculture*. Montpellier. IFREMER. Actes de Colloques n. 1, p. 245 à 254.

Van Holde K.E., Miller K. (1982). Haemocyanins. Q. Rev. Biophys. 15 : 1-70.

Weppe M., Bonami J.R., Lightner D., Aquacop, (1992). Demostracion de altas cualidades de la capa de *P.stylirostris* (Aquacop SPR 43) resistente al virus IHHN. Memorias I congreso Ecuatoriano de Acuicultura, pp. 229-232.

Wickins J.F. (1976). Prawn biology and culture. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., Vol. 14, pp. 435-507.

Young-Lai W.W., Charmantier-Daures M., Charmantier G., (1991). Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. Mar. Biol. 110: 293 300

