



COMPTE RENDU D'ACTIVITE
DU
LABORATOIRE D'AQUACULTURE TROPICALE

--ooOoo--

PERIODE : JANVIER A DECEMBRE 1997



Centre Océanologique du Pacifique

B.P. 7004 - 98719 TARAVALO - TAHITI - Polynésie Française
Tél. 54.60.00 - Télécopie : (689) 54.60.99

COMPTE RENDU D'ACTIVITE
DU
LABORATOIRE D'AQUACULTURE TROPICALE

--ooOoo--

PERIODE : JANVIER A DECEMBRE 1997

Type de rapport : Rapport annuel	
Numéro d'identification du rapport : <u>DRV/AQ/TAH 98.15</u>	date de publication
Diffusion : libre	nombre de pages :
Validé par :	bibliographie (Oui / Non)
Adresse électronique :	illustration(s) (Oui / Non)
- chemin UNIX :	langue du rapport
- adresse WWW :	
Titre et sous-titre du rapport : .	
Compte-rendu d'activité du laboratoire d'Aquaculture Tropicale - Janvier à Décembre 1997.	
Titre traduit :	
Auteur(s) principal(aux) :.	Organisme / Direction / Service, laboratoire
AQUACOP (Equipe d'Aquaculture du COP)	DRV/RA/Aquaculture Tropicale
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
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)	

Résumé :

Bilan de l'activité des différents programmes de recherche du laboratoire d'Aquaculture Tropicale du Centre Océanologique du Pacifique au cours de l'année 1997 :

- Crevettes pénaïdes : Ecophysiologie, Pathologie, Nutrition, Génétique, Cryoconservation, Physiologie du développement
- Huître perlière : Physiologie, Ecophysiologie, Bilan énergétique

Abstract :

Progress report of the different research programs of the tropical aquaculture laboratory of the « Centre Océanologique du Pacifique » (January to December 1997) :

- Penaeid shrimp : Ecophysiologie, Pathology, Nutrition, Genetics, Cryopreservation, Development physiology
- Pearl oyster : Physiology, Ecophysiologie, Nutrition

Mots-clés : .Aquaculture tropicale, pénaïdes, huitres perlières, Polynésie Française

Keywords : Tropical aquaculture, penaeid shrimp, pearl oyster, French Polynesia

Commentaire :

DIFFUSION

Exemplaires

- DRV/D	1
- DRV/RA/D	1
- DS	1
- Délégation IFREMER en Nouvelle-Calédonie	1
- Délégation IFREMER à la Réunion	1
- Délégation IFREMER en Guyane	1
- Brest - Bibliothèque	2
- Nantes - Bibliothèque	2
<u>Comité de Direction R.A.</u>	
- J.L. MARTIN - R.A. Tahiti (COP)	1
- M. HERAL - CREMA L'Houmeau	1
- J.L. GAIGNON - R.A. Brest	1
- H. GRIZEL - R.A. Sète	1
<u>Laboratoires R.A.</u>	
- Laboratoire Conchylicole de Normandie (Port-en-Bessin)	1
- Unité Mixte INRA/IFREMER Nutrition (Brest)	1
- Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (Brest)	1
- Laboratoire de Physiologie et Zootechnie des Poissons (Brest)	1
- Laboratoire Conchylicole de Bretagne (La Trinité)	1
- Laboratoire Conchylicole de Pays de Loire (Bouin)	1
- Laboratoire Conchylicole de Charente-Poitou (La Tremblade)	1
- Laboratoire Génétique Aquaculture Pathologie (La Tremblade)	1
- CREMA (L'Houmeau)	1
- DRIM (Montpellier)	1
- Laboratoire Conchylicole de Méditerranée (Palavas)	1
- Laboratoire MERECA (Palavas)	1
- Laboratoire Aquacole de la Martinique	1
- Laboratoire Aquacole de Nouvelle-Calédonie	1
<u>URM</u>	
- URM n°16 - Professeur F. BONHOMME - Montpellier	1
- URM n°14 - Professeur VAN WORMHOUDT - Concarneau	1
<u>COFREPECHE</u>	
- Siège	1
- Brest	1
<u>EXTERIEUR</u>	
- M. AUTRAND, Ingénieur Conseil	1
- SEPIA-CONSEIL	1
- LTDV Nouvelle-Calédonie	1
- CENAIM (E. MIAHLE)	1
<u>IFREMER/Tahiti</u>	
- COP/D	1
- AQUACOP	9
- DRO (Y. Morel)	1
- RH (R. Abbes)	1
- Bibliothèque	2

- Minute	1
<u>Tahiti</u>	
- SRM - Papeete	1
- Ecloserie Polyvalente Territoriale	1
- Institut Territorial de Recherche Louis Malardé	1
- UFP, laboratoire d'Ecologie Marine (C. Payri)	1
- UFP, laboratoire de Biologie Cellulaire (B. Martin)	1
- UFP, Professeur C. HERBAUT	1
- ORSTOM	1
- Museum d'Histoire Naturelle, EPHE, antenne de Moorea	1
- Dr. R. Bagnis, Chargé de Mission pour la Recherche	1
- Délégation Territoriale à la Recherche	1

SOMMAIRE

PRÉSENTATION DU LABORATOIRE	8
Rattachement aux thèmes fédérateurs	8
Personnels affectés au laboratoire	8
Mouvements de personnel	9
Stages	9
Crédits affectés au Laboratoire	10
Fonctionnement (en FF)	10
Investissement (en FF)	10
Infrastructures	10
Equipements >10 KF	10
Assistance technique et transfert	10
Activités diverses	10
Formation des personnels	10
Missions en France, DOM-TOM et Etranger	11
Visites diverses	12
PROGRAMES SCIENTIFIQUES FILIERE CREVETTE	13
AQUACULTURE ET ENVIRONNEMENT	13
Rappel des objectifs	13
Travaux réalisés et principaux résultats	13
Influence de la qualité de l'eau d'alimentation des bassins d'élevage	13
Evaluation d'un indice de l'état nutritionnel	17
Coopérations nationales et internationales	19
ECOPHYSIOLOGIE	20
Rappel des objectifs	20
Travaux réalisés et principaux résultats	20
Etude in vitro du pH sur la PO de l'hémolymphe (P. Stylirostris, souche SPR 43)	20
Etude in vitro : Influence de la variation de température sur la pression osmotique de l'hémolymphe de crevettes P. Stylirostris	21
Etude in situ : Etude de l'influence des sédiments du bassin d'élevage sur la physiologie de Penaeus stylirostris (Rapport Cochard et al., 1997)	23
Etude in Situ : variation spatiale de la pression osmotique des crevettes en liberté dans un bassin d'élevage (rapport de mission D. Soyez, 1997).	26
ALIMENTS PEU POLLUANTS	28
Rappel des objectifs	28
Travaux réalisés et principaux résultats	28
Besoins nutritionnels.	29
Métabolisme des subadultes	32
Extension de l'approche sur les aliments moins polluants à la Nouvelle Calédonie (NC).	33
Actions extérieures.	34

PATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	35
Axes de recherches développés en 1997	35
Suivi sanitaire et diagnostic des pathogènes (E32003):	35
Etude des défenses de la crevette (E31003)	35
Etude des interactions hôtes-pathogènes et hôtes-milieu (E32003)	36
Application au testage d'immunostimulants (E33003)	36
Application à la sélection génétique	36
Travaux réalisés et principaux résultats	36
Suivi sanitaire et diagnostic des pathogènes (E32003)	36
Etude des défenses de la crevette (E31003)	41
Etude des interactions hôtes-pathogènes et hôtes-milieu (E32003)	44
Application au testage d'immunostimulants (E33003)	49
Application à la sélection génétique	50
Perspectives	51
Suivi sanitaire et diagnostic des pathogène :	51
Caractérisation des souches de crevettes (conservatoire à <i>P.stylostris</i> / <i>P.vannamei</i> / <i>P. monodon</i> / <i>P. indicus</i>) élevées au COP dans le cadre de leur valorisation	51
Etude des interactions crevettes-pathogènes	52
Etude des interactions crevettes-milieu	52
Collaborations	52
DOMESTICATION ET AMELIORATION GENETIQUE	52
Rappel des objectifs	52
Travaux réalisés et principaux résultats	53
Physiologie de la croissance et de la reproduction (E11003) et Optimisation des filières de production (E22003)	53
Amélioration et sélection de souches (E42003)	60
Ressources génétiques (E41003)	71
PROGRAMMES SCIENTIFIQUES FILIERE HUITRE PERLIERE	76
Programme Général de Recherche sur la Nacre	76
Rappel des objectifs	76
Réalisation du PGRN	76
Principaux résultats	77
Suivi du Milieu et de la Croissance	77
Physiologie	78
Apports de la télédétection	80
Alimentation de la nacre	81
Etude des compétiteurs alimentaires de la nacre	81
Etude des stocks de nacres et de compétiteurs à Takapoto.	82
Réseau de suivi des lagons et de la perliculture	82
Etude des stress subis par la nacre au cours des opérations d'élevage	82
Veille pathologique	82
Fonds bibliographique	83
Projet Amphybi	83
PUBLICATIONS 1997 DU LABORATOIRE AQUACULTURE TROPICALE	84

Présentation du Laboratoire

Rattachement aux thèmes fédérateurs

N° Sous Projet	Intitulé
E11003	Crevettes/Physiologie de l'adaptation, de la croissance, de la reproduction
E41003	Crevettes/Ressources Génétiques
E42003	Crevettes/Amélioration et sélection de souches
E12003	Crevettes/Nutrition et alimentation
E31003	Crevettes/Étude des Mécanismes de Défense
E32003	Crevettes/Agents pathogènes et épidémiologie
E33003	Crevettes/prophylaxie et traitement
E22003	Crevettes/Optimisation des filières de production
A31002	PGRN-Lagon Takapoto Huitre perlière
A32004	Crevettes/Autres écosystèmes aquacoles

Personnels affectés au laboratoire

Personnels statutaires affectés au laboratoire (31/12/97)

Cadres

Nom et Prénom	Qualification	Projet
BEDIER Edouard	Cadre II	E41003-E42003
BODOY Alain	Cadre II	A31002
CHIM Liet	Cadre I	A32004
CUZON Gérard	Cadre II	E12003
GOGUENHEIM Jean	Cadre I	E21003-E41003
JONQUIERES Gérard	Cadre I	A31002-
LE MOULLAC Gilles	Cadre I	E31003-E32003-E33003
MARTIN Jean-Louis	Cadre III	Chef du Laboratoire
PATROIS Jacques	Cadre II	E11003
SAULNIER Denis	Cadre I	E31003-E32003-E33003

Techniciens

Nom et Prénom	Qualification	Projet
ANSQUER Dominique	G5	E31003-E32003-E33003
BENNETT Auguste	G4	A31002
BERNARDINO René	G4	A32004
CAIXER Xavier	G4	A31002
DUFOUR Robert	G4	E41003-E42003
HAFFNER Philippe	G5	A32004
LE DEAN Loïc	G5	E41003-E42003
LEHARTEL Mathilde	G4	Secrétariat
LEMAIRE Pierrette	G5	E11003
LEVY Péva	G3	E31003-E32003-E33003
MAI Gérald	G4	E12003
MAIHOTA Mayalène	G4	E12003
MOU Louise	G5	E41003-E42003
NEDELEC Georges	G5	E12003
PEIGNON Jean-Marie	G5	E41003-E42003
SOYEZ Claude	G4	E11003
TEISSIER Hinano	G4	A31002
TETUMU Roger	G3	E11003
TIAPARI Jérôme	G4	A31002
VANAA Vincent	G4	E41003-E42003
VONAU Vincent	G4	E41003-E42003

VAT

Nom et Prénom	Analytique
BIANCHERI David	E11003
BOULANGE Frédéric	E42003
BEUZART Yvan	E41003
BRUNO Nicolas	E12003
LAGARDE Franck	A31002
LEPEUT Jean-Julien	A32004
VERNIER Sébastien	A31002

Mouvements de personnel

Arrivées		Départs	
Nom	Projet	Nom	Projet
L. CHIM	A32004	P. GAREN	A32004
		J MORICEAU	A32004
		JC COCHARD	E11003
		S ROBERT	A31002

V.A.T.

Arrivées		Départs	
Nom	Projet	Nom	Projet
B NICOLAS	E12003	M FAUCON	E12003
Y BEUZARD	E41003		
F LAGARDE	A31002		

Stages

Stages étudiants

- GANGNERY Aline (ESIPTA Rouen)	: 1/03 au 31/08/97
- PONS Benjamin (CREUFOP Montpellier)	: 1/06 au 31/08/97
- LE PAGE Stanislas (ISTOM Cergy-Pontoise)	: 15/07 au 15/09/97
- PHILIP DE LABORIE L. (Université de Caen)	: 12/05 au 31/12/97
- DUBOIS Maui (Lycée Pomare IV Papeete)	: 15/12 au 24/12/97

Thésards

- S. POURVREAU (ENSAR), Bourse MESR, Direction de Thèse IFREMER
- L. ADESSI (U.F.P.), Bourse Territoire/EVAAM, Direction de Thèse UFP, accueillie au COP

Crédits affectés au Laboratoire

Fonctionnement (en FF)

Analytique	60	625	Autres	TOTAL	
A31002	99 965	185 122	45 352	330 439	PGRN/Lagon de Takapoto, Huitres Perlières
A32004	1 901	12 467	3 638	18 005	Crevettes/Autres Systèmes Aquacoles
E11003	49 683	54 072	29 887	133 641	Crevettes/ Physiologie de la reproduction
E12003	115 037	46 780	4 730	166 547	Crevette/Nutrition et Alimentation
E22003	125 841	12 832	11 771	150 444	Crevettes/Optimisation des Techniques
E31003	51 632	30 100	18 374	100 107	Crevettes/Etude des Mécanismes de Défense
E32003	51 169	151	4 232	55 552	Crevettes/Agents Pathogènes et Epidémiologie
E33003	591		6 244	6 835	Crevette/Prohylaxie et Traitements
E41003	102 024	53 776	18 316	174 116	Crevettes/Ressources Génétique
E42003	38 381		7 070	45 451	Crevette/Amélioration Génétique
TOTAL	636 224	395 300	149 613	1 181 137	

Investissement (en FF)

Infrastructures

Réalisation d'une zone de quarantaine:	80 500 FF	E42003
Structure de levage bateau:	22 200 FF	A31002

Equipements >10 KF

Balance d'analyse Mettler	40 800 FF	A31002
Banc photo pour électrophorèse	22 600 FF	E31003
Distillateur Aquatron	25 000 FF	E31003
Imprimante Laser	21 100 FF	A32003
Cuve cryogénique	21 300 FF	E11003
Microtome	50 400 FF	E31003
portable IBM	21 000 FF	A31002
équipement pour électrophorèse	45 300 FF	E31003

Assistance technique et transfert

Expertise de l'Ecloserie Territoriale, suivi d'un cycle de production larvaire de crevette

Activités diverses

Formation des personnels

- P. LEMAIRE : Immunologie (U.F.P.-Papeete)
- P. LEMAIRE : Radios éléments (Laboratoire d'Arago - Banyuls)
- J. PATROIS : Amélioration Génétique en Aquaculture (INAPG-Camaret)
- X. CAISEY : Photos sous-marines (FFESSM - Papeete)
- A. BODOY : Plongée B (AEPF-Papeete)
- C. SOYEZ : Plongée B (AEPF-Papeete)
- Groupe : Word (FPS-Papeete)
- Groupe : Excel (FPS-Papeete)

- Groupe : Secourisme (COP)
- Groupe : Recyclage plongée (COP)

Missions en France, DOM-TOM et Etranger

Janvier

- E. BEDIER : Contacts avec partenaires australiens (CSIRO) dans le cadre de la coopération franco-australienne. Discussion avec les équipes de Nouvelle-Calédonie sur le programme crevette.

Février

- E. BEDIER et G. CUZON : Participation à la World Aquaculture Society à Seattle (USA).

Mars

- J.L. MARTIN : Réunion de Département à Nantes

- A. BODOY, S. ROBERT, A. BENNETT et S. POUVREAU : Physiologie et modèle de croissance de l'huître perlière à Takapoto.

- P. LEVY : Respiration des bivalves à Takapoto.

- J.C. COCHARD: Jury de thèse à Montpellier

Avril

- X. CAISEY : Filtration de *Pinctada maculata* (huître pipi) compétiteur de la nacre et détermination de la surface du siphon exhalant de la nacre par macrophotographie à Takapoto.

- S. ROBERT : Respiration de *Pinctada maculata* (huître pipi) à Takapoto.

Mai

- J.L. MARTIN, J.C. COCHARD, G. CUZON et G. NEDELEC : Participation au Congrès EAS/Martinique.

- A. BODOY et A. BENNETT : Mise en place du réseau sur la nacre à Rangiroa.

- A. BODOY : Etude des stocks de nacres et compétiteurs à Takapoto.

Juin

- E. BEDIER : Participation au Congrès Génétique à Stirling et contacts avec différents laboratoires métropolitains.

- P. GAREN : Programme STD3 - Synthèse des travaux effluents crevettes en Nouvelle-Calédonie.

- X. CAISEY et L. ADESSI : Filtration d'un compétiteur de la nacre *Pinctada maculata* (huître pipi).

- A. BENNETT : Mise en place du réseau sur la nacre à Rangiroa.

Septembre

- A. BODOY : Participation au jury de stage d'Aline GANGNERY et participation à la réunion nacre à Nantes.

- A. BENNETT : Suivi du réseau sur la nacre à Rangiroa.

Octobre

- J.L. MARTIN : Réunion de Département à Nantes.

- L. CHIM : Coordination des travaux de recherche en aquaculture-environnement avec la Nouvelle-Calédonie.

- G. CUZON : Etude des problèmes liés aux aliments (croissance, finition, démarrage) pour le développement de l'aquaculture en Nouvelle-Calédonie. Identification des aspects nutritionnels liés à des pathologies observées.

- G. LE MOULLAC et D. SAULNIER : Participation au congrès équatorien d'aquaculture à Guayaquil (Equateur). Réunions INCO/DC. Séjour au CENAIM.

Novembre

E. BEDIER : Coopération franco-équatorienne. Programme INCO-DC - Réunion avec producteurs équatoriens.

- X. CAISEY, G. JONQUIERES, J. TIAPARI, S. POUVREAU et M. GARNIER : Filtration de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* par les méthodes des biodépôts, de la fluorimétrie et de Seston à Takapoto.

Décembre

- C. SOYEZ : Transfert de techniques liées à l'osmorégulation chez les pénéides en Nouvelle-Calédonie.

- J.C. AVARRE : Transfert de diagnostics par polymérase chain réaction (PCR) en Nouvelle-Calédonie.

- Y. BEUZART : Visite du laboratoire « Bodega Bay Marine » à San Francisco pour se renseigner sur les techniques de coloration et marquages des microsattellites (marqueurs génétiques moléculaires).
- A. BENNETT : Mise en place du réseau sur la nacre à Arutua.

Visites diverses

Février

- D. LIGTHNER, Université Arizona, Tucson Lab.
- P. TERIITEHAU, Directeur EVAAM Tahiti.

Mars

- Y. HARACHE (RA/D), A. GERARD (La Tremblade) et J.L. M. MARTIN (CREMA).

Avril

- J.M. AMOUROUX, CNRS Banyuls, Projet ECOS: dosage des AAE dans l'aliment crevette.

Mai

- M. P. DAVID, Président Directeur Général de l'IFREMER et M. A. MICHEL, Chargé de mission auprès de DRV/D.

Juillet

- F. DOMINGUEZ, Aquanova.

Août

- M. B. DUJARDIN, Président de l'Institut Océanographique National.

Septembre

- M. R. TOUSSAINT, Président Directeur Général de COFREPECHE.

Octobre

- M. T. FAIREKA, Ministre de la Santé, du Tourisme et du Transport des îles Cook.
- P. CAUMETTE, Président de la Commission ECOREC.

Novembre

- M. LEICHLE, Commission de gestion des Fonds de Développement de l'Après CEP.

PROGRAMES SCIENTIFIQUES

FILIERE CREVETTE

AQUACULTURE ET ENVIRONNEMENT

Projet A32004: Crevettes/Autres Systèmes Aquacoles

Rappel des objectifs

L'année 1997 est marquée par le changement en milieu d'année (juillet 1997) du chercheur et du technicien en charge de la conduite de ce programme. Ce changement coïncidait avec la clôture du projet STD3 qui représentait l'ossature des activités du laboratoire. L'objectif du premier semestre, défini par l'ancienne équipe, est, par conséquent, le même que celui des années précédentes. Cet objectif est de connaître et de comprendre le fonctionnement de l'écosystème bassin en élevage intensif. Il s'est réalisé par les actions suivantes :

- La détermination des voies principales de la transformation de la matière organique dans le système en fonction de différents modes de gestion des élevages. L'azote est utilisé dans ce cas comme traceur de la matière organique.
- La détermination qualitative et quantitative des effluents sortant du système en fonction des modes de gestion des élevages.
- La mise en place d'un système de recirculation et traitement des rejets.

En fait les deux premières actions ont été réalisées en 1996 et seule la troisième action a été abordée durant le premier semestre 1997.

L'aboutissement du programme STD3 et simultanément le renouvellement de l'équipe du laboratoire concourent à faire du deuxième semestre de 1997 une période nécessaire de réflexion sur les suites à donner au programme. Cette réflexion est menée en étroite collaboration avec les équipes du CREMA et la SASV. Une chose nous apparaît clair d'emblée, nos travaux dans le futur chercheront à répondre aux questions posées par la profession de Nouvelle-Calédonie. Ainsi, notre modèle d'étude devra satisfaire à deux contraintes : - l'espèce de crevette qui devra être *P. Stylirostris* - et le système d'élevage qui devra être du semi-intensif en bassin de terre avec ou sans aération.

Au cours du second semestre, nous avons également mené à bien quelques expérimentations préliminaires en vue d'évaluer l'hépatopancréas de la crevette *P. Stylirostris* comme organe indicateur de l'état nutritionnel des animaux. Un tel indice, outre son intérêt dans le suivi en routine du cheptel des élevages commerciaux, représenterait un outil additionnel dans notre projet d'étude de la capacité trophique des bassins.

Travaux réalisés et principaux résultats

Influence de la qualité de l'eau d'alimentation des bassins d'élevage

Il a été précédemment vérifié que les eaux d'évacuation d'élevage intensif de crevettes pouvaient encore être utilisées pour alimenter un autre élevage de crevettes. Le fonctionnement de l'écosystème bassin en est-il alors modifié ou simplement déplacé ?

Huit élevages ont été réalisés en bacs de béton de 13 m³, avec des crevettes de poids moyen initial 5.7 +/- 2.4 g et à une charge initiale de 412 g.m⁻³. L'aliment utilisé était le même que dans les essais standards précédents, ainsi que l'aération et le taux de renouvellement d'eau. Deux sources différentes d'eau de renouvellement des élevages ont été comparées : l'eau du lagon (LG, standard) et l'eau de rejet d'un bassin d'élevage intensif (B).

Les performances zootechniques de ces élevages ne sont pas bonnes, ce qui peut enlever de l'intérêt à la construction des bilans azotés. Survies et taux de conversion de l'aliment sont en effet en-dessous des moyennes de routine espérées en élevage intensif. Les croissances par contre correspondent aux valeurs habituelles en élevage intensif et sont peu différentes d'un traitement à l'autre (0.147 et 0.140 g.j⁻¹ respectivement).

La différence de qualité des eaux d'alimentation des élevages est bien marquée dans le particulaire (Table 1), avec des concentrations toujours plus fortes en eau de rejet (B) qu'en eau de lagon (LG). La concentration moyenne de seston total est de 16.68±12.54 mg.l⁻¹ pour LG et de 42.73±23.68 mg.l⁻¹ pour B. Les concentrations de seston organique diffèrent également (9.96±10.28 et 26.49±15.54 mg.l⁻¹ respectivement) avec des pourcentages de seston organique de 50.4±15.6 % et 63.5±11.6 % respectivement. Les concentrations respectives d'azote particulaire sont de 0.019±0.026 mg.l⁻¹ (LG) et 0.166±0.070 mg.l⁻¹ (B). En revanche les concentrations d'azote total dissous ne diffèrent pas significativement d'une eau à l'autre (1.202±0.325 et 1.683±0.867 mg.l⁻¹ respectivement pour LG et B).

Eau d'alimentation	LG	B
Seston total mg.l ⁻¹	16.68±12.54	42.73±23.68
Sest. organique mg.l ⁻¹	9.96±10.28	26.49±15.54
Sest. orga. %	50.4±15.6	63.5±11.6
N particulaire mg.l ⁻¹	0.019±0.026	0.166±0.070
N total dissous mg.l ⁻¹	1.202±0.325	1.683±0.867

Table 1 : Concentrations moyennes des principaux paramètres de qualité de l'eau dans les eaux d'alimentation des élevages.

La différence de qualité des eaux d'évacuation est également bien marquée entre traitements (Table 2). La moyenne des concentrations de seston total augmente en effet fortement de LG (57.85±35.89 mg.l⁻¹) à B (100.57±51.66 mg.l⁻¹). Il en est de même pour la concentration en seston organique (36.18±24.77 et 61.41±38.67 mg.l⁻¹ respectivement) et la concentration en azote particulaire (0.197±0.115 et 0.365±0.145 mg.l⁻¹ respectivement). Le pourcentage de seston organique par rapport au seston total reste par contre stable (58.4±9.5% pour LG et 59.7±10.2% pour B). Il n'y a en outre pas de différence significative entre les deux traitements pour la concentration d'azote dissous (1.513±0.246 et 1.841±0.276 mg.l⁻¹ pour LG et B respectivement). L'évolution de ces paramètres au cours des élevages est décrite dans les Figures 1 à 4.

Les concentrations en sortie d'élevage sont dans les deux traitements supérieures aux concentrations en entrée (la Table 3 indique cet accroissement). L'augmentation de ces concentrations est forte pour le particulaire, (seston total et organique, azote particulaire) mais la

Eau d'évacuation	LG	B
Seston total mg.l ⁻¹	57.85	100.57
Sest. orga. mg.l ⁻¹	36.18	61.41
Sest. orga. %	58.4	59.7
N particulaire mg.l ⁻¹	0.197	0.365
N total dissous mg.l ⁻¹	1.513	1.841

Table 2 : Moyenne des concentrations des principaux paramètres de qualité de l'eau dans les eaux d'évacuation des élevages.

proportion de matériel organique reste stable. La variation est plus discrète pour le dissous (azote total dissous). Ceci est essentiellement explicable par l'augmentation de la quantité de déchets organiques (fèces, restes d'aliment,...) et par la croissance du phytoplancton. Ce développement

du phytoplancton se fait par utilisation de l'azote dissous dont la concentration n'augmente alors plus de manière forte.

Diff. Sortie - Entrée	LG	B
Seston total mg.l ⁻¹	41.2 (71.2)	57.8 (57.5)
Sest. orga. mg.l ⁻¹	26.2 (72.5)	34.9 (56.9)
Sest. orga. %	8.1	-3.7
N particulaire mg.l ⁻¹	0.178 (90.4)	0.198 (54.4)
N total dissous mg.l ⁻¹	0.311 (20.6)	0.158 (8.6)

Table 3 : Différences entre eaux de sortie et eaux d'entrée des concentrations des principaux paramètres de qualité de l'eau. Les nombres entre parenthèses indiquent les pourcentages de la concentration de sortie.

Il est intéressant de noter que si les concentrations des paramètres considérés augmentent de manière similaire dans les deux traitements, la part de la concentration en sortie représentée par l'augmentation dans l'élevage est plus élevée pour le traitement LG que pour le traitement B. Sur eau LG, 90.4 % de l'azote particulaire rejeté a été « fabriqué » dans l'élevage, contre 54.4 % sur eau B. En revanche seulement 20.6 % et 8.6 % respectivement de l'azote total dissous rejeté proviennent de l'élevage. Ceci indique tout d'abord une plus grande stabilité du milieu d'élevage construit sur eau de rejet.

Les résultats de cette expérimentation confirment la possibilité de réutilisation complète des eaux d'élevages intensifs de crevette pour produire d'autres crevettes. C'était la première étape de la troisième action du programme : « mise en place d'un système de recirculation et traitement des rejets. ». Il reste maintenant à décrire, mettre en oeuvre les moyens pratiques de cette recirculation et d'en tester le fonctionnement.

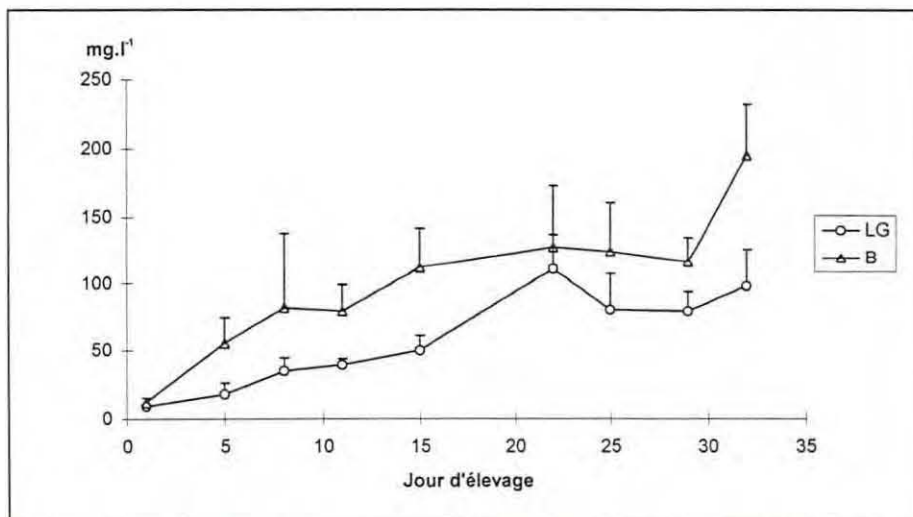


Figure 1 : Effet de la qualité de l'eau d'alimentation sur l'évolution en élevage de la concentration en seston total.

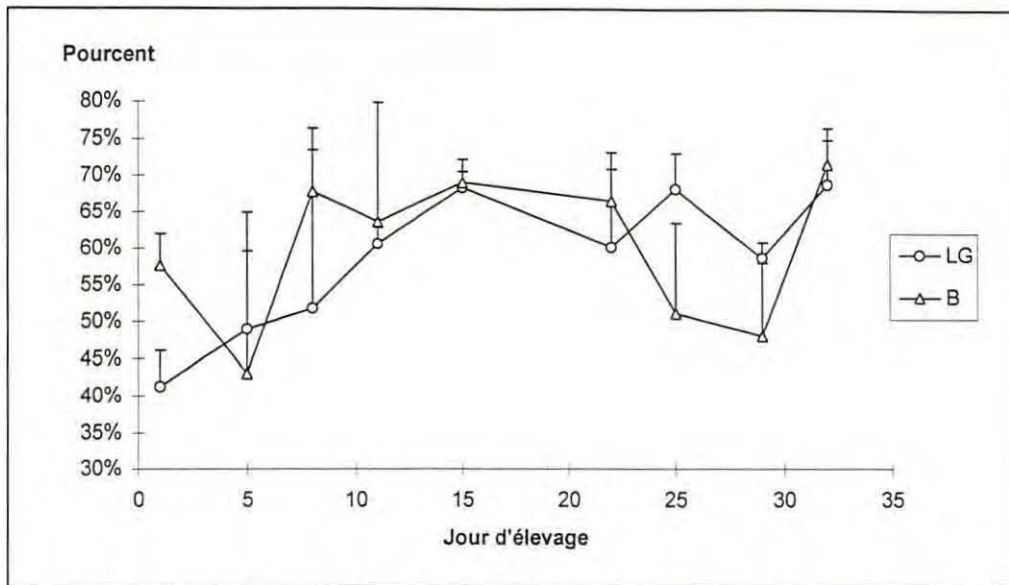


Figure 2 : Effet de la qualité de l'eau d'alimentation sur l'évolution en élevage du seston organique en pourcentage du seston total.

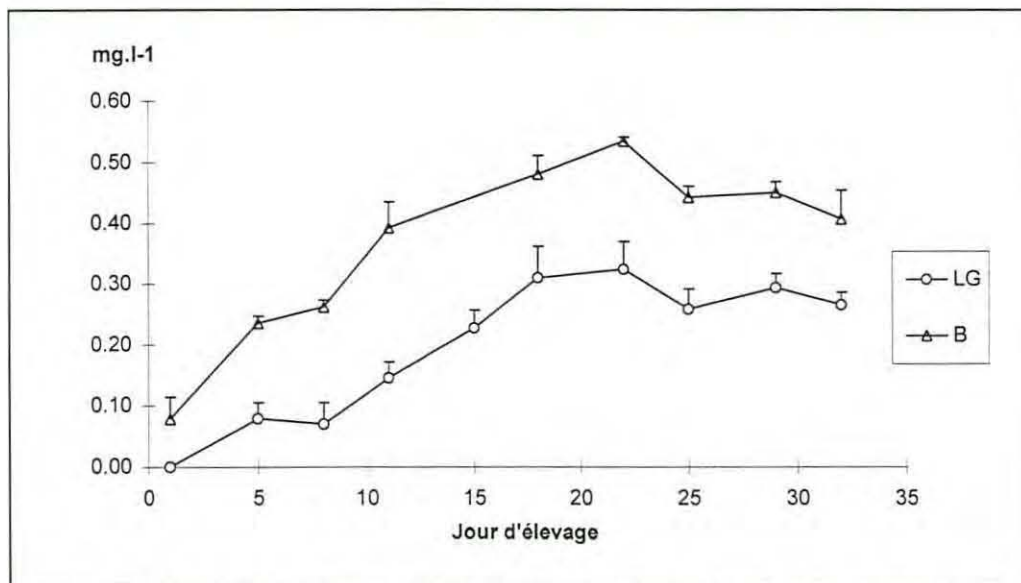


Figure 3 : Effet de la qualité de l'eau d'alimentation sur l'évolution en élevage de la concentration en azote particulaire.

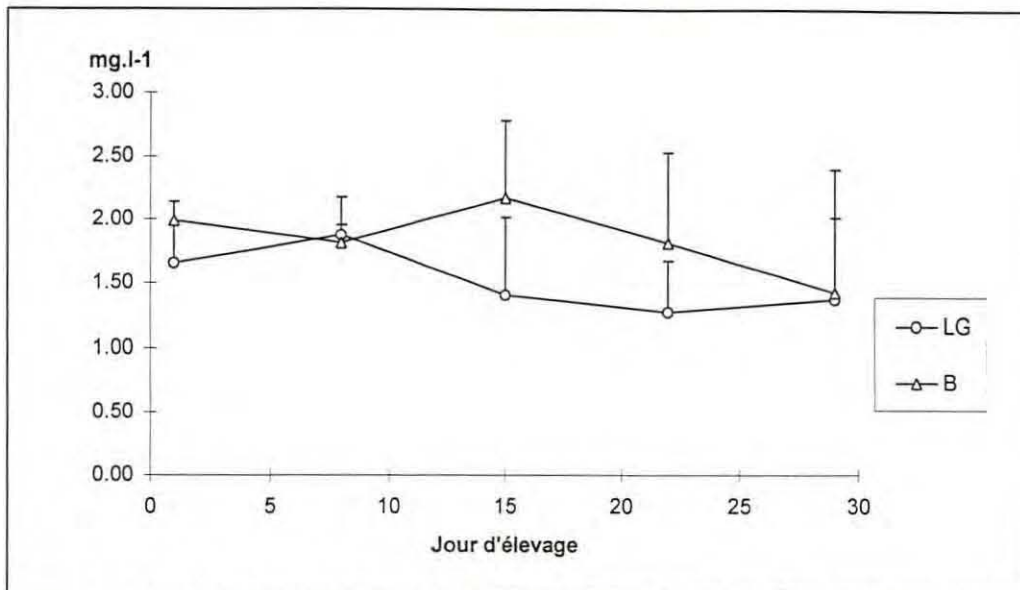


Figure 4 : Effet de la qualité de l'eau d'alimentation sur l'évolution en élevage de la concentration en azote total dissous.

Evaluation d'un indice de l'état nutritionnel des animaux

Chez les crustacés, l'hépatopancréas forme le plus important tissu de stockage organique et minéral et joue un rôle important dans la régulation de la distribution des nutriments vers les autres tissus.

L'étude des réserves de cet organe devrait nous donner une bonne indication de l'état nutritionnel des animaux. C'est dans cette perspective que nous avons réalisé les expériences qui suivent:

a) Evolution des réserves de l'hépatopancréas en fonction du stade d'intermue.

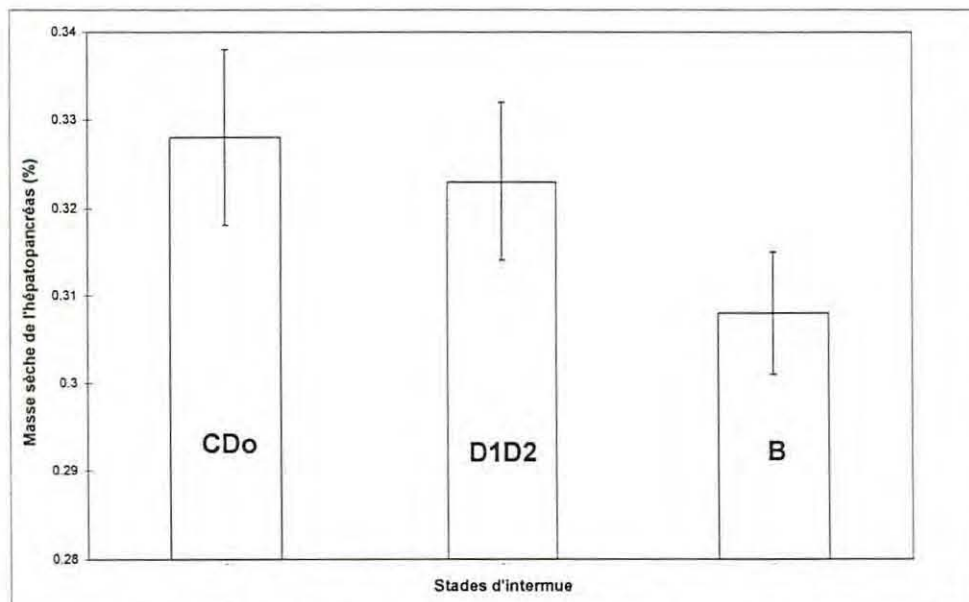


Figure 5 : Etat des réserves de l'hépatopancréas (% de matière sèche) en fonction du stade d'intermue.

La mobilisation des réserves de l'hépatopancréas des animaux après la mue (Stade B) est montrée dans la figure n°5. Dans la suite de notre étude, les animaux au stade B de l'intermue ne seront plus pris en compte.

b) Evolution de la masse sèche relative de l'hépatopancréas en fonction du temps de jeûne :

Nous avons soumis des animaux au jeûne durant 168 h. Dix animaux sont sacrifiés toutes les 24 heures, leur hépatopancréas prélevé, pesé, avant et après séchage (vingt quatre heures à l'étuve à 95°C). Les résultats sont présentés dans la figure n° 6.

Le taux de masse sèche de l'hépatopancréas décroît rapidement et après 48 h cette décroissance est statistiquement significative ($p < 0.05$).

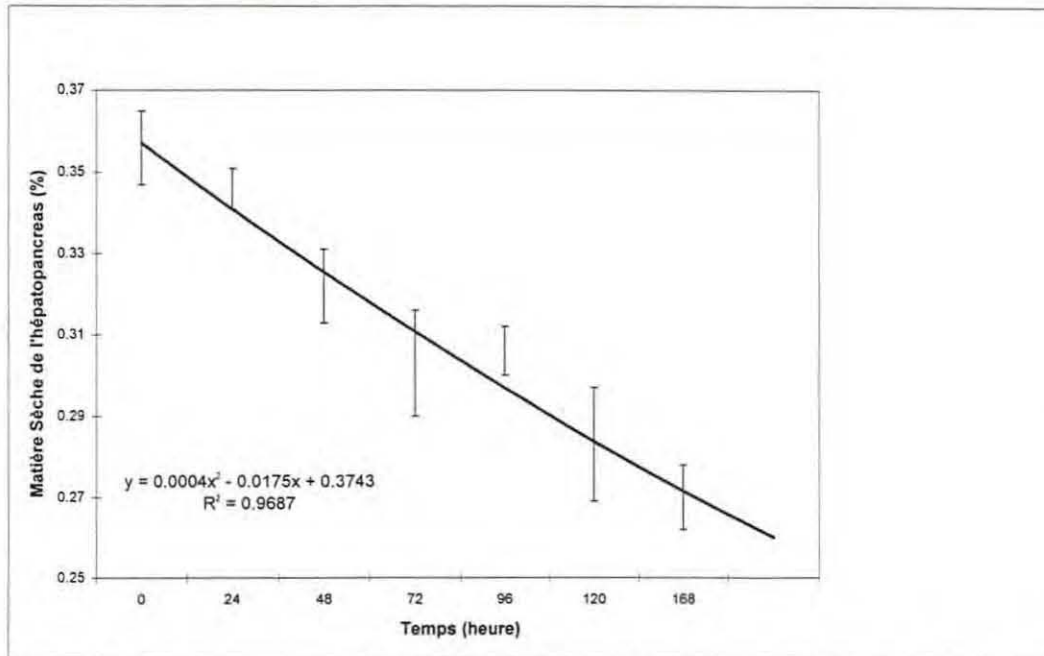


Figure 6 : Evolution des réserves de l'hépatopancréas (% de matière sèche) en fonction du temps de jeûne.

c) Reprise des réserves de l'hépatopancréas après alimentation chez les animaux maintenus à jeun durant une semaine.

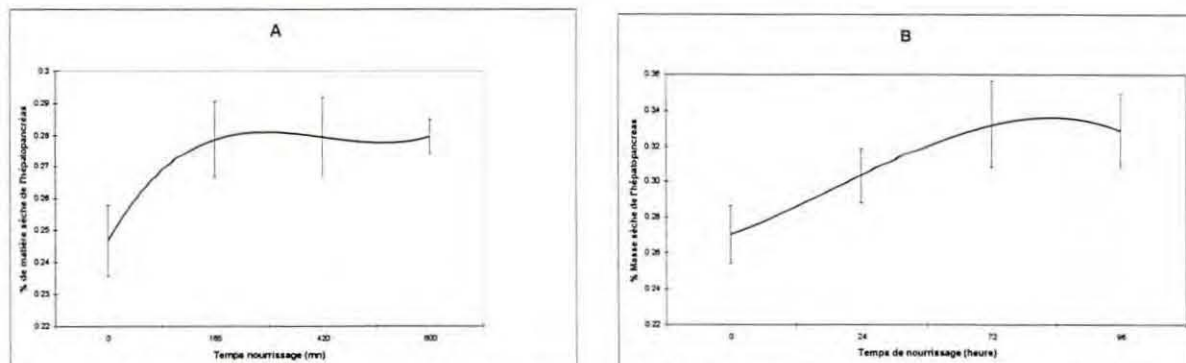


Figure 7 : Reprise des réserves (% de matière sèche de l'hépatopancréas) après nourrissage d'animaux maintenus à jeûn une semaine. Courbe A évolution des réserves les premières heures après nourrissage et courbe B évolution des réserves sur plusieurs jours.

La mesure de la masse sèche de l'hépatopancréas permet de montrer la formation des réserves de l'hépatopancréas après la prise de nourriture chez les animaux maintenus à jeûn durant une semaine (fig 7A). Cette mise en réserve dans l'hépatopancréas est donc très rapide dans les premières heures et se poursuit par la suite pour atteindre un plateau vers 72 heures (fig. 7B).

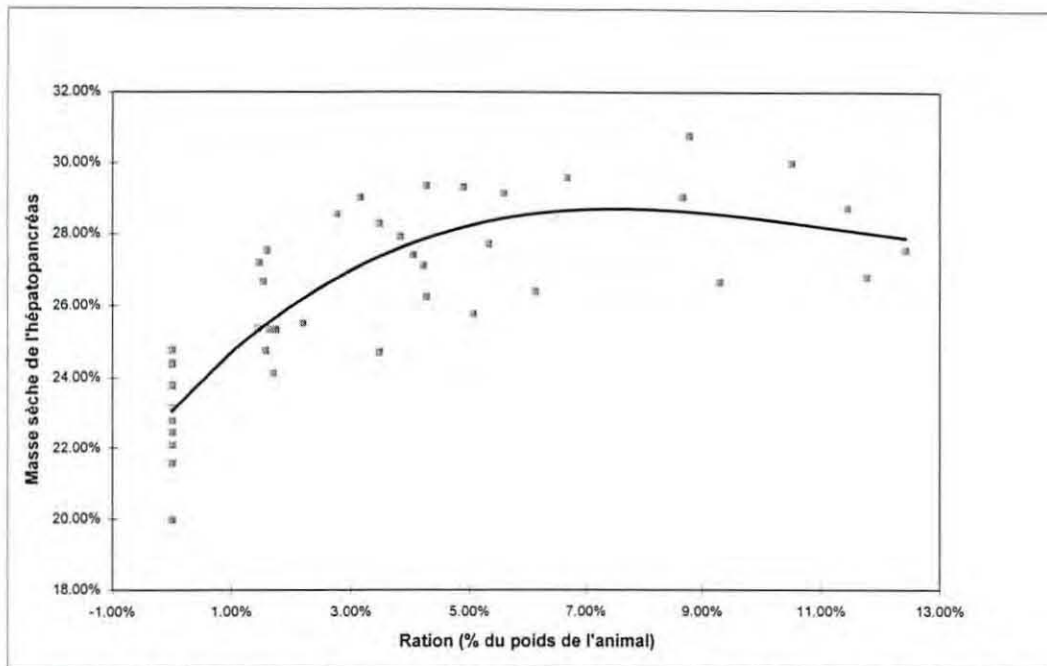


Figure 8 : Evolution des réserves de l'hépatopancréas (% de matière sèche) chez des animaux à jeûn 24 h suivant leur nourrissage avec différentes rations.

Comme le montre la figure n° 8, la mise en réserves dans l'hépatopancréas est apparente chez des animaux ayant consommé 1.5% de leur poids frais en granulé.

La proportion de matière sèche de l'hépatopancréas est fonction de l'apport de réserves, provenant de l'alimentation, et de la mobilisation de ces réserves pour répondre à la demande énergétique de l'animal. Les variations de masse sèche relative de l'hépatopancréas sont rapides et perceptibles pour des apports ou l'utilisation de faibles quantités de réserves. Ces résultats préliminaires confirment l'intérêt d'utiliser l'hépatopancréas comme un indice de l'état nutritionnel des crevettes.

Sur ce sujet nos objectifs à terme sont :

- ✓ au niveau de la production, de fournir une méthode simple et pratique aux fermiers qui ont besoin d'évaluer régulièrement l'état nutritionnel de leur cheptel. Un hépatopancréas plein de ses réserves traduit la disponibilité dans le bassin des constituants associés avec la croissance et un bon équilibre entre la disponibilité de l'aliment (naturel et granulé), le taux d'alimentation et le taux du catabolisme. Une réduction significative des réserves de l'hépatopancréas reflèterait une période de sous-alimentation, dont la cause peut-être environnemental et/ou physiologique, et qui conduirait à un bilan négatif conséquence d'un taux d'utilisation supérieur à celui de reconstitution des réserves. Des expériences en collaboration avec la SASV doivent être entreprises afin de préciser certains aspects préalablement au transfert d'un tel indice à la profession.
- ✓ Au niveau de la recherche nous entrevoyons la possibilité d'utiliser le phénomène de reconstitution des réserves (fig 7A et B et fig. 8) dans l'identification et la quantification sensibles et rapides des sources alimentaires naturelles des crevettes dans les bassins. En collaboration avec le CREMA (JLM Martin, R. Galois, P. Richard), nos études sur l'hépatopancréas couplées avec les méthodes des isotopes stables et le suivi du ration triglycéride/stérole dans cet organe devraient représenter un outil puissant dans notre projet d'étudier la capacité trophique des bassins d'élevage.

Coopérations nationales et internationales

Participation au programme STD Aquaculture Environnement avec le CREMA, la SASV, l'USTL, le BADC (Indonésie) et l'ION (Vietnam). La 3ème année de ce programme étalé sur trois ans a débuté en septembre 1996 et s'est achevée en août 1997.

L'essentiel de cette année de travail a été consacré au traitement des données acquises et à leur synthèse par la rédaction du rapport final.

ECOPHYSIOLOGIE

Projet E11003 : Crevette/Physiologie de l'Adaptation

Rappel des objectifs

L'outil Capacité Osmorégulatrice (CO), mis au point ces dernières années, est devenu un moyen performant et largement exploité en routine dans nos programmes de recherche en environnement, en pathologie-immunologie, en génétique et en physiologie de la nutrition.

La mise en oeuvre de cet outil nous a permis de répondre à un certain nombre de questions posées dans le cadre de nos objectifs de recherches fixés pour cette année. Ces derniers sont de deux ordres :

- ✓ Il s'agissait premièrement d'utiliser la CO comme outil de diagnostic de l'état physiologique des animaux dans nos expérimentations *in vitro* en vue de :
 - la détermination des valeurs limites des principaux paramètres physico-chimiques de l'eau hors desquelles les crevettes ne peuvent plus assurer leur homéostasie. Les paramètres étudiés sont l'oxygène, l'ammoniaque, le pH et la Température. Afin de montrer d'éventuels effets synergiques ou antagonistes de ces différents paramètres nous avons étudié leurs actions combinées.
 - De rechercher une éventuelle relation entre l'état physiologique des animaux et leur état immunitaire.
- ✓ Il s'agissait deuxièmement d'éprouver et d'adapter cet outil à des études *in situ* (dans les bassins d'élevages). Dans ce cadre, deux actions ont été menées, en Nouvelle Calédonie avec nos collègues de la SASV. Ainsi, par la mesure de la CO, des animaux confinés dans des cages ou en liberté dans les bassins, nous avons montré que les crevettes exposées à un milieu défavorable, en contact avec un sédiment réduit, subissaient un stress significatif. Au vu de nos résultats obtenus *in situ*, nous envisageons à terme d'appliquer l'outil CO dans le suivi de l'état physiologique de l'ensemble des crevettes du bassin. Une telle application apporterait aux producteurs calédoniens un outil supplémentaire d'aide à la décision dans la conduite de leurs élevages.

Travaux réalisés et principaux résultats

Etude in vitro du pH sur la PO de l'hémolymphe (P. Stylirostris, souche SPR 43)

L'expérience a été réalisée en deux blocs successifs sur six lots de 8 crevettes qui ont été soumises pendant 24 heures à 5 niveaux de pH, compris entre 6 et 8, un lot témoin contenait de l'eau de mer non traitée (pH = 8.2). Le pH est ajusté au niveau requis à l'aide d'un mélange de NaH₂PO₄ et Na₂HPO₄ (tampon phosphate en 10 mMolaire en concentration finale). Le pH est contrôlé toutes les heures et éventuellement corrigé à l'aide de NaOH (1N) ou HCl (0.1N). La concentration d'ammoniaque de l'eau des bacs expérimentaux est mesurée toutes les 6 heures. Au bout de 24 heures, la pression osmotique de chaque animal au stade C a été mesurée comme décrit précédemment.

L'analyse de variance à deux facteurs des résultats obtenus montre un *effet significatif du pH sur la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes*.

Cette expérience vient corroborer les résultats obtenus *in situ* présentés ci-après et confirment que les pH faibles provoquent une augmentation de la pression osmotique de l'hémolymphe. Cette augmentation est corrélée à celle du pH entre 6.0 et 7.0, ce qui correspond précisément, comme nous le verrons après, aux observations de terrain.

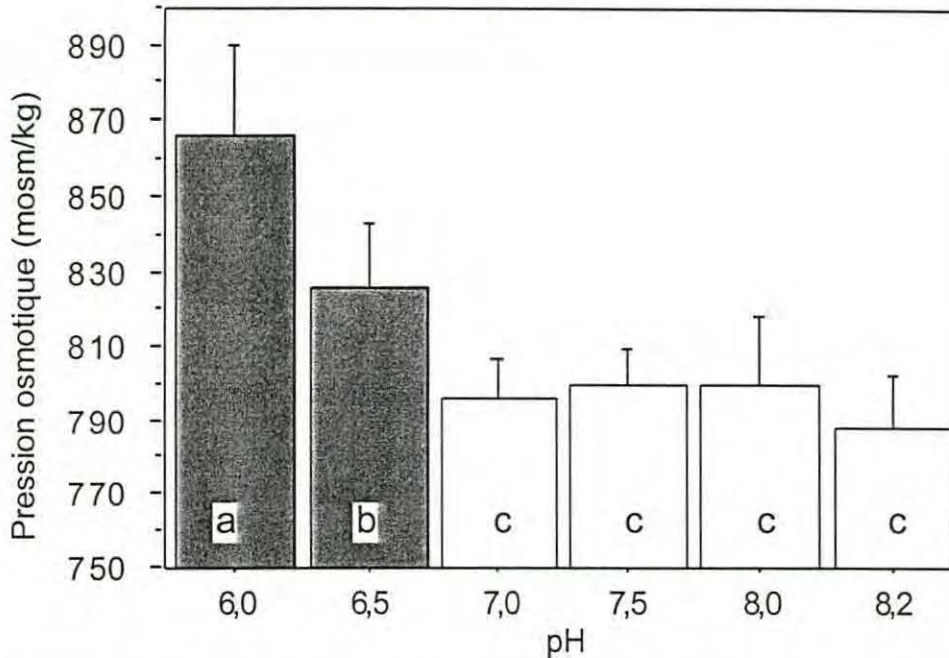


Figure 1 - Influence du pH sur la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes. Les animaux des groupes a et b placés dans une eau de pH 6,0 ou pH 6,5 ont une pression osmotique hémolympatique significativement plus élevée que ceux du groupe c.

Etude in vitro : Influence de la variation de température sur la pression osmotique de l'hémolymphe de crevettes P. Stylirostris

Cette étude *in vitro* de l'effet de la température et de sa variation sur la pression osmotique de l'hémolymphe fait suite aux observations effectuées en Nouvelle Calédonie, à savoir que les épisodes de mortalités dues au syndrome 93 apparaissent au cours des périodes de variations importantes de température en saison de transition de Mai-Juin à Septembre.

Différents lots de crevettes ont été soumis à une gamme croissante de température 17, 20, 23 et 26°C pendant 48 heures. Des triplicats ont été réalisés au cours de cette étude.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5. L'analyse statistique consiste en une étude de la corrélation entre la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes et la température de l'eau d'élevage. Il existe une corrélation étroite entre la température d'élevage et la PO de l'hémolymphe montré par le modèle polynomiale de degré 3 ($p=0,0016$) présenté dans la figure 2.

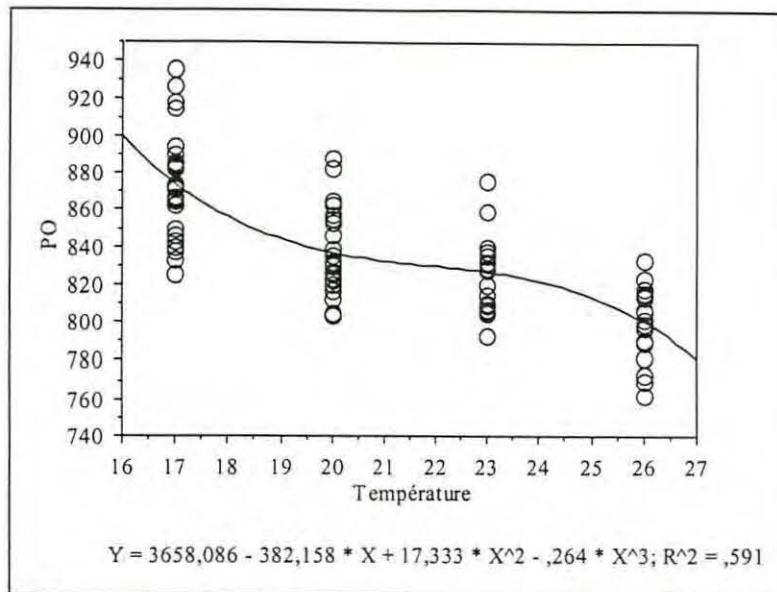


Figure 2 : Relation entre température d'élevage et pression osmotique de l'hémolymphe des animaux

Dans une autre série d'étude nous avons soumis des animaux à des variations nyctémérales de températures. Des animaux ont été soumis sur 24 h à une variation de températures comprises entre 26°C et 17°C d'une part et 26°C et 22.5°C d'autre part. Lors de ces expériences, des triplicats ont été réalisés. Les résultats montrent un effet significatif des variations de température sur la pression osmotique de l'hémolymphe des animaux. Cependant, il est important de noter que notre modèle expérimental ne reproduit pas les conditions observées dans les bassins; nous exposons en effet les animaux à des chutes importantes (9°C) et très rapide de température (2 à 3 heures). Dans nos prochaines expérimentions, nous chercherons à nous rapprocher des conditions *in situ* de Nouvelle Calédonie.

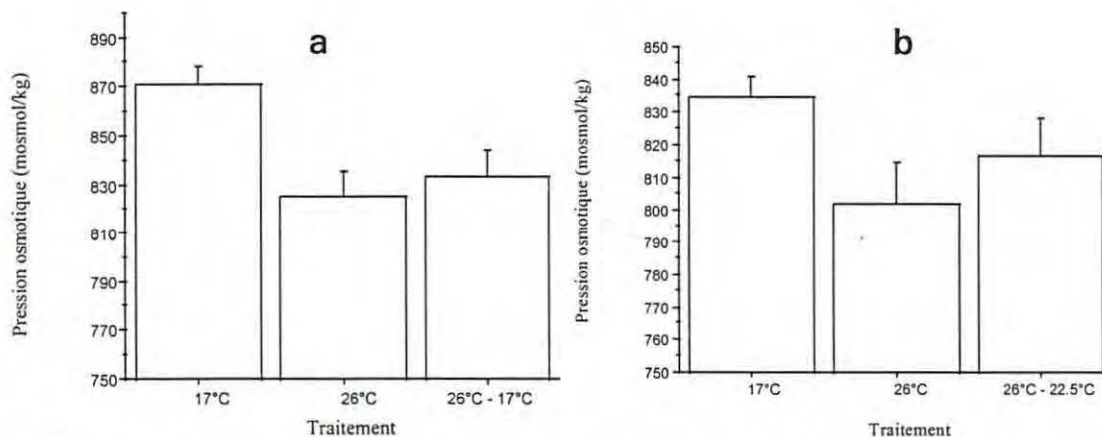


Figure3 a et b : Etude de la pression osmotique de l'hémolymphe de crevettes soumises pendant 48 heures à différentes températures d'élevage : 17°C, 26°C et des variations nyctémérales entre 26°C et 17°C (a) et 26°C et 22.5°C (b).

L'ensemble de ces résultats préliminaires montre clairement une dégradation de l'état physiologique des animaux exposés à des températures inférieures à 23°C; ceux-ci affaiblis, seraient plus sensibles aux agents pathogènes responsables du syndrome 93. Afin de montrer cette possible filiation des phénomènes (chute de température - dégradation de l'état physiologique - baisse de la santé des animaux et infection), en collaboration avec le laboratoire de pathologie-immunologie, nous recherchons une

éventuelle relation entre la dégradation de l'état physiologique des animaux conséquence d'une chute de la température d'élevage et celle de leur état immunitaire.

Dans une prochaine étape nous étudierons également la capacité de récupération des animaux exposés sur plusieurs jours à des températures inférieures à 23°C.

Etude in situ : Etude de l'influence des sédiments du bassin d'élevage sur la physiologie de Penaeus stylirostris (Rapport Cochard et al., 1997)

Les travaux menés en 1995, sur la variabilité spatiale de la toxicité des boues de fond de bassin d'élevage de *P. stylirostris* nous ont permis d'établir des corrélations significatives entre certains paramètres physico-chimiques caractérisant les boues et l'augmentation de la pression osmotique de l'hémolymphes chez les animaux qui y sont exposés.

Dans une première série d'expérimentale, des lots de 25 à 30 crevettes de 13,2g, pêchées à l'épervier, ont été placés dans des cages de grillage métallique déposées en 12 points du bassin d'élevage. Les cages ont été relevées au bout de 24 heures et la pression osmotique, des crevettes au stade d'inter-mue C, comparée à celles d'individus libres pêchés le même jour. L'expérience ayant été renouvelée 4 fois, le plan expérimental était constitué de 4 blocs de 12 cages.

Les caractéristiques du sédiment ont été étudiées par des mesures *in situ* (pH de l'eau interstitielle, potentiel d'oxydoréduction) ou en laboratoire sur les échantillons (matière sèche, taux de matière organique, teneur en azote ammoniacal)..

Cette étude a permis de montrer notamment une corrélation linéaire hautement significative entre le pH des boues et la capacité osmorégulatrice des crevettes.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude *in vitro* réalisée à Tahiti au Centre Océanologique du Pacifique.

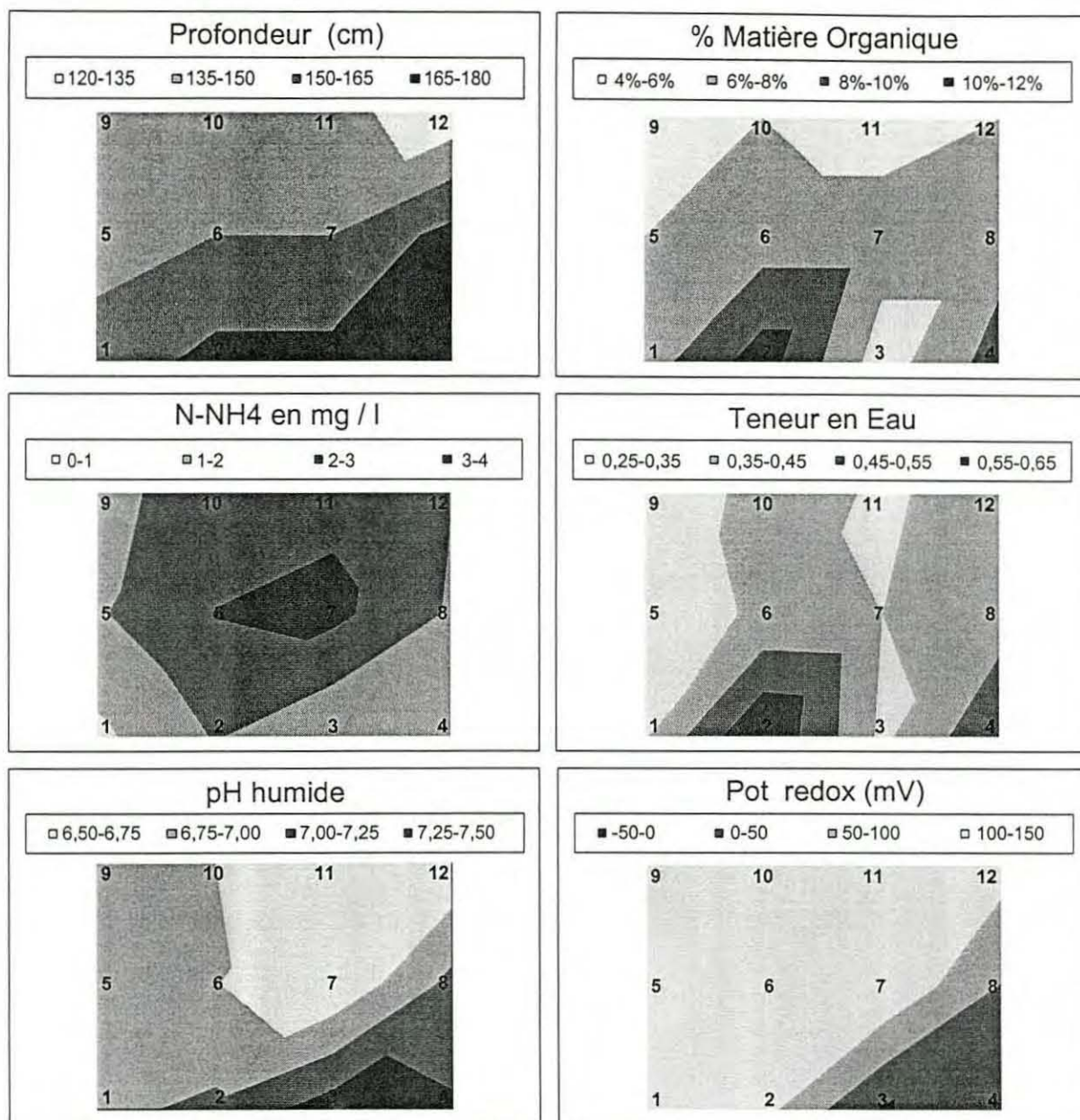


Figure 4 - Représentation graphique schématique des caractéristiques physiques et chimiques du fond du bassin N°8.

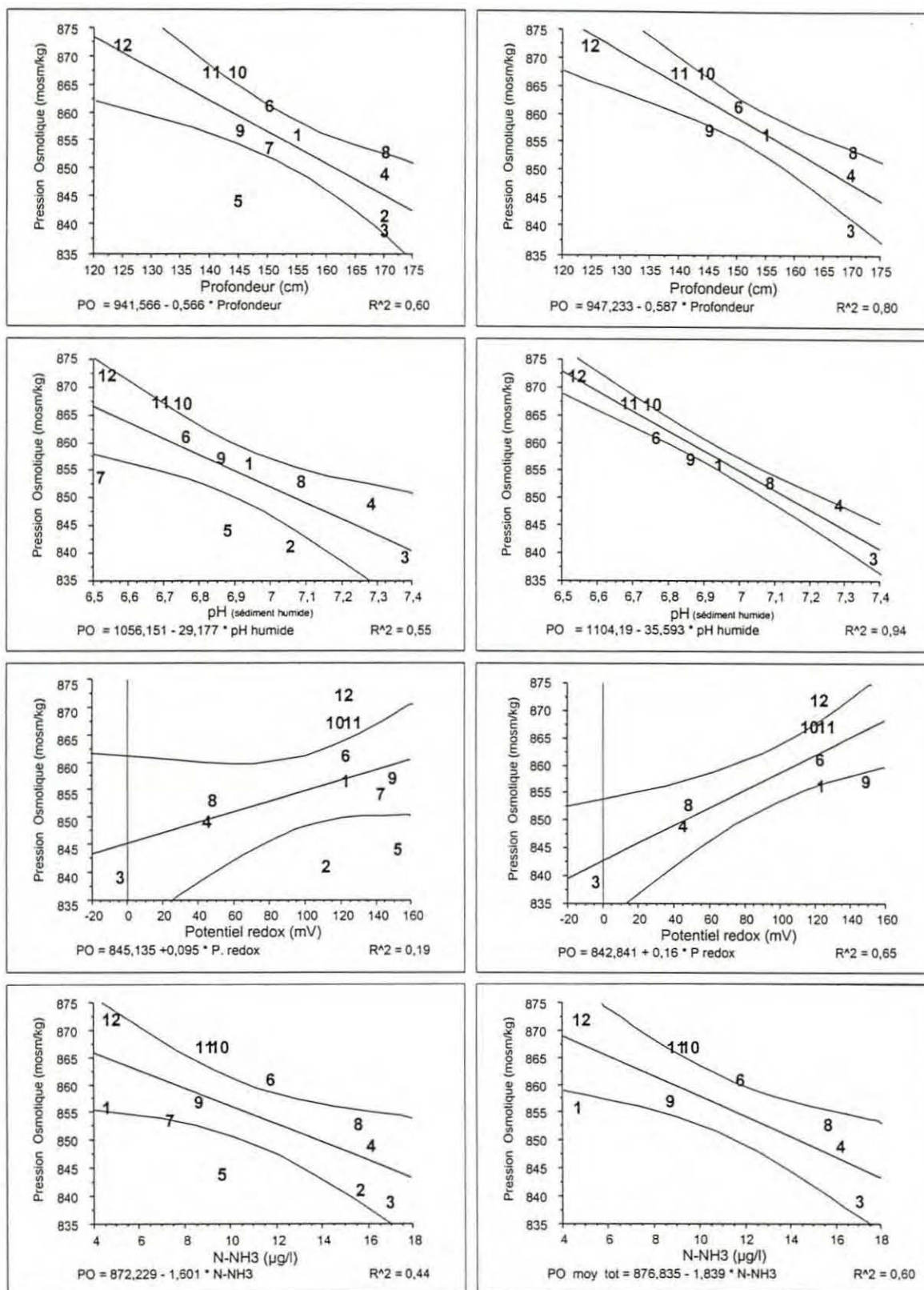


Figure 5 - Graphes des corrélations significatives entre la pression osmotique des crevettes et certains paramètres physiques et chimiques. Dans les graphes de droite, les points 2, 5 et 7 ont été exclus.

Etude in Situ : variation spatiale de la pression osmotique des crevettes en liberté dans un bassin d'élevage (rapport de mission D. Soyez, 1997).

Au cours de l'expérience décrite ici nous avons étudié la variation spatiale de la Pression Osmotique (PO) des crevettes en liberté dans un bassin. Par cette étude, nous souhaitons savoir si la moyenne des PO de l'hémolymphe des crevettes d'un échantillonnage adéquat peut être représentative d'un état physiologique global de la population des crevettes du bassin. Pour cela, nous avons prélevé des animaux sur quatre stations choisies pour leurs caractéristiques hydrodynamiques différentes (proche de l'entrée et de la sortie d'eau, au centre et en périphérie) ; la station n°4 au centre du bassin est une zone d'accumulation, caractérisée par un sédiment réduit de couleur noire (schéma n°1).

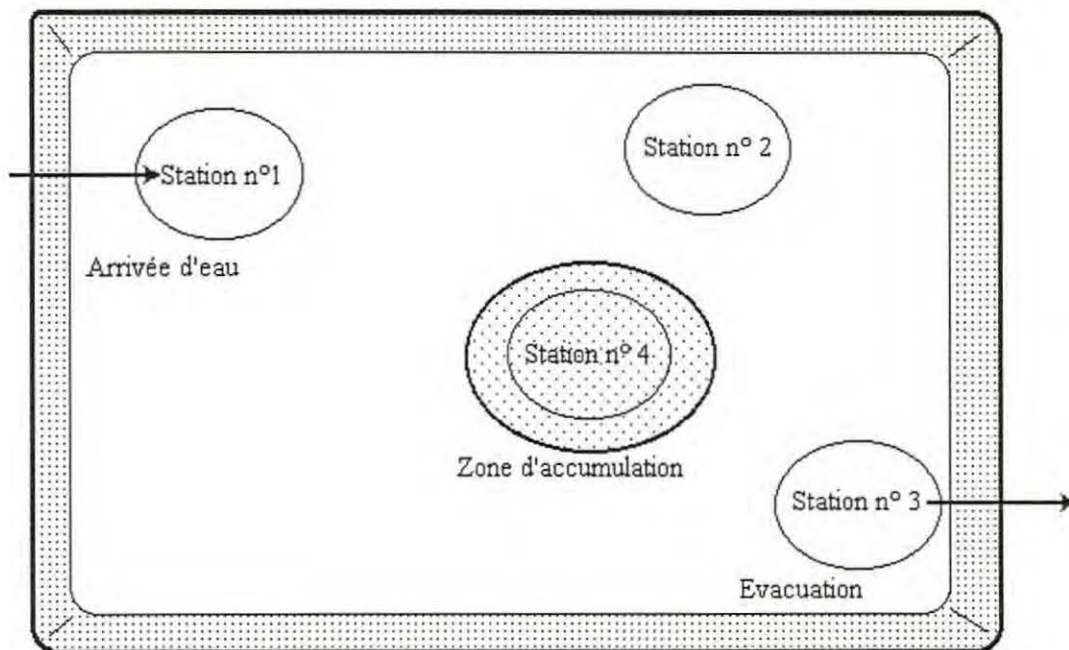


Schéma n° 1 : Représentation du bassin d'élevage et des quatre stations de prélèvement. La station n° 1 se trouve à l'arrivée d'eau et la station n° 2 sur un côté du bassin. Ces deux zones présentent les fonds les plus propres. La station n° 3 placée à l'évacuation du bassin, est réduite mais reçoit une bonne circulation d'eau. La station n° 4 se place sur une épaisse accumulation de déchets que l'on retrouve dans presque tous les élevages. Cette accumulation est induite par l'hydrodynamisme du bassin.

Les crevettes, à jeun depuis la veille, sont pêchées dans le bassin au moyen d'un épervier et immédiatement transférées vers le laboratoire. Seuls les animaux au stade C de l'intermue sont utilisés pour les dosages.

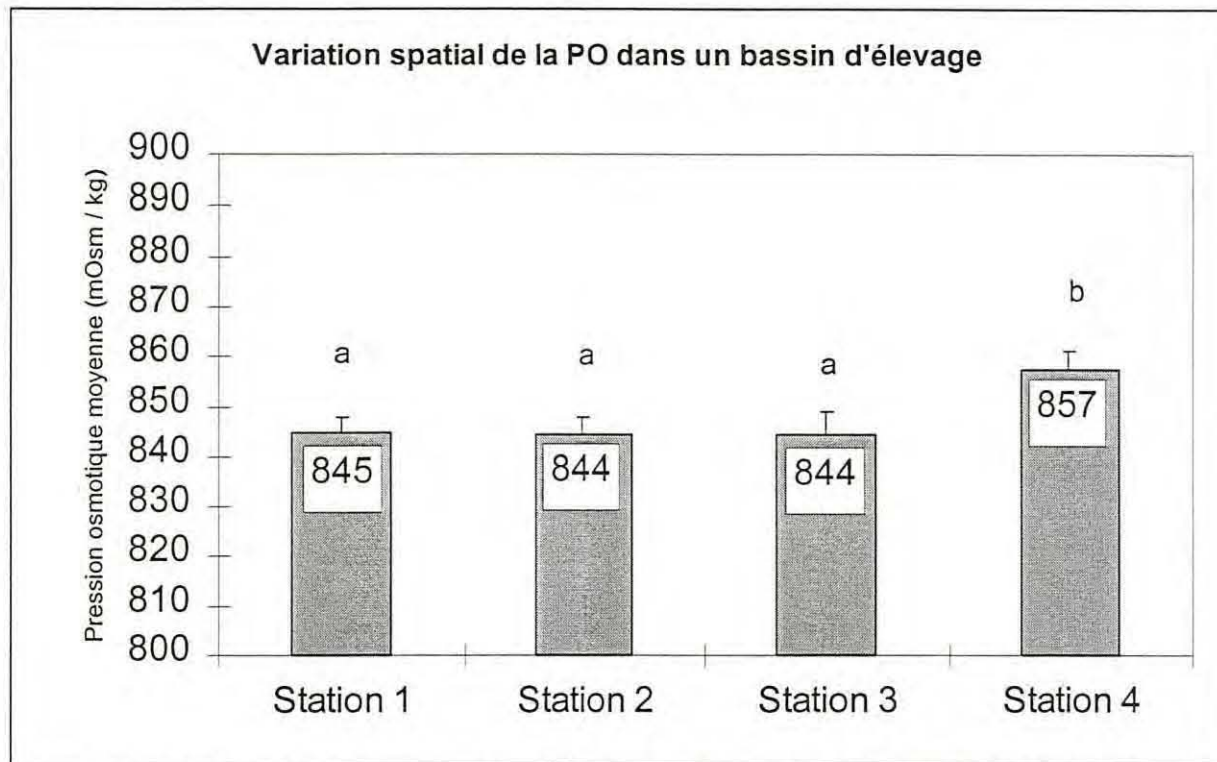


Figure n°6 : Expression des moyennes pour la pression osmotique en fonction des stations de prélèvement. Les différentes lettres indiquent l'appartenance des moyennes à des groupes significativement différents ($P < 5\%$). Les barres verticales représentent l'erreur \pm standard.

L'analyse de variance montre que la PO moyenne des animaux prélevés sur la station quatre est significativement plus élevée que celle des animaux prélevés sur les 3 autres stations.

Il apparaît donc que les conditions particulières délétères qui règnent sur la zone 4, avec notamment un sédiment très réduit, induisent un stress chez les animaux occupant cette zone.

Cette expérience a montré que les PO des crevettes sont homogènes dans un bassin d'élevage, même s'ils sont plus élevés que la normale déterminée en laboratoire ($\sim +30$ mOsm/kg), excepté dans la zone d'accumulation des déchets. Il conviendra donc dans l'avenir, si l'on souhaite évaluer l'état physiologique de la population d'un bassin et de suivre son évolution au cours de l'élevage de ne pas échantillonner à l'intérieur des zones d'accumulation de déchets; les animaux stationnant sur ces zones n'étant pas représentatifs de l'état physiologique de l'ensemble du cheptel.

Dans une prochaine étape, nous envisageons de renouveler cette étude afin de valider ce premier résultat. Une fois cela réalisé nous ferons, en Nouvelle Calédonie, un suivi, sur la durée d'un cycle d'élevage, de la PO des animaux de quelques bassins en production. Ce suivi nous permettra d'évaluer l'outil PO comme instrument de diagnostic dans la révélation précoce des déséquilibres physiologiques des animaux en élevage.

ALIMENTS PEU POLLUANTS

Projet E12003 : Crevettes/Nutrition et alimentation

Rappel des objectifs

Les objectifs sont principalement d'étudier la crevette dans son environnement expérimental et de comprendre les mécanismes d'utilisation des nutriments (protéines, glucides essentiellement). Ces mécanismes sont nécessaires pour mieux comprendre les équilibres des apports quotidiens à réaliser en vue d'une couverture optimale des besoins (d'où un gain au passage sur le coût de l'aliment), conduisant à des indices de croissance meilleurs (plus près de 1:1 que de 2:1 comme c'est le cas actuellement) et l'importance des rejets de substances dissoutes ou particulières (protection du milieu). Ces travaux impliquent des actions au niveau recherche, au niveau des fermes et au niveau des fabricants d'aliments en favorisant au possible les interactions.

La crevette pénéide a un régime alimentaire dans la nature qui est de type carnivore. Les protéines sont apportées par des vers, mollusques, crustacés avec toutefois une petite part de débris végétaux et les lipides sont ceux contenus dans ces mêmes proies riches en acides gras à longue chaîne. Les hydrates de carbone représentent une faible proportion du régime et sont représentés par le glycogène contenu dans les organismes marins.

Comment la crevette utilise-t-elle les protéines du régime alimentaire? utilise-t-elle les protéines à des fins énergétiques? Comme chez le poisson, on note une forte propension à utiliser les protéines comme source d'énergie alors que des lipides et des glucides sont disponibles. La crevette utilise-t-elle les glucides? d'après de récents travaux (Cousin, 1995) la crevette *P. stylirostris* digérerait bien les amidons de céréales et celui de blé en particulier qu'il soit natif ou pré-gélatinisé. Ce résultat apporte une solution à la formulation de régime dense en énergie digestible et contenant la dose minimum de protéines pour la croissance. Par ailleurs, quelle est la tolérance des crevettes aux lipides? c'est une caractéristique des crevettes par rapport aux poissons que de ne pas tolérer une forte proportion de lipides dans le régime; au-delà de 10% des ralentissements de croissance ont pu être observés. La croissance des juvéniles est curvilinéaire dans une période de 6 mois à 27°C et l'efficacité de rétention des protéines synthétisées (Mente et al., 1997) est maximisée chez les animaux à croissance rapide (*P. vannamei*) au détriment du turnover qui est bas (environ 5% /jour dans le muscle de la crevette. Ceci reflète des pertes réduites en acides aminés par oxydation (voir chap. aae).

Travaux réalisés et principaux résultats

Il ne faut certainement pas minimiser le rôle de l'aliment dit moins polluant qui, dans des conditions semi-intensives d'élevage, peut paraître insignifiant au regard de la productivité naturelle d'une part et de la façon de distribuer l'aliment d'autre part. La productivité naturelle, n'a de rôle que dans la phase de croissance post-larve à 2-3g. Ce rôle est certes utile pour amener les animaux à une taille suffisante lorsqu'ils devront tirer partie de la seule valeur nutritive de l'aliment qui leur sera fourni jusqu'à la taille commerciale. Sur la façon de distribuer l'aliment en élevage semi-intensif, on a dit qu'un gain sera obtenu par une meilleure gestion de l'aliment standard. Effectivement, au Pérou par exemple, une amélioration de l'indice de consommation à 1.5 avec fonds de bassins propres a pu être obtenu grâce à (i) un aliment qui était de très bonne formulation du type 40P / 8L, (ii) en réalisant un nourrissage au quotidien impliquant la permanence d'un ouvrier sur le bassin... Un aliment bien formulé et moins polluant devra nécessairement pouvoir être distribué en deux fois par jour si l'on veut une certaine rentabilité de la ferme.

On ne peut pas minimiser la qualité d'un aliment sur sa contribution aux performances des animaux; l'alimentation ne prend pas le dessus sur la valeur intrinsèque du granulé. S'il fallait faire la part contributive des performances attribuables au couple nutrition/alimentation, elle reste en faveur des qualités intrinsèques du granulé; s'il fallait faire la part nutrition/productivité naturelle, par les méthodes d'estimation à l'aide d'isotopes stables du carbone par exemple, le pourcentage contributif à la constitution de la chair de crevettes varie de 66 à 70% dans une situation où la productivité naturelle (phyto + benthos) est importante lors d'un élevage de *P. vannamei*. En tenant compte de la productivité naturelle, la notion d'aliment de démarrage et

d'aliment de croissance pourrait donc être révisée; il faudrait plutôt considérer à l'avenir l'aliment d'appoint dans la phase 0-2g et un aliment complet, formulé le plus adéquatement possible pour la phase 3-20g afin que la vitesse de croissance (1 à 2g/semaine) soit respectée et donc que le temps de séjour en bassins soit réduit. En corollaire, l'indice de consommation (IC) doit être inférieur à 1.5 et les risques de dégradation du fond par l'accumulation des restes de nourriture ramenés au minimum.

Une telle approche doit associer des études en laboratoire, des vérifications sur le terrain et une bonne coordination entre les fabricants d'aliments (optimisation, révision des formules, contrôle de la qualité du granulé,...) et les éleveurs car à qualité égale, c'est la quantité qui risque d'entraîner une pollution du bassin selon l'assertion « la crevette ne pollue pas, l'aliment pollue ». Les connaissances, sur les besoins nutritionnels (DP/DE et acides aminés essentiels) qui permettent une formulation mieux adaptée, et une nouvelle approche technologique sur les procédés de fabrication (extrudeuse bi-vis), donneront place à un aliment bien équilibré, de texture adéquate, d'une bonne tenue à l'eau, ingéré rapidement, et produisant un minimum de déchets. Ces besoins nutritionnels sont étudiés en salle zootechnie soit dans des bacs de 225 litres pour des essais sur 50 jours soit dans des bacs de 72 litres pour des essais sur 30 jours.

Besoins nutritionnels

Protéines/Energie

L'objectif qu'on veut atteindre en travaillant sur DP/DE est d'abord de fournir une provision d'énergie digestible d'origine non-protéique pour réduire l'excrétion de produits terminaux du métabolisme azoté, et de répondre à une demande du marché de l'aliment afin de réduire les coûts par une réduction du taux protéique sans s'exposer à une baisse des performances de croissance. A partir de la thèse de M. Cousin (1995), des études sont encore à mener pour préciser le rapport DP/DE notamment sur les régimes riches en énergie et pauvres en protéines. *P. stylirostris* est une espèce dont le besoin en protéines abordé à l'aide d'aliments pratiques (à base de farine de poissons) se situe vers 35-40% CP lors d'essais avec des régimes isoénergétiques. La recherche fine de l'optimum protéique doit se doubler d'une recherche de l'optimum énergétique, mais l'énergie digestible à son niveau le plus élevé dans l'aliment ne correspond pas à l'optimum de croissance.

La digestibilité des sources protéiques utilisées conduit à une estimation des matières solides mises en suspension au cours de l'élevage ; le niveau d'excrétion azoté pour un taux donné de protéines alimentaires ainsi que les analyses de carcasses conduisent à un bilan azoté. Il apparaît que l'utilisation des protéines par la crevette est faible, de l'ordre de 40% ce qui explique les croissances plus élevées avec les taux protéiques élevés (qui reflète un besoin élevé en acides aminés essentiels).

Energie

L'énergie est apportée aux crevettes par les glucides et les lipides. Si l'on s'adresse aux lipides, dès que l'on dépasse 10% de lipides même sous forme d'huile de poisson, la croissance se ralentit. L'utilisation des lipides par les crevettes est limitée par rapport à ce qu'on observe chez la truite par exemple. Mais quelle utilisation métabolique en est faite par la crevette? Il faut envisager les glucides (amidon, et en particulier le blé) qui peuvent contribuer efficacement à l'apport énergétique journalier., il est cependant difficile de dépasser 40% du régime peut-être pour des questions d'appétance en l'absence d'attractant spécifique. D'après les études menées sur la digestibilité des nutriments, les glucides apparaissent bien digérés (contrairement à ce que l'on observe chez les poissons). La crevette tolère des concentrations en glucose dans l'hémolymphe assez élevées (1.5g/l) et comme les poissons elle régule mal sa glycémie. Des études sont actuellement en cours pour comprendre l'utilisation métabolique des glucides par la crevette et mesurer les activités glucokinase et hexokinase au niveau de l'hépatopancréas, déceler un rejet éventuel de glucose par voie urinaire et/ou branchiale? (collaboration Ecos). Sur l'utilisation des glucides par la crevette en fonction des teneurs en amidon des régimes une étude avait été envisagée en 1996-97 et seules quelques actions ponctuelles ont permis d'effleurer le sujet qui par ailleurs présente un réel intérêt (collaboration sous forme d'un projet ECOS 98,AVW/UNAM/COP), Amidons natifs ou prégélatinisés présentent un CUD amidon supérieur à 90% (Cousin et al., 1996). D'où l'intérêt à utiliser ce résultat pour réaliser l'apport énergétique optimal et

voir à épargner les protéines par les amidons.. On ne peut que constater cependant que comme chez les poissons, une partie des protéines va vers la production de chaleur. Et les protéines semblent être mieux utilisées par les crevettes pour la fourniture d'énergie que les autres nutriments: ainsi des régimes à 60-70% de protéines permettent des taux de croissance élevés (supérieurs à 4g/mois pour des individus de 10g). Il vaut donc mieux cerner les besoins en acides aminés essentiels.

Besoins en acides aminés (aae)

Une connaissance des acides aminés indispensables pour formuler sans facteur limitant est nécessaire et dans une perspective d'une technologie différente de production des aliments crevettes, plus drastique, elle est prioritaire. Une des méthodes à développer consiste à déterminer de façon quantitative le besoin en acides aminés essentiels. La méthode développée à Guelph chez la *truite*, est adaptable à la crevette par le modèle développé sur la cinétique de production du CO₂ (Amouroux et al.,1994). Ce dispositif tout à fait original permettra d'identifier les acides aminés indispensables chez *P. stylirostris* en trois groupes par priorité, les basiques, puis les branchés et les aromatiques. Un projet a été élaboré en collaboration avec le Département des Sciences de la Nutrition de l'Université de Guelph, le laboratoire de Banyuls et le COP. Il a pour objet de déterminer de façon quantitative le besoin en acides aminés essentiels chez *P.stylirostris*. La connaissance de ce besoin est indispensable à une réduction des rejets azotés (par une baisse du taux de protéines) qu'à des fins d'optimisation des formules industrielles au moindre coût. L'approche technique reste délicate et s'appuie sur la modélisation des transferts crevette-milieu dans un microcosme (Aquaculture, 1997,149(1-2):71-86) et de ce fait, la méthodologie peut être adaptée au problème de la détermination quantitative en acides aminés. L'analyse du compartiment CO₂ (CO₂ marqué si la nourriture contient un acide aminé C14) donne une valeur indicative du besoin.

Recherche d'une méthodologie pour la quantification du besoin en acides aminés essentiels

Pourquoi les acides aminés ne sont ils pas apportés en supplémentation dans l'aliment crevettes? Les juvéniles et adultes sont incapables d'utiliser les formes cristallines d'acides aminés (Cowey et Forster,1971; Deshimaru et Kuroki,1974,1975). Plus récemment les besoins en acides aminés chez la crevette *P.vannamei* ont été pris en compte (Fox et al.,1992). Ils explorent le besoin dans une fourchette de 3 à 7% de lysine (en % des protéines) et c'est la forme lysine attachée par liaison covalente avec le gluten de froment qui donne les meilleurs résultats. Le besoin est de 4.6% (en % de la protéine) avec un régime à 45% CP. Chez *P.monodon*, une supplémentation en arginine est étudiée (Chen et Roelants,1992). Seule la forme encapsulée d'arginine donne un résultat, et le besoin serait à 2.7 à 3.0% de l'aliment. Cela confirme l'importance de cet acide aminé basique dans la croissance. Sur une autre espèce, *P.japonicus*, l'incorporation d'arginine est de 90% lorsqu'elle provient d'une source protéique et de 0.6% seulement lorsqu'elle est apportée sous forme cristallisée (Deshimaru,1982). Pour la méthionine, le besoin est abordé à l'aide de régimes purifiés et grâce à l'encapsulation (CMC) d'acides aminés à pH7. Ce besoin est de 0.9% du régime (2.4% de la protéine) et il est légèrement inférieur à la valeur trouvée dans le muscle de crevettes (Millamena et al.,1996). Chez la même espèce (*P.monodon*) la valine étudiée selon le protocole dose-réponse (Mercer,1992) a un optimum à 1.4% de l'aliment (3.4% de la protéine) et à nouveau cette valeur est inférieure à celle du muscle de crevettes. La détermination des acides aminés essentiels a été réalisée à partir d'injection d'acétate ¹⁴C et chromatographie (Kanazawa et Teshima,1981). Les acides essentiels étaient révélés par leur absence de marquage par rapport aux autres . Et le résultat était le suivant: LYS, HIS, ARG, LEU, ILE, MET, TRP, THR, PHE soit les 10 acides aminés essentiels (aae). A partir de là et comme pour les poissons (Rumsey et Ketola,1975), la simulation du profil d'acides aminés des protéines corporelles ou des fractions protéiques du clam a servi de base pour équilibrer les régimes alimentaires et permettre de bonnes croissances (Deshimaru,1981). En conclusion, la crevette *P.orientalis* montre une mauvaise utilisation des acides aminés libres (11%) car ces derniers ne peuvent être absorbés simultanément avec les acides aminés liés aux protéines (Kangsen et al.,1988). Il en résulte de faibles performances de croissance. L'encapsulation est nécessaire, de même que l'ajustement du pH pour favoriser l'ingestion de l'aliment purifié et aider à la digestion. La digestion en effet met en jeu des protéases dont l'activité est optimale à pH basique (Galgani,1984) et l'assimilation des acides aminés serait meilleure également lorsque le pH est à 8 (Lim,1993).

Tous ces éléments pris en compte ont permis d'établir le protocole d'essai pour la mise en place de la méthode directe d'oxydation d'un acide aminé (Fig.1). La crevette présente une faible production de CO₂ marqué lorsque l'apport de phénylalanine (Phe) est limitant et cette production est du même ordre avec Phe0 ou Phe0.8 tandis que des valeurs plus élevées sont attendues lorsqu'on dépassera la valeur du besoin. Seuls les points 0.4 and 0.8 ont été étudiés à ce moment (Fig 4). Dans la première partie de la courbe, la faible quantité de substrat fait que l'enzyme du catabolisme n'est pas activée; par contre, dans la deuxième partie de la courbe, l'afflux de substrat entraîne une dégradation qui se traduit par l'augmentation de la quantité de CO₂ produite par la crevette (décarboxylation).

methode directe d'oxydation

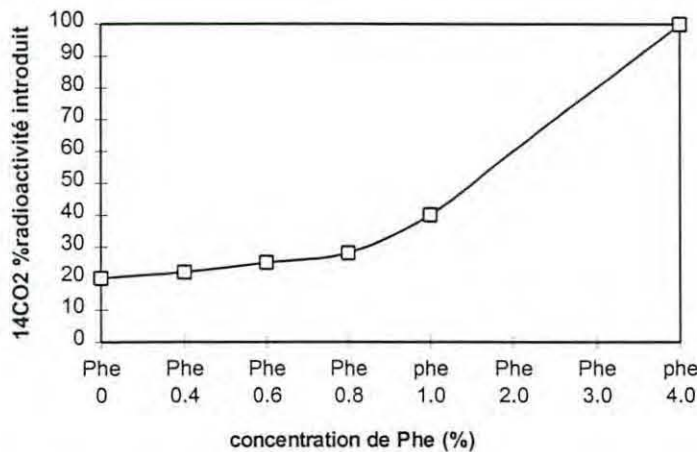


Fig 1 Méthode directe d'oxydation d'un acide aminé, la phénylalanine (courbe prédictive conduisant à l'estimation du besoin).

La méthode indirecte représente la deuxième partie de l'étude qui permettra d'aborder le besoin en lysine, acide aminé pour lequel une valeur de CO₂ minimale donnera une approche du besoin (Fig.2).

methode indirecte d'oxydation d'un aae

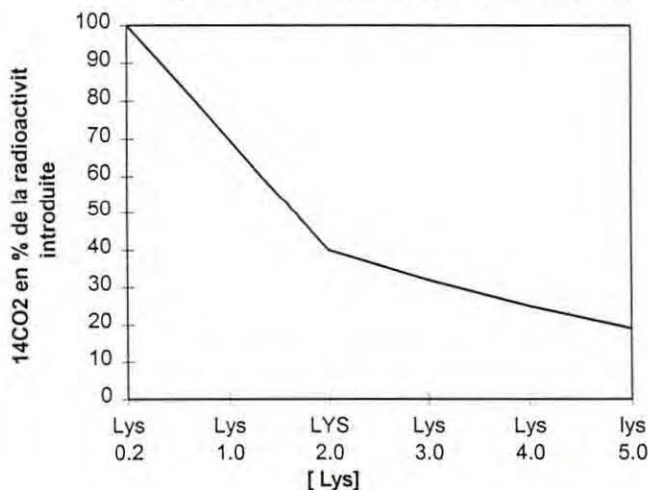


Fig 2. Méthode indirecte d'oxydation d'un acide aminé, la lysine en utilisant la phénylalanine comme marqueur (modèle prédictif, obtenu après la confirmation de la courbe, Fig1).

Ce travail se situe dans le droit fil des actions conduites sur la nutrition des pénéides au cours des 10 dernières années. L'apport de cette action de recherche est novateur et place une contribution significative à l'amélioration des aliments aquacoles pour la Nouvelle Calédonie en particulier. Recherche originale chez les pénéides et qui aurait l'impact précis sur la profession (industriel, provendier). Des industriels comme INVE, PROMA, pourraient trouver une motivation

à une coopération avec l'IFREMER pour la mise au point de ces aliments peu polluants supplémentés et produits en Nouvelle-Calédonie voire en Martinique.

Métabolisme des subadultes

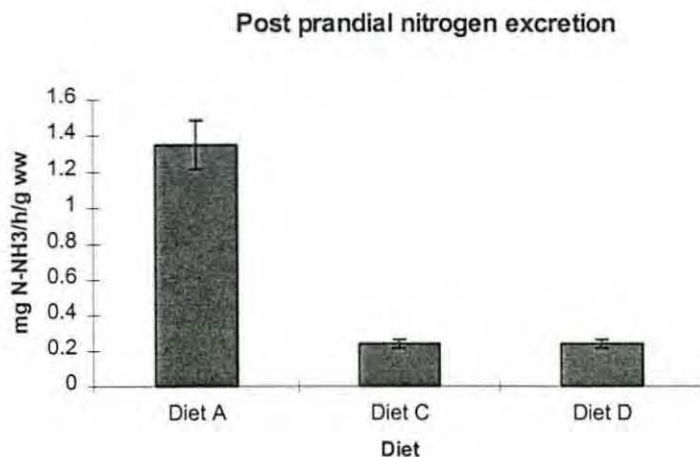
Les études du métabolisme de subadultes ont débuté il y a deux ans environ avec le programme milieu du COP en vue de réduire les effets polluants dus aux aliments dont la composition peut être améliorée. Il s'agit de parvenir à un bilan azoté et à un bilan énergétique des crevettes soumises à une alimentation en conditions expérimentales. Quel est le taux métabolique de 100g de crevettes exprimé en KJ/heure? un calcul prenant en compte la digestibilité, l'excrétion azotée, les analyses de carcasses, le métabolisme à jeun et l'extra-chaaleur aboutit des valeurs de 7.8 KJ/Kg de poids métabolique/jour. Les valeurs obtenues pour améliorer les courbes de rationnement en élevage intensif ou semi-intensif. Un respiromètre a été instrumenté de façon à permettre une lecture en continu des consommations d'oxygène sur un lot de crevettes isolé. Cet appareil a dû subir un certain nombre d'adaptation à partir du système étudié à Guelph. Avec le concours de l'équipe écophysologie, cet appareil couplé à un oxymètre et une chaîne Technicon fournit en continu sur une période de seize heures les mesures d'oxygène et d'ammoniaque. On peut aisément détecter le pic d'extra chaleur et celui d'excrétion azotée post prandiale.

Consommation d'oxygène

En bassins d'élevage intensif de 1000m² des enregistrements en continu ont déjà permis de constater une chute de l'oxygène dans l'eau qui peut représenter 0.5ppm (Sopomer,1987). Cette chute correspond d'une part à l'activité des crevettes au moment du repas, d'autre part à l'activité dynamique spécifique liée aux processus digestifs et à l'anabolisme. En bacs d'expérience ou dans le respiromètre, on mesure cette consommation d'oxygène en évitant en grande partie l'activité des crevettes en raison du confinement, et en tenant compte du coefficient oxycalorique de l'oxygène la courbe de production de chaleur suivant un repas a pu être confirmée après Tcheung (1996). Une augmentation significative de la production de chaleur est enregistrée après un repas. Celle-ci passe de 3 à 5KJ/Kg poids métabolique/heure. Elle donne la valeur HiE (extra-chaaleur) qui rentre dans le calcul du bilan énergétique et aboutit une valeur d'énergie retenue comprise entre 20 et 30%.

Excrétion azotée

La crevette rejette de l'ammoniaque dans le milieu ambiant par voies urinaire et surtout branchiale (près de 80%) et cela correspond à près de 80% de l'azote émis. Des expériences ont été conduites afin de voir l'influence de la densité en protéines du régime sur l'excrétion azotée. Il apparaît clairement qu'une réduction de cette densité limite l'excrétion mais en même temps la croissance (Gauquelin,1996). Plus récemment, les valeurs ont été confirmées (Fig.3) avec trois régimes dont le A qui contient près de 50% de protéines et le D avec moins de 30%.



Pour une espèce comme *P. stylirostris*, l'apport protéique peut être très élevé (jusqu'à 65%) sans gêner la croissance et la survie en conditions expérimentales. Toutefois, en conditions de bassins, l'aliment dit de grossissement a subi une diminution de la concentration en protéines brutes qui est passé ces dernières années en NC de 42% à 36% (voit Tableau 1) pour des raisons économiques avant tout et avec un souci de limitation des rejets également. La supplémentation n'a pas été envisagée pour le moment en attendant le résultat des études visant à préciser le besoin quantitatif en lysine notamment (dont le besoin est élevé chez les espèces à croissance rapide). Si l'on représente l'évolution des formules crevettes sur les 18 dernières années, on obtient le tableau suivant :

années	1970	1980	1985	1990	1998
protéines ù	45	42	40	36	34
lipides %	5	5	6	8	8
glucides %	40	40	45	50	50
amidon %	24	24	27	30	30
vitamin C ppm	10 000	5 000	500	300	100*
minéraux %	15	15	12	12	12

* forme stay-C polyphosphate

Extension de l'approche sur les aliments moins polluants à la Nouvelle Calédonie (NC)

Dans l'appellation « aliments moins polluants », cette notion se recoupe bien évidemment avec celle de l'environnement de la crevette. Il s'agit d'un suivi qualité sur l'aliment et du respect des spécifications dans le temps qu'il faut maintenir et améliorer.

Des modifications plus profondes sur la formulation pourront intervenir après obtention des valeurs de contribution de la productivité naturelle sur la croissance d'une part et des données supplémentaires sur la digestibilité des matières premières et le besoin quantitatif en tel ou tel acide aminé indispensable d'autre part (Ces sujets de recherche en fait font partie intégrante des programmes du COP/Tahiti). Voir le document « Argumentaire sur le programme de physiologie nutritionnelle, 1997-2000 ». Si une structure expérimentale est positionnée à la SASV, des aspects de recherche portant sur des points comme : Aliment de finition, outre l'apport en pigments, qui reprendrait des indications fournies dans l'étude sur *P. stylirostris* (Gauquelin, 1996) ainsi dans la note COP/Aq de début 1997; Aliment de démarrage en liaison avec l'appréciation de la part de la productivité naturelle en bassins ; Têtes rouges ; l'hypothèse d'un facteur nutritionnel est formulée. Elle consiste en une possible déficience en acides gras polyinsaturés (PUFA) . Des observations similaires effectuées au Honduras (utilisation d'huile de requin, manque de PUFA) laissent à penser que cette piste est intéressante : Aliment de saison froide (par rapport à un aliment de saison chaude) avec les changements possibles dans l'ingéré, dans l'excrétion azotée, mais aussi dans les valeurs du coefficient de digestibilité des protéines, dans la teneur en énergie digestible du granulé ; Réduction du coût de l'aliment par programmation linéaire (test de sensibilité de la fonction objectif), ..et révision de prix des aliments aquacoles à l'aide de la formule de révision de prix établie lors d'une réunion annuelle entre éleveurs, fabricants et chercheurs.

Tous ces points pourraient être abordés pour apporter des réponses à court terme aux problèmes du moment. En tout état de cause il est indispensable (i) de fédérer les actions par exemple entre COP et SASV , en liaison étroite avec les éleveurs (ii) de trouver les synergies donnant lieu à davantage d'effort de recherche appliquée. C'est un souhait de la filière, c'est une nécessité pour les programmes développés au Cop en vue d'une application terrain.. pour trouver plus rapidement les solutions à la mise en place d'aliments plus performants , calés sur le prix minimum acceptable par tous , (et peut-être capables de mieux faire passer les élevages en saison froide), tout en conservant des caractéristiques de pollution minimum (aspect à étudier en liaison étroite avec les pratiques d'alimentation). En Nouvelle Calédonie, il y a moyen de travailler en agissant de concert pour favoriser une mise en place de capacité d'expérimentation in situ et les réponses peuvent être très vite apportées sur des questions comme le comportement des crevettes en saison chaude/saison froide, les carapaces molles; les aliments spéciaux, les densités d'élevage, ... Ainsi, sur l'effet saison, on peut penser que les crevettes qui passent de 28 à 17°C ont un ralentissement de leur métabolisme, réduction de l'ingéré et baisse

consécutives de croissance, et comment compenser le manque d'apport par une formulation qui augmentera la densité nutritionnelle.

L'implication du COP dans les programmes en cours type STD, OTAN ou ECOS et l'éloignement géographique font que les approches expérimentales doivent être concertées. Les solutions seront proposées en retour à l'ensemble des acteurs du développement, les gérants de fermes d'une part et les provendiers d'autre part.

En résumé, il s'agit de revoir les problèmes dans les élevages, à l'atelier de conditionnement, chez les provendiers, de reconnaître les points de convergence sur des notions, comme par exemple l'évolution du milieu, l'importance de la fertilisation, de recevoir les propositions de travail en collaboration sur des thèmes précis comme l'équilibre protéine-calories de l'aliment, la supplémentation en acides aminés, l'équilibre phosphocalcique, la réduction du prix de l'aliment ou encore la mise en place d'aliments spéciaux (démarrage, croissance, finition, médicamenteux), d'intégrer les points évoqués dans les problématiques de recherche existantes (programme environnement ; argumentaire physiologie nutritionnelle), de maintenir les liens qui ont été développés durant la période du programme européen (STD en matière d'aquaculture et d'environnement et CORDET).

Actions extérieures

En 1997, un certain nombre de contacts avec des industriels (fabricants d'aliments, producteurs de matières premières...) ont permis de dégager quelques pistes d'actions sur des sujets comme: (i) la stabilité des aliments et le remplacement des protéines d'origine marine par des protéines d'origine végétales (Roquette Frères); (ii) la pigmentation des crevettes et la résistance au stress par l'apport de caroténoïdes (avec la coopération de France Luzerne); (iii) l'amélioration des caractéristiques physiques des aliments dans une perspective de réduction de la pollution des bassins d'élevage industriel (avec le groupe Clextal-Framatome). Toutes ces pistes intéressantes dans le cadre des programmes du Département et la concrétisation de telles actions sont à terme une source de financement d'une partie des recherches menées en aquaculture tropicale. Elles peuvent renforcer le crédit d'Ifremer auprès de la profession.

Enfin, comme l'an passé, l'équipe a contribué au bon fonctionnement des élevages du Centre pour les programmes génétique, pathologie et poissons en fournissant les aliments spéciaux. Au titre de soutien aux autres équipes et à l'appui des fermes du Territoire (assistance technique), environ trois tonnes d'aliments divers ont été réalisées à l'atelier de nutrition du COP. Ces aliments préparés à partir de fournées de 50 kg permettent de couvrir les besoins des postlarves, des adultes, des prégéniteurs et des femelles prêtes à pondre pour ce qui est des pénéides; ils couvrent les besoins des larves de chevrettes pour l'écloserie territoriale. Certains de ces aliments ont été suivis par le laboratoire tout comme ceux de l'Huilerie de Tahiti. Un progrès sera réalisé en particulier sur l'aliment maturation avec l'analyse du profil en acides gras. Les quantités produites sur l'année sont consignées dans le tableau ci-dessous qui donne une idée des matières premières qui seront nécessaires en 1998 pour maintenir ce niveau de production :

•Mocal	2000kg
•aliment <i>P. stylirostris</i>	475kg
•Acal	40kg
•aliment frais	700kg
•aliments expérimentaux	100kg
•aliment maturation	200kg
•J1/J2	240kg

Perspectives

Le soutien aux autres équipes devra perdurer en raison de l'isolement géographique du COP. Des actions nouvelles sont programmées, sur la relation nutrition-pathologie par exemple, sur l'accompagnement d'un redémarrage éventuel d'un programme poissons. Dans la relation nutrition-pathologie, il s'avère important d'aborder davantage de réponses sur l'état nutritionnel des crevettes en liaison avec la réponse immunitaire. Il faudra identifier des substances à caractère immunostimulant et faire le rapprochement entre la disponibilité de certains nutriments (caroténoïdes, PUFA, minéraux, vitamines,...) et l'intensité de la réponse immunitaire.

PATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Projet E31003 : Crevette/Etude des Mécanismes de Défenses

Projet E32003 : Crevette/Agents Pathogènes et Epidémiologie

Projet E33003 : Crevette/Prophylaxie et Traitements

Axes de recherches développés en 1997

Le programme de pathologie-immunologie s'est articulé autour de quatre axes :

- Suivi sanitaire et diagnostic des pathogènes
- Caractérisation des défenses de la crevette et recherches en stimulation
- Etude des interactions crevettes (SPR43)-pathogènes et crevettes (SPR43)-milieu
- Applications au testage d'immunostimulants
- Applications à la sélection génétique

Suivi sanitaire et diagnostic des pathogènes (E32003)

Suivi bactériologique des crevettes du COP à partir de prélèvements d'eau de mer, de boues de bassin d'élevage, d'hémolymphe ou de broyats de crevettes :

- Isolement sur milieu Zobell de la flore hétérotrophe hyalinophile totale et détermination de l'aspect des colonies ;
- Congélation à -80°C des isolats en vue de réaliser une collection de bactéries isolées au COP ;
- Réalisation de tests biochimiques afin de tenter de déterminer leur appartenance taxonomique ;
- Evaluation de méthodes d'identification des bactéries par analyse électrophorétique des profils protéiques ou d'amplification de leur ADN selon la méthode de RAPD.

Développement de tests de diagnostics moléculaires visant à détecter les vibrios à l'origine du syndrome 93 en NC :

- Mise au point de sondes moléculaires sur *Vibrio penaeicida* et *V. nigripulchritudo*, toutes deux d'intérêt épidémiologique en NC, et développement d'un test PCR de détection de ces deux espèces avec comme isolats de référence AM101 (*V. penaeicida*) et AM23 (*V. nigripulchritudo*) ;
- Mesure de la sensibilité et spécificité des tests ;
- Evaluation de l'efficacité du test de détection de *V. penaeicida* selon le type de prélèvements : hémolymphe, eau de mer, boues de bassins d'élevage.

Etude des défenses de la crevette (E31003)

Caractérisation des défenses immunitaires des crevettes

- Utilisation des tests déjà maîtrisés au COP et améliorations méthodologiques: comptage hématocytaires totaux, comptages différentiels, mesure du système d'activation de la phospholipase hématocytaire (proPo), mesure de la capacité hématocytaire de production d'ions superoxydes ;
- Développement et mise au point de nouveaux tests: test d'agglutination d'hématocytes par des constituants plasmatiques de crevettes, mesures de l'activité antimicrobienne plasmatique, utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques du système immunitaire de la crevette.

Etablissement des valeurs de normalité des paramètres immunologiques

- Mesure des valeurs moyennes
- Analyse de l'hémogramme : mesure de la part relative de chaque type hématocytaire
- Etude des corrélations entre les activités biochimiques des hématocytes et leur nombre.

Etude des interactions hôtes-pathogènes et hôtes-milieu (E32003)

Etude du modèle d'infection *V. penaeicida*-*Penaeus stylirostris*

- Réalisation d'infections expérimentales par balnéation (voie d'entrée naturelle) et étude de la relation dose infectante-survie à l'infection ;
- Evaluation du modèle infectieux comme outil de sélection génétique par l'étude de la reproductibilité des infections ;
- Caractérisation de la résistance/sensibilité des lignées et familles fournies par l'équipe de Génétique du COP au modèle d'infection expérimentale ;
- Tests *in vitro* sur explants primaires de crevettes afin d'apprécier le pouvoir d'adhésion des vibrio ainsi que leur spécificité tissulaire ;
- Recherche de plasmides support de la virulence dans le cadre d'un travail de recherche initié par C. Goarant.

Etude des interactions hôtes(SCR43)-milieu

- Effet de stress environnementaux contrôlés : influence de l'hypoxie et de la teneur en ammoniacque et de la température.

Application au testage d'immunostimulants (E33003)

Application à la sélection génétique

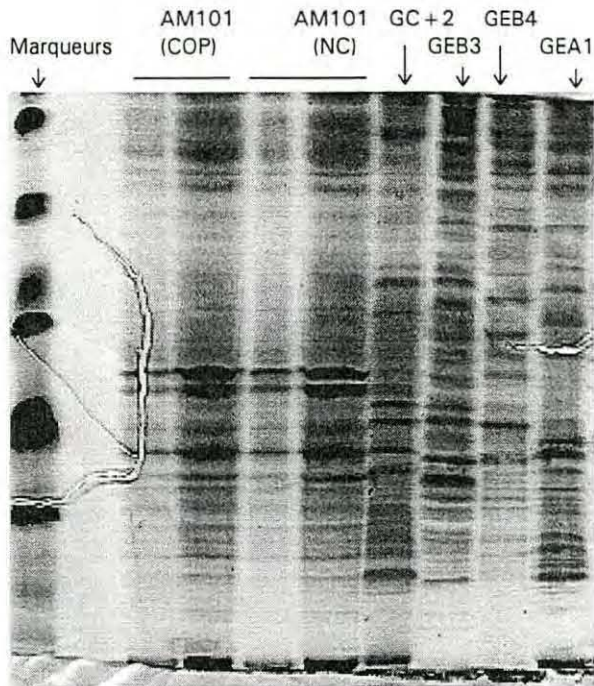
Travaux réalisés et principaux résultats

Suivi sanitaire et diagnostic des pathogènes (E32003)

Suivi bactériologique des crevettes du COP

Un suivi bactériologique a été effectué à trois reprises, en Janvier, Septembre 1997 et Février 98 sur des crevettes *P. Stylirostris* à l'occasion de mortalité anormales signalées par l'équipe de Génétique dans ses bassins d'élevage ou lors de contrôles de qualités sur post larves exportés à destination du Mexique (Aquanova). Il est à noter toutefois que ces mortalités ont toujours été sporadiques et n'ont jamais revêtu un caractère épidémique et qu'elles ont toujours été associées à de mauvaises conditions d'élevage. Plus d'une quarantaine d'isolats bactériens ont été retenus sur la base de l'aspect caractéristique des colonies bactériennes étudiées en milieu Zobell-Agar. Ces bactéries ont été classées selon la date de leur isolement, l'aspect des colonies, la nature du prélèvement puis ont été congelées à -80°C en milieu Zobell liquide additionné de glycérol afin de constituer une collection de souche bactérienne, selon le code suivant : L: eau du lagon, G: crevettes de la Génétique, C: broyat de crevette, M: crevette Moribonde, S: crevette d'apparence Saine, +: crevette fraîchement Morte. Des galeries API 10E (Bio Mérieux) ont été réalisées à partir du stock préexistant au COP ainsi que des colorations de gram, des tests d'activités enzymatiques (oxydase, LDC, ODC,...) et d'acidification des sucres. A l'exception d'un isolat toutes sont Gram-. Cependant l'analyse des caractéristiques physiologiques et biochimiques de ces bactéries a été rendu difficile en raison de l'utilisation de produits tels que les galeries API 10E périmés depuis peu et donnant des résultats à l'évidence peu fiables.

Caractérisation des profils protéiques de quelques bactéries isolées au COP et comparaison à la souche AM101 (*V. Penaeicida*) isolée en NC :



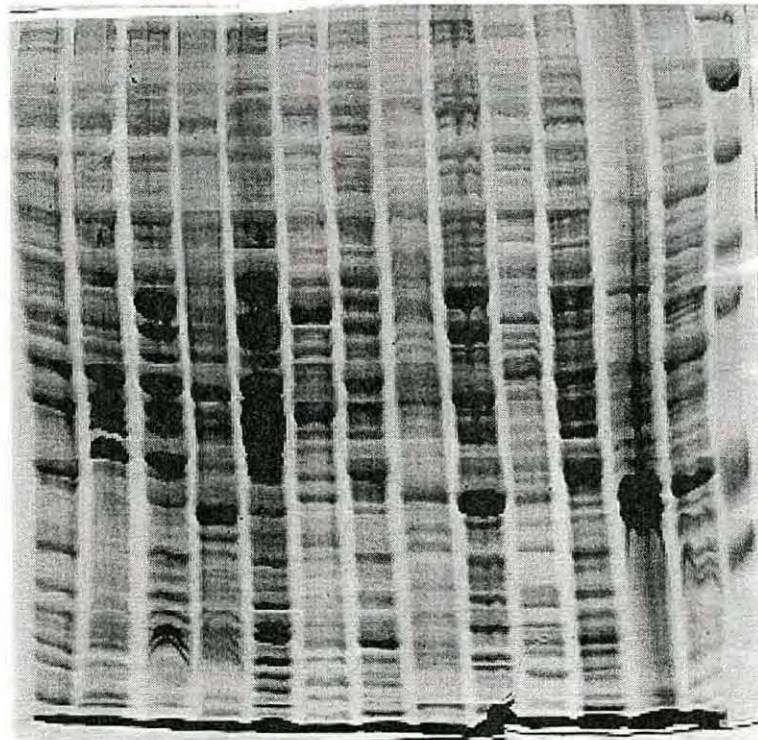
L'analyse des profils protéiques révèle une grande variabilité dans la taille des protéines majeures des isolats bactériens originaires du COP: A chaque isolat correspond un profil protéique différent suggérant ainsi que chacun de ces isolats appartient à une espèce bactérienne distincte. Cette méthode d'analyse semble être suffisamment sensible et spécifique pour autoriser un suivi fiable des populations bactériennes retrouvées au COP.

Les multiples analyses électrophorétiques que nous avons réalisé sur chacun de ces isolats bactériens du COP indiquent que ces

bactéries sont différentes de la souche *V. penaeicida* AM101 (profil protéique caractéristique) souche pourtant très utilisée, au moins depuis un an, en zone contrôlée au COP (salle d'infection expérimentale où les eaux usées subissent un traitement à l'hypochlorite de Na). Ce fait est rassurant pour la santé des élevages du COP et indique que toutes les précautions ont été prises jusqu'ici concernant la manipulation de cet agent pathogène pour la crevette. La souche AM101 détenue au COP a été comparée avec celle apportée de NC à l'occasion de la mission de C. Goarant en Fev 97. Les profils sont identiques ce qui a valeur d'identité entre les deux bactéries.

Illustration de la spécificité des profils protéiques bactériens obtenus après électrophorèse par l'analyse de 12 souches de référence appartenant à 12 espèces de vibrio distinctes :

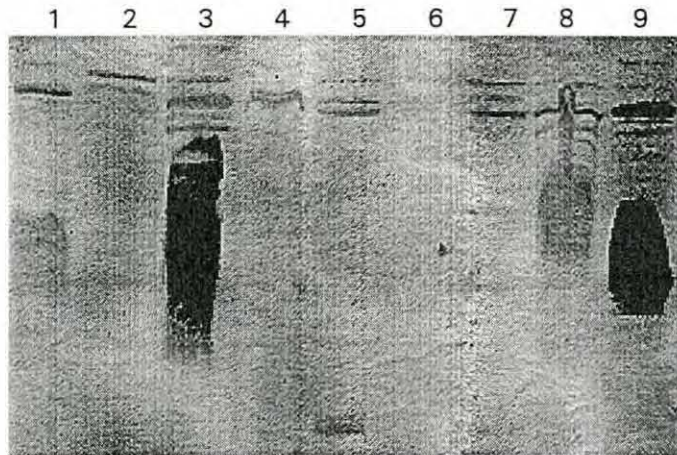
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 Marqueur



1:AM101 (*V. penaeicida*), 2: KH1 (*V. penaeicida*), 3: *V. carchariae*, 4: *V. damsela*, 5: *V. fluvialis*, 6: *V. gazogenes*, 7: *V. harveyi*, 8: *V. hollisae*, 9: *V. nereis*, 10: *V. nigripulchritudo*, 10: *V. orientalis*, 11: *V. tubiashii*, 12: *V. alginolyticus* (Souches de référence fournies par Franck Berthe).

Outre sa grande spécificité ce type d'analyse permet de distinguer des sous espèces bactériennes puisque KH1 isolée au Japon et AM101 isolée

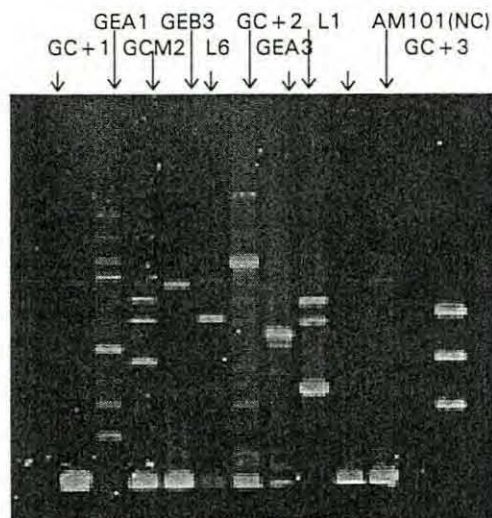
en NC ont toutes deux des profils distincts bien qu'appartenant à la même espèce (travaux d'hybridation ADN/ADN réalisés par F. Berthe). Ces différences ont également été noté en utilisant la technique d'AP-PCR (C. Goarant) ou la rybotypie (S. Koblavi & F. Berthe). Nous avons également tenté de caractériser certaines protéines de la souche AM101 à l'aide d'un immunosérum anti-KH1 produit par Patrick Lapouyade durant son travail de DESS à la Tremblade/St Vincent.



La révélation de l'immunoempreinte par cet anticorps polyclonal de souris fait apparaître une protéine immunodominante chez la souche AM101. Néanmoins des réactions croisées sont observées avec des protéines de poids moléculaires proches appartenant à d'autres espèces de vibrio que *penaeicida*. L'utilisation

de cet anticorps pour des techniques d'immunomarquage et de diagnostic spécifique d'espèce semble donc être d'un intérêt limité.

L' amorce 5'-TTGTAAAACGACGGCCAG-3' fournie par Cyrille Goarant et utilisée en AP-PCR a été utilisée en RAPD sur des ADN de bactéries isolées au COP. Ces ADN ont été extraits selon une technique classique au phénol/chloroforme/alcool isoamylique/protéinase K avant d'être amplifiés par PCR.



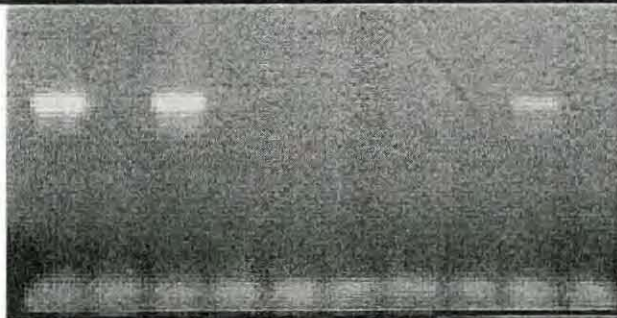
L'analyse des produits d'amplification obtenus après marquage au bromure d'éthidium (BET) et exposition du gel d'électrophorèse aux UV révèle 8 profils distincts. A noter que deux bactéries GC+3 et GC+1 présentent deux produits d'amplification (dont un minoritaire et faiblement amplifié) similaires à ceux obtenus à partir d'AM101. Nous avons cependant pu montrer ultérieurement que ces deux dernières bactéries n'appartenaient pas à *Vibrio penaeicida* en utilisant les amorces spécifiques pour le diagnostic par PCR de *Vibrio penaeicida*. Cette technique de RAPD présente l'avantage d'être rapide à mettre en

oeuvre et permet rapidement de regrouper des isolats de proches parents. Il convient cependant si l'on se réfère à cette seule technique d'utiliser d'autres amorces simultanément pour confirmer l'identité de différents isolats, comme l'illustre cette exemple. Cette technique de RAPD sera appliquée comme premier criblage des bactéries isolées au COP avant d'entreprendre ultérieurement une caractérisation biochimique classique des représentants bactériens associés à chaque profil génomique obtenus par RAPD.

Développement de tests de diagnostics moléculaires

Un effort de recherche considérable a été consacré à la mise au point de sondes moléculaires permettant un diagnostic sensible et spécifique des bactéries isolées en NC appartenant au genre *Vibrio* et aux espèces *penaeicida* et *nigripulchritudo*, connues pour être responsables du syndrome 93. Après analyse et comparaison des séquences nucléotidiques des gènes de *vibrio* codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal, les séquences nucléotidiques de deux couples d'amorces ont été définies puis les amorces commandées pour synthèse. Après tâtonnements successifs sur les conditions de PCR satisfaisants à un diagnostic spécifique, les conditions optimales pour un test fiable ont été établies, notamment en ce qui concerne la température d'hybridation de la sonde effectuée à 62°C.

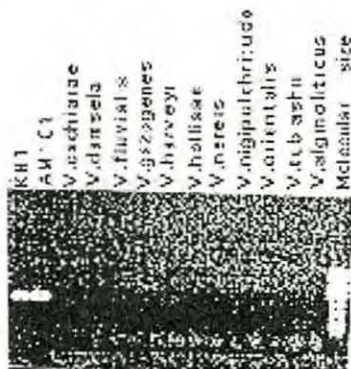
Amorces <i>V. penaeicida</i>					Amorces <i>V. nigripulchritudo</i>				
KH1	KA13	AM101	AM102	Témoin -	KH1	KA13	AM101	AM102	Témoin -



Un produit de taille attendue de 310 bp a été obtenu sur de l'ADN de *Vibrio penaeicida* (KH1, souche japonnaise et AM101, souche néocalédonniene) en utilisant le couple d'amorces défini pour *V. penaeicida*. Sur les mêmes extraits d'ADN mais en utilisant cette fois ci le couple d'amorces défini pour *V. nigripulchritudo* seul l'ADN de l'isolat

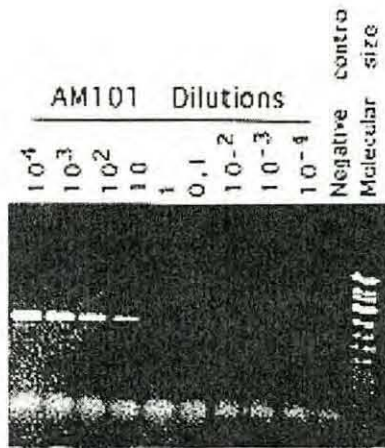
AM102 d'origine néo-calédonniene a été amplifié (produit de taille attendue et identique à celui généré par les amorces *V. penaeicida* sur ADN de KH1 et AM101). A noter que l'ADN de la souche japonnaise KA13 n'a pu être amplifié. Ce résultat suggère que l'ADN extrait ait été de mauvaise qualité ou en trop faible quantité, soit que cette souche diffère queque peu de la souche type KH1, ce qui rejoint d'autres observations déjà énoncées.

La spécificité du test de détection de *V. penaeicida* a été établi en cherchant à amplifier de façon simultanée des ADN provenant des souches AM101 et KH1 avec ceux obtenus à partir de souches de référence fournies par F. Berthe, toutes vibrios, mais appartenant à 11 espèces différentes.



Les résultats montrent que seuls les ADN provenant d'isolats appartenant à *V. penaeicida* sont amplifiables en utilisant les amorces spécifiques de *V. penaeicida*.

La sensibilité de cette technique d'amplification génique a été évaluée en effectuant des dilutions successives à 1 log d'intervalles de suspensions bactériennes d'AM101. Les bactéries présentes dans chaque échantillon avant extraction d'ADN ont été dénombrées après étalement de celles ci sur boîte de Petri préalablement coulées en milieu Zobell-Agar et incubation à 27°C pendant une nuit.



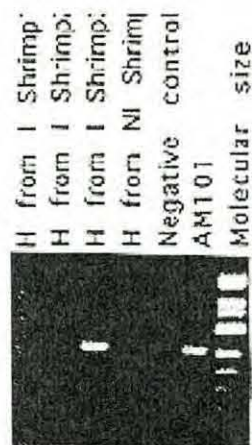
Les résultats d'amplification indiquent que l'ADN extrait de moins de 10 bactéries viables et cultivables est présent en quantité suffisante pour qu'un produit d'amplification marqué au BET soit visible sous UV (>10ng/μl, seuil de sensibilité de cette technique de révélation des ADN)

Afin de réduire le temps d'extraction, les risques de manipulations de produits toxiques tels le phénol, et réduire les sources de contaminations possibles par de l'ADN présents dans les aérosols en limitant les procédés opératoires, tous les tests d'amplification d'ADN génomique bactérien à l'aide d'amorces spécifiques ont été réalisés à partir d'extraits d'ADN préparés en Chelex et en utilisant des cones à

filtres. A titre de contrôle, un témoin positif (ADN d'AM101) et un témoin négatif (ADN à tester remplacé par de l'eau) ont été effectués pour chaque amplification.

Le test de diagnostic de l'AM101 dans l'eau de mer a été étendu avec succès à la détection d'AM101 dans l'hémolymphe. Nous avons en outre pu montrer que la présence éventuelle d'inhibiteur de la polymérase présent dans l'hémolymphe de crevette n'altérerait pas la sensibilité de la méthode d'amplification en remplaçant le tampon de dilution "eau de mer reconstituée" des bactéries par de l'hémolymphe. Ces résultats indiquent que les propriétés chélatantes d'ions divalents du chelex sont suffisantes pour inactiver l'action d'éventuels inhibiteurs présents dans les échantillons d'hémolymphe (ions agissant comme cofacteurs).

L'hémolymphe de crevettes SPR43 infectées expérimentalement par balnéation avec la souche AM101 a été prélevé 16 h post infection et l'ADN extrait.

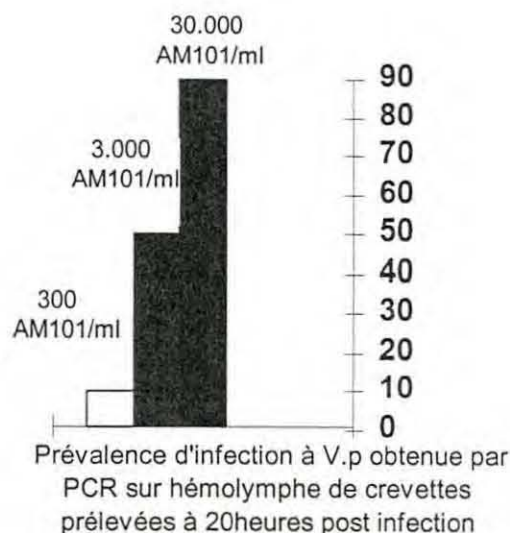
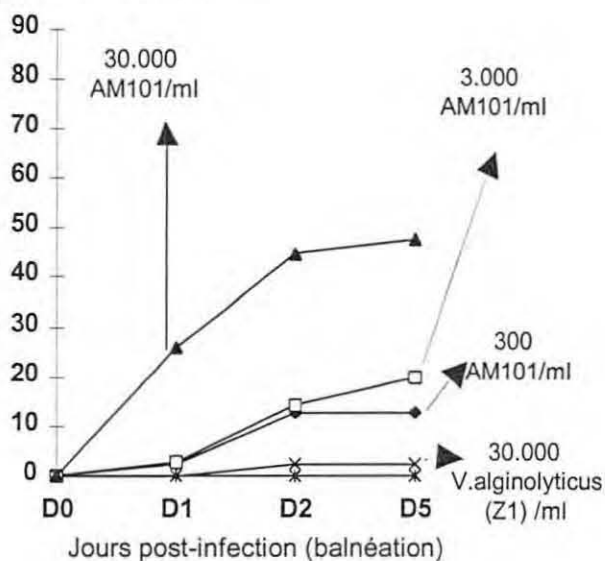


Trois hémolymphe de crevettes infectées ainsi qu'un prélèvement d'hémolymphe réalisé sur une crevette saine ont été testés lors de cette expérience. Un extrait au chelex de l'ADN d' AM101 est ici réalisé à titre de témoin positif de PCR. La présence d'AM101 est détecté par PCR dans l'hémolymphe d'une crevette seulement. Ces résultats ont été corroborés à ceux obtenus après observation à l'état frais entre lame et lamelle d'une goutte d'hémolymphe (visualisation des bactéries au contraste de phase et fort grossissement) ou après technique d'étalement d'hémolymphe sur boîte de Petri coulée en Zobell-Agar (dénombrement et aspect des colonies). On notera que toutes les crevettes ne sont pas retrouvées infectées ce qui semble indiquer que les premières lignes de défense, au niveau cuticulaire notamment, sont efficaces pour

conférer une résistance, le temps de 16h post infection étant trop court pour qu'une élimination totale du pathogène dans l'hémolymphe soit envisageable.

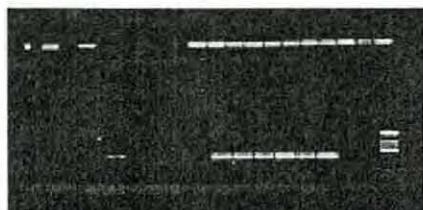
Une autre expérience de balnéation des crevettes avec de l'AM101 a été réalisée en faisant varier la dose infectieuse (constitution des lots). Les taux de mortalité cumulée à l'infection obtenus à différents temps ont été comparés à la prévalence d'AM101 dans les hémolymphe des animaux prélevés 20h post-infection en effectuant une PCR sur l'hémolymphe de quelques animaux pris aléatoirement (n = 10) au sein de chaque lot.

Mortalités cumulées (%)



Les résultats indiquent qu'aux plus fortes doses infectantes (3.000 et 30.000/ml) la prévalence « sérologique » à 20 heures post infection est significativement plus forte que les taux de mortalité obtenus en J5, taux qui ne varient plus ensuite avec le temps par expérience du modèle infectieux. Ces résultats suggèrent que les défenses immunitaires de la crevette intervenant en deuxième ligne (une fois la barrière cuticulaire franchie) sont efficaces pour certaines d'entre elles puisqu'elles semblent juguler le risque de septicémie dont l'issue est fatale.

Le test de diagnostic de *Vibrio penaeicida* a été évalué sur le terrain à partir d'extraits d'hémolymphes de crevettes originaires des fermes de Ouano et Menaouer en NC transférées à la station de St Vincent. Des prélèvements ont été effectués sur des animaux sains d'apparence, moribonds ou fraîchement morts.



22 hémolymphes sur 60 prélèvements analysés en PCR se sont révélées héberger de l'AM101. Les hémolymphes d'animaux moribonds ou fraîchement morts ont toutes été trouvées positives, les deux autres provenaient de deux animaux en pleine santé apparente et correspondent aux signaux

d'amplification plus faibles (non visibles sur l'image scannée) signant peut être une infection débutante. Ces résultats préliminaires ainsi que ceux relatifs à la sensibilité du test indiquent que des porteurs sains peuvent être détectés par cette méthode et sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle *V. penaeicida* (AM101) n'est pas une bactérie opportuniste mais un réel agent pathogène.

Etude des défenses de la crevette (E31003)

Caractérisation des défenses immunitaires des crevettes : Activité antimicrobienne plasmatique

Un test *in vitro* de mesure de l'activité antimicrobienne dans le plasma de crevettes a été développé. Les plasmas sont obtenus par double centrifugation des prélèvements d'hémolymphes effectués en solution anticoagulante d'Alsever. La première réalisée à 400g, 5 min. permet de se débarrasser des hémocytes, la seconde effectuée sur le surnageant transvasé dans un deuxième tube, est réalisée à 10000g 5min. et permet

d'éliminer dans le culot les éventuelles bactéries contaminantes. Chaque plasma testé en duplicat est caractérisé par sa capacité à inhiber la croissance d'une souche *V. penaeicida* (AM101) ou *V. alginolyticus* (Z1) originaire de Nouvelle-Calédonnie également. La croissance des suspensions bactériennes est mesurée au spectrophotomètre. Un témoin sans bactérie (Bruit de fond:BF) réalisé pour chaque plasma est constitué afin de répondre à deux préoccupations: vérification de l'absence de bactéries contaminantes résiduelles dans le plasma, prise en compte de l'effet optique lié à la mélanisation ou/et à l'hémocyanine. Plusieurs cupules présentant les deux souches bactériennes seules sont constituées (moy+) ainsi que des cupules où le plasma a été remplacé par un antibiotique bactériostatique (moy-). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé selon la formule % d'inhibition du plasma n : $(1 - (DO(n) \text{ moyenne} - DO (BF:n)) / (DO (moy +) - DO (moy -))) \times 100$ vis à vis de chacune des souches bactériennes, AM101 et T1. En terme de tendance, les résultats préliminaires obtenus montrent que les plasmas provenant de crevettes SPR43 présentent une activité inhibitrice *in vitro* vis à vis d'AM101 (souche fortement pathogène pour cette souche) et une activité proliférative (valeur d'inhibitions négatives) vis à vis de Z1 (souche que l'on peut qualifier d'opportuniste en raison des résultats de pathogénicité obtenues en conditions expérimentales)

Etablissement des valeurs de normalité des paramètres immunologiques

Le tableau suivant rend compte des valeurs moyennes des paramètres immunologiques chez la crevette *P. stylirostris* dans un souci de caractérisation de la souche SPR43. Ces valeurs sont établies chez des animaux en stade C du cycle de mue ne présentant pas de signes infectieux et n'ayant pas subi de stress connu. En l'absence de corrélation entre les valeurs des paramètres immunologiques et le poids des animaux, celles-ci sont valides sur l'étendue de la gamme des animaux testés.

	moyenne	écart-type	minimum	maximum	nombre d'observations
Poids (g)	15.7	5.8	5	33.4	566
<u>Hémocytes totaux</u> (cellules/mlx10 ⁵)	22	8	2	88	566
<u>Activité phénoloxydase</u> (DO/80µl)	0.266	0.102	0.048	1.725	566
(mDO/cellule x 10 ⁻⁵)	8.29	5.4	3.3	1000	566
<u>Burst respiratoire</u>					
Activité de base :					
(DO/50µl hémolymph)	0.145	0.068	0.053	0.425	105
(DO/cellule x 10 ⁻⁸)	3.88	2.76	0.29	17.7	105
Activité stimulée :					
(DO/50µl hémolymph)	0.208	0.112	0.062	0.707	105
(DO/cellule x 10 ⁻⁸)	4.41	3.05	0.32	21.0	105
<u>Activité antibactérienne*</u> (exprimée en % d'inhibition)					
AM101	20.2	15.2	- 21.1	43.1	97
Z1	9.6	30.6	- 63.6	35.8	95

* Valeurs indicatrices préliminaires obtenues sur plasmas de crevettes, indépendamment du stade de mue.

La figure ci-dessous montre la distribution des trois types d'hémocytes constituant les hémocytes totaux. Un THC élevé est principalement constitué de cellules hyalines, le nombre des cellules à grands granules varie peu. Il est donc difficile d'établir un tableau des valeurs moyennes pour chaque type d'hémocyte.

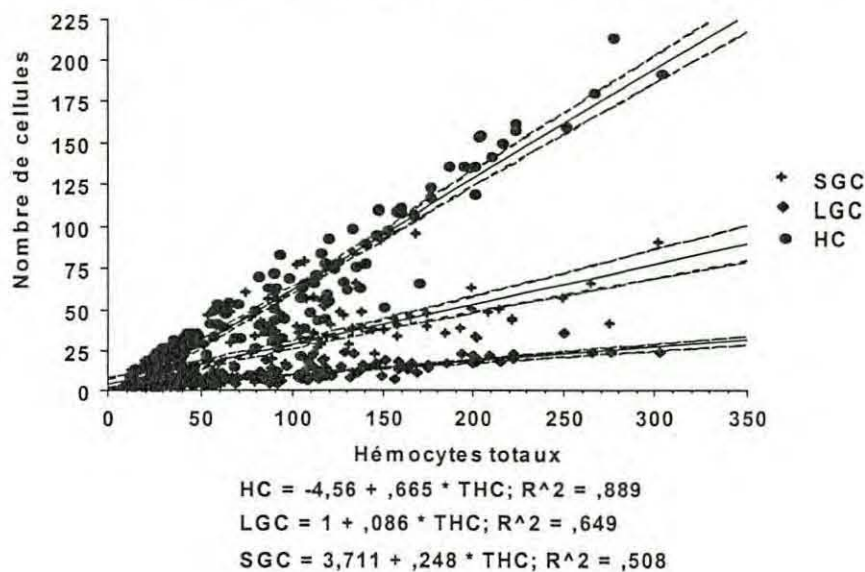


Figure 1 : Hémogramme, relation entre les hémocytes totaux et chaque type cellulaire.

Le tableau ci-dessous montre les relations entre les activités biochimiques des hémocytes et leur nombre circulant dans l'hémolymphe. Il apparaît que la phénoloxydase est corrélée négativement au nombre des hémocytes totaux.(THC) ceci s'explique par la présence d'inhibiteurs du système prophénoloxydase (α -macroglobuline et pacifastine) corrélée au nombre d'hémocytes. Ces molécules sont d'origine hémocytaire bien que les quantités présentes dans le plasma soient très importantes. La phénoloxydase est corrélée négativement aux cellules à grands granules. Cette corrélation négative n'a pas de sens puisque que ce type hémocytaire contienne le système prophénoloxydase. Cependant ceci s'explique par l'activité des inhibiteurs sur l'activation de la prophénoloxydase. Une grande quantité de cellules induit une forte concentration d'inhibiteurs, et en dépit d'un nombre de cellules à grands granules (LGC) plus élevé, l'activité phénoloxydase est malgré tout inhibée.

Le burst respiratoire par les hémocytes n'est pas corrélé au nombre des hémocytes totaux montrant ainsi que tous les hémocytes ne sont pas impliqués dans le phénomène de la phagocytose. Cependant Le burst respiratoire est corrélée significativement au nombre de cellules semigranuleuses (SGC) circulantes cofirmant ainsi chez *P. stylirostris* la fonction principale de ce type hémocytaire.

	coefficient de corrélation	probabilité
Hémocytes totaux- Phénoloxydase	-0.443	<0.00001
Phénoloxydase -Cellules à grands granules	-0.204	0.0142
Hémocytes totaux -Burst respiratoire	0.082	0.3291
Burst respiratoire -Cellules semigranuleuses	0.493	<0.0001

Etude des interactions hôtes-pathogènes et hôtes-milieux (E32003)

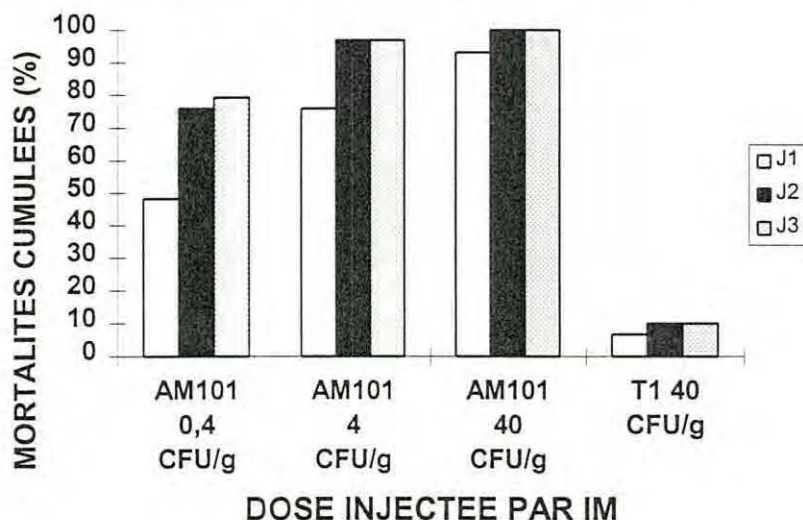
Etude du modèle d'infection *V. penaeicida*-*Penaeus stylirostris*

Mise au point d'un modèle infectieux *V. penaeicida* - SPR43.

Peu de modèles infectieux sont aujourd'hui à la disposition des chercheurs travaillant sur les arthropodes et à fortiori chez les crevettes. Pourtant ces modèles sont précieux pour une meilleure compréhension des systèmes de défense de ces animaux et la mise en évidence de mécanismes immunitaires spécifiques. Ils permettent en outre d'envisager à court terme une sélection des animaux sur des critères de résistance lorsque les pathogènes étudiés sont responsables de pertes économiques importantes dans les élevages comme c'est le cas pour *Vibrio penaeicida* et *V. nigripulchritudo* responsables du syndrome 93 en NC.

Mise en évidence d'une pathogénicité d'AM101 dose dépendante par infection expérimentale utilisant le mode de contamination naturelle des crevettes (baignation)

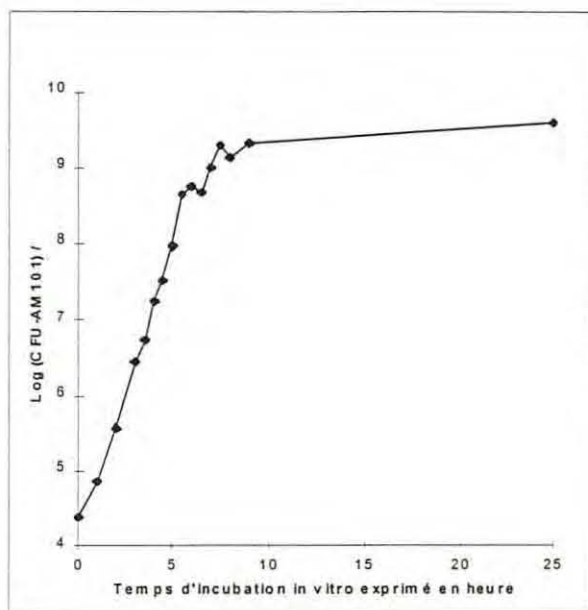
Le choix de ce mode de contamination a été préféré aux autres du fait du caractère dose dépendant de la pathogénicité d'AM101 présentant un intérêt certain pour l'étude des mécanismes immunitaires précoces et physiologiquement normaux mis en jeu. Il est de plus très délicat de travailler selon la voie intramusculaire en raison de la pathogénicité très élevée de l'AM101 comme le montre le graphique ci-dessous :



Mise en culture des bactéries avant infection et protocoles expérimentaux assurant la reproductibilité des tests *in vivo*

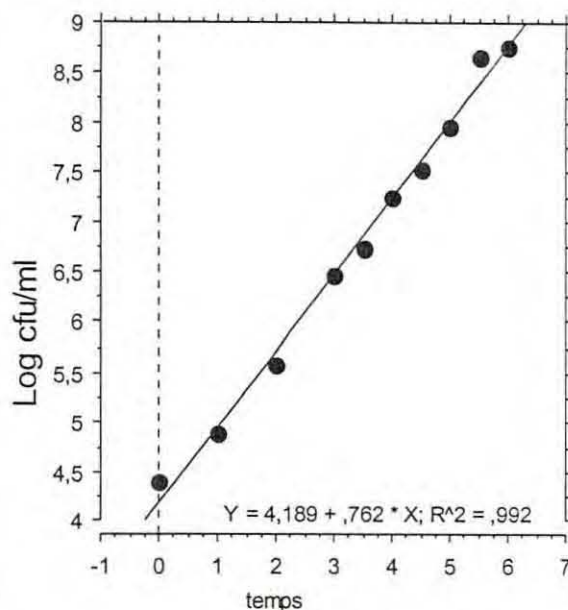
Les bactéries AM101 ont été placées dans des conditions strictes de culture *in vitro* : milieu Zobell de composition fixe, agitation permanente, inclinaison à 45° des tubes de culture, température d'incubation de 27°C, rapport air.milieu de 1. Cela nous a permis de définir la concentration en AM101 atteinte en phase de plateau, de $2 \cdot 10^9$ AM101/ml et de définir le temps de division des bactéries.

Pour des concentrations supérieures à $5 \cdot 10^8$ bactéries/ml une relation linéaire a été trouvée entre la concentration bactérienne et les densités optiques obtenues après lecture au spectrophotomètre. En raison de sa commodité ce type de mesure de la concentration d'une suspension bactérienne doit être préférée au dénombrement bactérien obtenu par la technique d'étalement sur boîte nutritive d'une suspension bactérienne et visualisation des colonies après une nuit d'incubation.



A

A : Croissance *in vitro* d'AM101 estimée par la technique d'étalement sur boîte de Pétri nutritive des suspensions bactériennes.

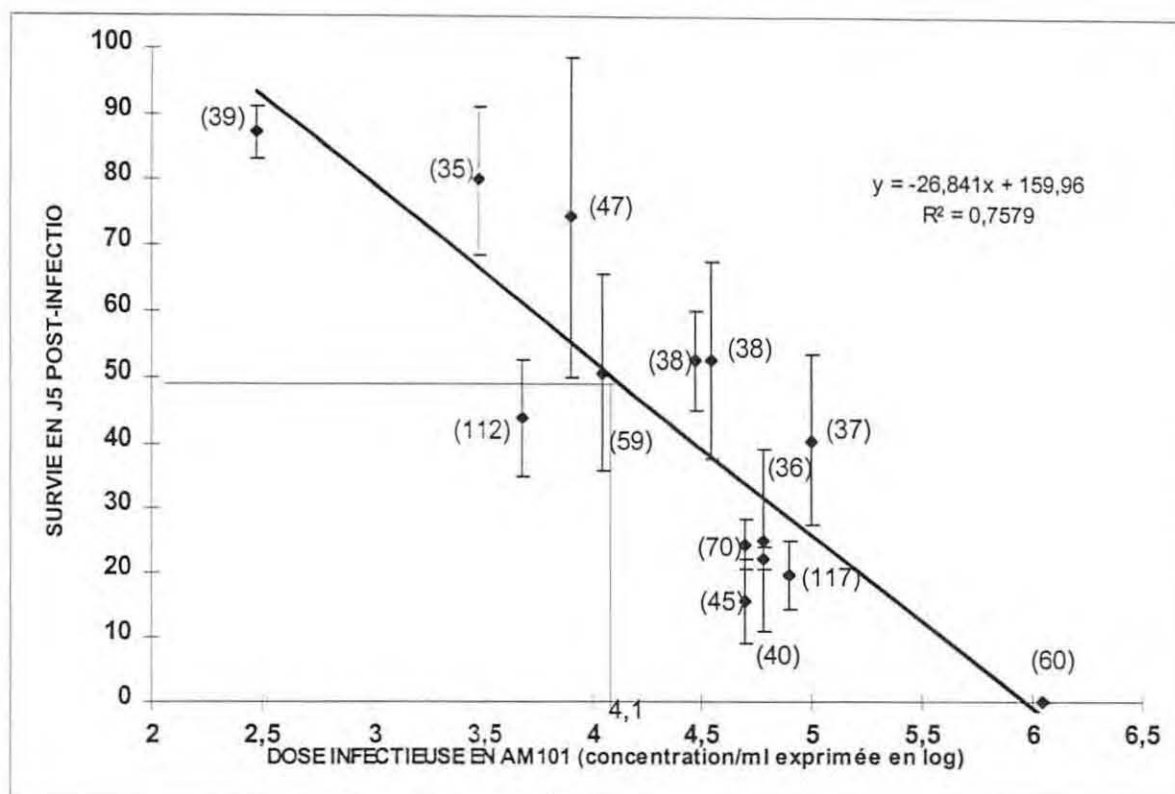


B

B : Croissance exponentielle d'AM101 les 7 premières heures d'incubation.

Reproductibilité des tests *in vivo* :

Des crevettes SPR43 de 10 à 15 g ont été infectées par baignade tout au long de l'année 97 en respectant rigoureusement le même protocole d'infection par baignade: immersion, pendant deux heures et sous aération (bullage), des crevettes dans un volume d'eau contenant une concentration théorique de *Vibrio* calculée à partir des abaques précédents, puis transfert des crevettes dans des bacs cylindroconiques remplis avec 100 l d'eau de lagon filtrée et équipés d'un fond plat percé (volume mort de 35 l) après rinçage successif des crevettes capturées à l'épuisette dans deux baignes remplies d'eau propre. Les résultats de survies obtenues sont présentés dans le graphe ci-dessous.



773 crevettes ont été infectées à différentes doses d'AM101 à l'occasion de 9 challenges bactériens réalisés sur l'année. Le coefficient de corrélation fait apparaître une relation étroite entre dose infectante et résultats de survies au 5ème jour post infectieux. Le pic de mortalité intervient à J2. A partir de J4 les mortalités cessent. L'effectif des crevettes est indiqué entre parenthèse, les variations autour des pourcentages de survies reflètent l'écart type des pourcentages de survie inter-bacs.

Trois autres infections réalisées dans les mêmes conditions que précédemment avec des concentrations en AM101 de 10^4 à 10^5 /ml ont été réalisées, totalisant 532 crevettes SPR43. L'absence de mortalité significative lors de ces tests par rapport aux crevettes non infectés nous a conduit à rechercher les causes possibles de cet échec à reproduire la maladie.

Plusieurs hypothèses ont été rejetées après analyse :

- La température de l'eau : en effet celle ci varie peu à Tahiti contrairement à celles enregistrées dans les élevages en NC soumises à une forte saisonnalité. Les mesures de température effectuées au COP et en conditions contrôlées d'infections expérimentales indiquent que les infections ont toutes été réalisées avec des températures de l'eau oscillant entre 25 et 28 °C. On notera par conséquent que la pathogénicité des souches de *V. penaeicida* originaires de NC, comme d'ailleurs celles appartenant à *V. nigripulchritudo*, éprouvées d'infections expérimentales à l'appui, s'exprime à température de l'eau élevée en dépit du caractère saisonnier du syndrome 93 où les mortalités sont observées à l'occasion de chutes brutales de la température. Ces résultats sont en la faveur d'un déséquilibre de la flore bactérienne pathogène et/ou d'une plus grande susceptibilité des crevettes (paramètres immunologiques) à l'infection lors de baisses brutales de la température de l'eau.

- La qualité de l'eau : présence de bactéries résiduelles ayant échappées à la filtration et rentrant en compétition avec l'AM101, matière organique pouvant agréger les vibrios mis en bac d'infection. Ces deux causes pouvant aboutir à une diminution de la virulence de l'AM101 en condition expérimentale. En effet les essais d'infection expérimentales avec de l'eau de mer reconstituée (sel de mer et eau douce) stérilisée par autoclavage ou des l'eau de mer stérilisée par autoclavage n'ont pas permis de mettre en évidence un impact notable de ces traitements sur la virulence d'AM101.

- Le stade de multiplication de l'AM101 : afin de connaître avec précision la concentration exacte d'AM101 utilisée lors des tests d'infection nous sommes toujours partis d'un bouillon d'AM101 incubé une nuit à 27°C aboutissant à la phase de plateau ou la concentration bactérienne devient stable dans des conditions de cultures rigoureuses (2 10⁹/ml) . En effet la concentration réelle d'AM101 utilisée lors de l'infection n'est connue que postérieurement (un jour plus tard) en étalant un aliquot de la dilution d'AM101 ayant servi e à l'infection. L'hypothèse selon laquelle un bouillon d'AM101 en pleine phase de croissance exponentielle en bouillon synthétique pouvait se révéler être plus virulent qu'un autre où les bactéries sont en phase de plateau a été testée. Les résultats de survie à l'infection à doses d'AM101 égales montrent que des bactéries en phase de plateau sont toutes aussi virulentes que celles en phase exponentielle.

Nous avons néanmoins pu identifier une cause possible expliquant la perte de virulence de l'AM101 en réalisant l'expérience suivante : Les bactéries AM101 décongelées à partir du stock -80°C réalisé en début d'année 97 sont étalées sur boîte et incubées une nuit à 27°C. Quelque soit la bactérie, toutes les infections expérimentales réalisées cette année ont été effectuées à partir du même stock de souche conservé à -80°C afin d'éviter les pertes de virulence qu'auraient pu engendrer des passages successifs de souches sur milieux synthétiques et vérifier la pureté les colonies. 3 colonies sont ensuite repiquées en bouillon liquide pour préparer les bactéries nécessaires à l'infection du lendemain. Dans un cas (i) le bouillon a été réalisé à partir d'une boîte contenant des bactéries du stock -80°C entreposée 3 semaines au laboratoire à température ambiante, dans l'autre cas (ii) le bouillon a été réalisé à partir d'une boîte datant d'un jour seulement. Les survies en J5 des crevettes à l'infection à la concentration d'AM101 de 5.10⁴/ml sont de 54% i) et 26% ii) respectivement.

Amélioration des équipements de la salle expérimentale : mise en place d'un dispositif de chloration des tuyaux d'alimentation des bacs, de rinçage des tuyaux à l'eau douce et de videage en eau des tuyaux, confection d'épuisettes individuelles pour chaque bac de la salle expérimentale et de couvercles pour prévenir les contaminations inter-bacs.

Etude des interactions hôtes (SPR43)-milieu

L'ammoniacque : Stress à long terme

Des travaux complémentaires à ceux de 1996 ont été réalisés pour l'analyse de la réponse immune des crevettes à un stress à l'ammoniacque. D'une part la phagocytose par la mesure de la production d'ions superoxydes par des hémocytes stimulés devait être mesurée et d'autre part le protocole d'infection devait être revu. Le stress a été réalisé sur 6 jours, les doses d'ammoniacque étaient 0, 1.5 et 3 mg.l⁻¹. Les hémocytes totaux et les hémogrammes et la phagocytose ont été mesurés chez des crevettes en intermue à l'issue des 6 jours.

Il apparaît que les crevettes soumises à un stress à l'ammoniacque pendant 6 jours ne récupèrent pas leur niveau de défense initial. Les hémocytes totaux diminuent de 40% à 1.5 mg.l⁻¹ et de 70% à 3 mg.l⁻¹, cette diminution est liée à la baisse du nombre de cellule hyaline (14% et 54%) et des cellules semi granuleuses (57% et 89%). La diminution de ces types cellulaires entraîne une baisse de la capacité de phagocytose de 30 % chez les crevettes soumises à la dose de 3 mg.l⁻¹ d'ammoniacque pendant 6 jours.

La résistance à l'infection est différente suivant le modèle choisi. La figure 2 (en haut) montre l'effet cumulatif de l'infection par *Vibrio alginolyticus* en intramusculaire et du stress à l'ammoniacque, l'infection aggrave les effets du stress. Alors que l'infection par *Vibrio penaeicida* entraîne une mortalité élevée ne dépendant pas de la dose d'ammoniacque (fig; 2, en bas). Les niveaux de mortalité des crevettes infectées par les 2 bactéries sont différents mettant clairement en évidence l'extrême pathogénicité de *V. penaeicida* quelque soit le niveau de stress.

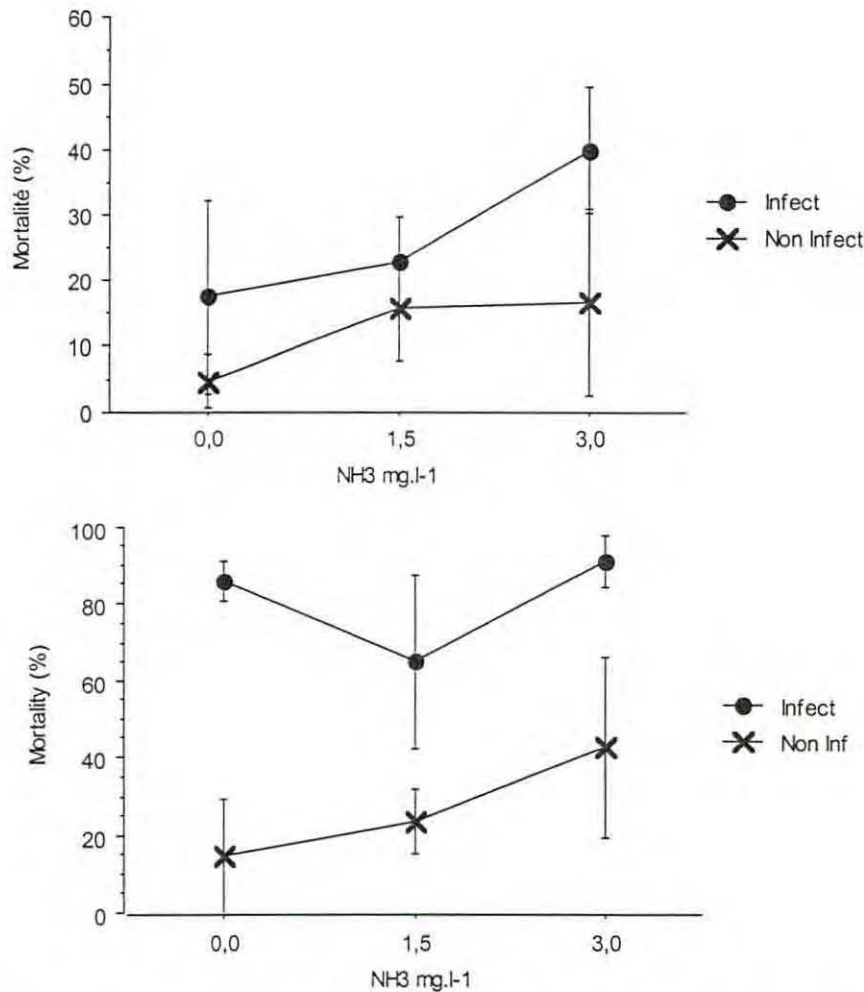


Figure 2 : Effet combiné de l'infection et du stress à l'ammoniaque, par *V. alginolyticus* (en haut) et *V. penaeicida* (en bas)

L'hypoxie

L'étude entreprise en 1996 des effets de l'hypoxie sur la réponse immune (Gangnery, 1996) a été reprise dans sa totalité puisque beaucoup d'imprécisions subsistaient. Le protocole expérimental est resté le même : les crevettes sont stressées dans des enceintes dont le niveau d'oxygène est contrôlé par un filtre biologique et par un système de régulation d'injection d'air selon le niveau d'oxygène requis dans le bac (Soyez, 1997).

Il apparaît donc qu'une hypoxie de 24 heures à $1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ entraîne une chute significative des hémocytes totaux de 10 et 30%, cette chute est liée à une diminution significative à proportion égale des cellules hyalines et des cellules semigranuleuses. Corrélativement, la capacité de phagocytose diminue mais de manière surprenante l'activité de la phénoloxydase augmente significativement. Cette augmentation est en fait liée à une diminution de la quantité d'inhibiteurs (α -macroglobuline et pacifastin) contrôlant l'activation du système phénoloxydase. La présence et l'activité de ces inhibiteurs sont mises en évidence chez les crevettes stressées et témoins en testant l'effet des plasmas sur l'inhibition de l'activité de la trypsine.

Le modèle d'infection utilisé pour tester la résistance des crevettes stressées est la bactérie *V. alginolyticus* injectée en intra musculaire à raison de 10^4 cfu/g. Le résultat montre une plus grande sensibilité à l'infection des crevettes stressées.

Les résultats obtenus montrent que l'hypoxie est un facteur d'affaiblissement des défenses des crevettes et en outre la résistance à la vibriose est moindre.

La température

La température est un paramètre essentiel dans le diagnostic du syndrome 93. En effet le principal pic de mortalité observé en Nouvelle Calédonie se situe après une importante diminution des températures entre Avril et Mai passant ainsi de 27 à 19°C. L'outil expérimental mis au point par l'écophysiologie est utilisé pour tester les effets d'une chute de température de 26 à 17°C pendant 40 heures.

Les résultats montrent que la chute de température entraîne une modification significative des paramètres hématologiques. Les hémocytes totaux baissent de 25 à 35% selon la série expérimentale. Le nombre de cellules à grands granules contenant le système prophénoloxydase diminue aussi de 35%.

L'activité de la phénoloxydase ne varie pas de façon significative. La combinaison de deux facteurs peuvent expliquer cet état. La chute de hémocytes totaux entraîne habituellement une augmentation de l'activité de cette enzyme car les inhibiteurs du système prophénoloxydase d'origine hémocytaire disparaissent avec les hémocytes. La chute de la température a provoqué une baisse significative du nombre des hémocytes contenant le système prophénoloxydase, la quantité d'enzyme devient moins abondante. En résumé : moins d'inhibiteurs du système enzymatique accompagné de moins d'enzyme entraîne une activité qui ne varie pas dans notre modèle expérimental.

La capacité de phagocytose baisse aussi avec la chute de la température. L'activité de base de productions d'ions superoxydes par les hémocytes ne varie pas avec la température mais les hémocytes stimulés avec du zymosan sont significativement moins actifs chez les crevettes ayant subi le stress à 17°C que chez les crevettes témoins. Cette baisse d'activité est de l'ordre de 35%.

L'étude des effets de la température doit être complétée par des tests d'exposition à long terme pour rechercher un éventuel effet d'adaptation, d'autre part il convient de faire des infections expérimentales avec *V. penaeicida* qui compléteront ainsi les résultats acquis au niveau immunologique.

Application au testage d'immunostimulants (E33003)

La collaboration avec la Société INVE a été poursuivie cette année. L'objectif était de tester peu de substances immunostimulantes, mais sur un grand nombre de série expérimentale au COP et de faire des tests en Nouvelle-Calédonie en période d'expression du syndrome. La société INVE a fourni deux substances à caractère immunostimulant, les réactifs et a pris en charge les frais de déplacement France-Taïti et Tahiti-Nouvelle-Calédonie.

Ces substances ont été caractérisées au COP par un série de tests *in vitro*. Puis 5 séries expérimentales ont été réalisées. Les immunostimulants, incorporés dans l'aliment à raison de 1%, sont administrés par voie orale pendant une période de 20 jours à l'issue de laquelle un bilan immunitaire est fait ainsi que des infections expérimentales. Ces tests ont été réalisés en juin, juillet, octobre, novembre et décembre. Les tests pratiqués en Nouvelle Calédonie en Aout et en Septembre ont été réalisés selon 2 protocoles différents. Le premier protocole prévoit que les animaux sont "stimulés" en bassin béton pendant 20 jours puis un bilan hématologique est fait ainsi que de tests de survie en cage. Les cages sont posées au fond de bassin d'élevage dans des zones caractérisées physico-chimiquement. Le second protocole prévoit le placement des crevettes dans des grandes cages placées directement dans un bassin d'élevage. Les crevettes sont "stimulées" pendant une période de 20 jours. Les résultats sont obtenus en terme de bilan hématologique et de survie.

Les résultats n'ont pas été à la hauteur des moyens mis en oeuvre. Il n'est pas apparu que les crevettes immunostimulées aient leurs défenses améliorées ni même une meilleure résistance des crevettes à l'infection par *V. penaeicida*. Les conditions d'expérimentation en Nouvelle Calédonie étaient délicates du fait d'une extrême fragilité des animaux. Cependant les conditions étaient réunies puisque les températures matinales étaient inférieures à 19°C et l'agent causal de la maladie était présent. Des tests de détection en PCR ont montré la présence de *V. penaeicida* chez les crevettes moribondes et les mortes.

L'approche utilisée pour tester les effets des immunostimulants chez les crevettes a montré ses limites. Il subsiste des doutes sur l'efficacité de l'immunostimulant : le taux d'incorporation de 1% dans l'aliment est-il suffisant, les molécules immunostimulantes sont-elles assimilées ? Une nouvelle démarche est envisageable. Le screening des substances devrait être fait à l'aide des tests *in vitro* qui permettent de mesurer l'effet de ces substances directement sur les hémocytes et éliminer celles qui ne stimulent pas les cellules. Puis les substances retenues sont injectées à des crevettes. Quelques heures plus tard, un bilan immunitaire est fait, ces crevettes peuvent aussi être soumises à une infection. Cette approche permettrait un screening rapide et peu coûteux des substances immunostimulantes mais n'est pas suffisante puisque l'étape finale est le traitement par voie orale. A ce niveau, il faut s'assurer de l'assimilation des molécules immunostimulantes, au besoin par un marquage radioactif en présence ou non d'adjuvant, puis procéder à une étude *in vivo* en dose-effet.

Application à la sélection génétique

Sélection familiale

La maîtrise du modèle infectieux *V. penaeicida*-SPR43 (standardisation du protocole expérimental, reproductibilité des infections) nous a conduit à tenter de sélectionner des familles fournies par l'équipe de génétique sur des critères de résistance à l'infection contrôlée par *V. Peaneicida* (AM101) et de mesures des paramètres immunitaires telles l'activité antimicrobienne plasmatique.

Une série de tests familiaux a été réalisée en début d'année. Les paramètres mesurés étaient les hémocytes totaux, la phénoloxydase et la résistance à l'infection. Huit familles sont testées au niveau immunitaire, 4 séries d'infection ont été réalisées. Il n'est pas apparu de différences significatives entre les familles pour ces paramètres.

Pourcentages de survies (J5) des familles de crevettes SPR43 à l'infection expérimentale par banéation réalisée avec AM101 (AM101 à 5.10 E(4)/ml)

Dénomination des familles

Marquage des familles	10 R	10 J	10 O	10 V	16 R	16 J	16 O	16	17 R	17 J	17 O	17 V
idem	10 22 rouge	10 21 jaune	10 11 orange	10 12 verte	16 51 rouge	16 52 jaune	16 62 orange	16 61 vert	17 71 rouge	17 72 jaune	17 31 orange	17 32 vert

Dates d'infections et % de survies à l'infection (l'effectif par bac ou famille testée est d'environ 20 crevettes *P stylirostris* d'environ 15 g)

28 10 97	61	95	64,7	78	65	45	60	58	74	74	79	73,7
11 11 97	58	60	57,9	75	94	90	74	67	86	78	94	77,8
27 11 97	52	50	58,8	61	29	63	67	41	85	79	32	78,3

Les résultats font apparaître une grande disparité des niveaux de résistance à l'infection selon les familles considérées. Des infections itératives pratiquées sur les mêmes familles ne permettent cependant pas de sélectionner les familles selon leur niveau de résistance/sensibilité puisque les % de survies intrafamiliaux varient grandement d'une infection à l'autre.

Il semble à la lumière de ces premiers résultats que l'effectif de 20 crevettes soit trop faible pour être en mesure de dégager une quelconque résistance associée à des familles génétiques. Le fait que l'on obtienne des % de survies très différents d'une famille à l'autre souligne cependant des différences interfamiliales significatives dans les niveaux de résistance/sensibilité qu'un éventuel effet bac ne peut expliquer puisque dans la pratique courante des infections expérimentales sur population « hétérogène » de SPR43 nous n'avons jamais pu mettre en évidence de différences attribuées aux bacs (χ^2). Il est probable que les variations intrafamiliales des % de survies à l'infection selon les dates d'infections puissent refléter des changements physiologiques tels le pourcentage d'animaux en stade d'intermue, les animaux n'ayant pas été au préalable triés selon ce critère.

Sélection sur lignées divergentes

Un bilan immunitaire des lignées divergentes en sélection par la croissance haute (Rouge) et basse (Jaune) ne montre pas de différences entre les moyennes des paramètres testés: hémocytes totaux, activité phénoloxydase, burst respiratoire. En outre, l'analyse des résultats de survie à l'infection par balnéation des crevettes avec *V. penaeicida* révèle aucune différence significative dans les niveaux de résistance à l'infection des deux lignées.

Perspectives

Suivi sanitaire et diagnostic des pathogène :

Mise au point de techniques de diagnostic et application à l'épidémiologie des vibrions

- Mise au point du test de diagnostic par PCR de *V. penaeicida* au traitement des boues de bassins.
- Développement d'une sonde froide spécifique de *V. penaeicida* pour des études qualitatives menées conjointement avec l'équipe de pathologie IFREMERienne de Nouvelle Calédonie (Cyrille Goarant) : analyse d'écologie bactérienne associée aux différents compartiments et étude des conditions favorisant la survenue du syndrome 93.
- Clonage et mise au point d'un test de diagnostic sur *V. harveyi* (S2 ou E22) bactérie pathogène isolée dans les élevages larvaires en Equateur et *V. alginolyticus* (souches équatoriennes) afin d'évaluer notamment le pouvoir probiotique de cette bactérie et les conditions optimales d'utilisation en élevage larvaire.

Etude de la pathogénicité de *V. penaeicida* et des voies d'entrée de ce vibrio par un suivi d'infection réalisé par histologie et PCR in situ

Production de nouveaux outils biologiques d'analyse

- Mise au point de la technique d'étude des gènes différentiellement exprimés pour la recherche de gènes précoces inductibles en réponse à des agresseurs divers : stress environnementaux et infections par des pathogènes et mise au point de sondes moléculaires.
- Production d'anticorps de lapin pour les besoins en immunologie et diagnostic (immunohistologie) via la construction d'une animalerie.

Caractérisation des souches de crevettes (conservatoire à *P. stylirostris/P. vannamei/P. monodon/P. indicus*) élevées au COP dans le cadre de leur valorisation

- Du point de vue immunologique : détermination des valeurs normales des paramètres immunitaires.
- Du point de vue de leur résistance aux pathogènes (SPR43 et *P. vannamei*) : Vibrio et virus d'intérêts épidémiologiques majeurs (TSV, IHNV, YHV).

Etude des interactions crevettes-pathogènes

Recherche de corrélations positives pouvant exister entre niveaux immunitaires et résistance à l'infection expérimentale des crevettes comme futurs outils de sélection génétique.

Recherche (purification) de peptides antimicrobiens produits chez *P. stylirostris* en réponse à une stimulation (bactéries préalablement tuées) et infection naturelle (baignade) par *V. penaeicida*.

Etude des interactions crevettes-milieu

Relation stress-calcémie-immunité : rôle du calcium sur l'activité de la phénoloxydase.

Température : adaptation à long terme.

Collaborations

- Avec partenaires INCO, DRIM et IBMC de Strasbourg notamment.
- Université Française du Pacifique.
- Station d'Aquaculture de St Vincent.
- Université d'Arizona.

DOMESTICATION ET AMELIORATION GENETIQUE

Projet E11003 : Crevette/Physiologie de la Reproduction

Projet E22003 : Crevette/Optimisation des filières de Production

Projet E42003 : Crevette/Amélioration et Sélection des Souches

Projet E41003 : Crevette/Ressources Génétiques

Rappel des objectifs

Le programme d'amélioration génétique a pour objectif la caractérisation génétique des souches domestiquées du COP, et leur utilisation à des fins de création de lignées améliorées. La souche de *P. stylirostris*, dite SPR43, qui s'est avérée résistante au virus IHNV, a focalisé le programme sur cette espèce, et sur l'amélioration de cette souche particulière.

L'aspect domestication, compris dans le sens d'une maîtrise parfaite de la reproduction en captivité d'une part, et de la sélection d'animaux adaptés aux conditions d'élevage d'autre part, est une partie essentielle du programme, sur laquelle se base la recherche de caractères améliorés.

C'est pour cette raison que l'on a souhaité regrouper dans cette partie les résultats ayant trait à la maîtrise de la reproduction dans ses aspects physiologiques (développement des gonades, cryoconservation) et zootechniques avec les résultats de sélection et caractérisation des souches.

Le programme s'est doté en 1997 d'installations nécessaires au bon déroulement des expérimentations : une **zone de testage** constituée de 24 bassins de 30m³ destinés à l'élevage des différents lots génétiques produits par l'écloserie a été mise en service au cours du premier trimestre. A cet ensemble s'ajoute une zone de 12 bassins du même type réservés à la production de reproducteurs selon la filière intensive. Le maintien des lots de manière séparée pendant le premier mois de grossissement est désormais maîtrisé de manière suffisamment fiable pour être opérationnel sur une base de routine : cette phase utilise des bassins de testage équipés pour recevoir des cages, ce qui permet d'amener les animaux à une taille compatible avec un marquage. Le marquage familial par injection d'élastomère colorée est maintenant utilisé sur une base routinière.

La construction d'une **salle de quarantaine** autorisant l'importation de populations extérieures a également été initiée au cours de l'année 1997. Cette salle doit permettre l'importation de populations sauvages ou domestiquées destinée aussi bien à s'approvisionner en animaux témoins pour le programme de résistance aux maladies, qu'à introduire dans les populations du

COP une variabilité génétique supplémentaire. Elle est prévue pour être opérationnelle au cours du premier semestre 1998.

Travaux réalisés et principaux résultats

Physiologie de la croissance et de la reproduction (E11003) et Optimisation des filières de production (E22003)

Filières Géniteurs

Les filières extensif-intensif et intensif continuent à être employées avec de très bons résultats pour les croissances, les survies (hors disparitions régulières par vol) et la qualité des animaux. L'apparition de pontes sauvages aussi bien en bassin terre qu'en bacs scobalit vient confirmer ces résultats. Les protocoles utilisés demandent cependant un suivi strict des densités, de l'alimentation, de la qualité du milieu et un ou plusieurs tris des animaux lors des transferts. Les expériences ont porté sur les effets des fortes températures et de la filière d'élevage sur la qualité des géniteurs.

Mâles : malformation des spermiductes

Cette malformation se caractérise par une hypertrophie du spermiducte et plus particulièrement de sa partie terminale. Les spermatophores deviennent secs et inutilisables pour les fécondations, et le phénomène est irréversible. Cette malformation, très rare il y a quelques années, peut toucher jusqu'à 50% des mâles de *P. stylirostris*. Elle est visible à partir de la puberté, entre 15 et 20g, et se traduit par un blanchiment du canal déférent visible à travers la cuticule.

Le même type de malformation existe, bien que très rarement, chez *P. vannamei*, et il se traduit toujours par une nécrose de l'ampoule terminale.

Afin d'étudier l'évolution du phénomène dans le temps et l'influence de la température et du milieu d'élevage, un même lot de post-larves a été élevé en parallèle, en bac scobalit ombragé sur toute la durée de l'élevage d'une part; en bassin terre d'autre part. Des transferts échelonnés du bassin terre vers des bacs scobalit ombragés ont été effectués à 5g, 10g et 15g, afin de déterminer l'incidence de la durée d'élevage en bassin terre sur l'apparition de la malformation. Afin de tester l'hypothèse de l'origine génétique, 13 familles de demi-frères du même lot de post-larves ont par ailleurs été élevées en bacs.

Les élevages se sont déroulés en saison fraîche et en intersaison, et les différences de températures moyennes entre le lot 100% scobalit et les autres lots n'ont pas dépassé 1,5°C. Les mâles de tous les lots ont présenté des malformations (figure 1), avec un pourcentage plus important (17 et 32%) pour les animaux ayant séjourné en bassin terre. Les faibles écarts de températures entre les deux filières ont peut-être masqué les différences. Dans ces conditions, la température n'est pas le facteur initial déclenchant la malformation (tout au moins à des températures supérieures à 25°C) mais qu'elle en favorise l'apparition.

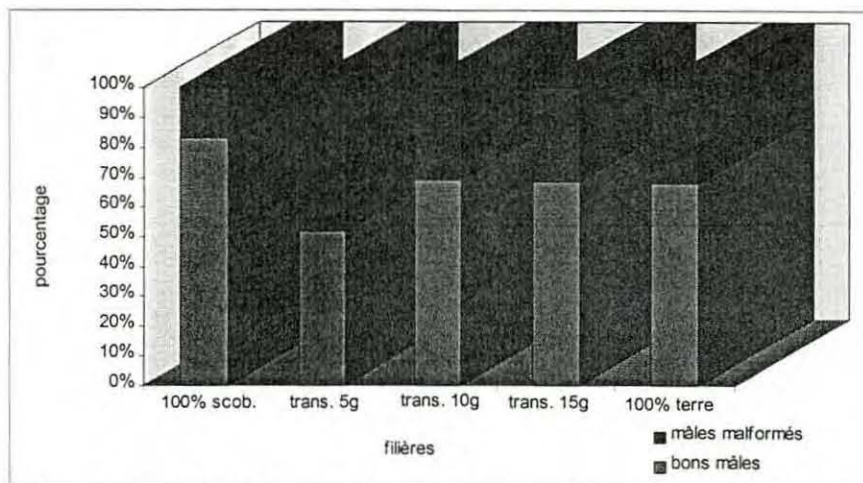


Figure 1: Comparaison de la qualité des mâles des différents lots 9701 en fin d'élevage.

Le milieu d'élevage a pu également avoir une action sur l'apparition des malformations. Cette action serait alors principalement à mettre sur le compte de la nature du fond (*a priori* plus "sale" dans le bassin terre) qui, au même titre que la température, favoriserait l'apparition des malformations mais ne les déclencherait pas. La durée de la phase d'élevage en bassin terre ne paraît pas avoir d'influence sur le phénomène.

D'autres facteurs, telles que la densité (plus faible en bassin terre) ou l'alimentation (la même dans tous les élevages) n'ont probablement pas d'influence sur l'incidence des malformations.

La comparaison du pourcentage de malformations des différentes familles montre relativement peu de variations : on remarque cependant que 3 familles ont moins de 10% de mâles malformés et que 2 d'entre elles ont 32 et 45% de malformations alors qu'elles ont toutes été élevées dans des conditions identiques (figure 2).

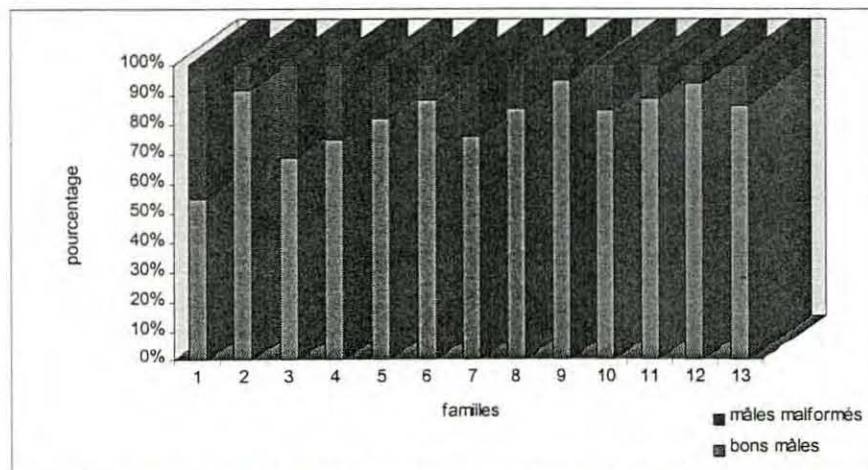


Figure 2: Comparaison de la qualité des mâles des différentes familles du lot "100 % scobalit"

Il semblerait donc que si les fortes températures et la nature du fond augmentent le pourcentage de malformations, ces facteurs ne feraient qu'accroître une situation déjà existante. L'hypothèse la plus probable serait alors celle d'une malformation d'origine génétique. Des observations sur d'autres familles en élevage vont être faites afin de confirmer ces premiers résultats. Une étude histologique est également en cours sur des animaux de différentes tailles pour essayer de déterminer les mécanismes de cette malformation.

Femelles : vitellogénèse et ecdystéroïdes

Une étude associant l'histologie et le dosage des ecdystéroïdes dans l'ovaire a été initiée afin d'étudier les effets de la filière d'élevage et des fortes températures sur la vitellogénèse secondaire.

L'étude histologique a permis de décrire l'évolution de l'ovaire au cours de la croissance. Le développement des ovocytes est homogène dans tout l'ovaire. L'évolution du développement de l'ovaire est identique à celle d'autres espèces de pénéides mais la taille des ovocytes est légèrement inférieure.

Il n'existe aucune corrélation entre les teneurs en ecdystéroïdes dans l'hémolymphe et l'ovaire. Les teneurs en ecdystéroïdes les plus élevées sont obtenues pour des valeurs de RGS entre 1,6 et 2. Les observations histologiques montrent que les femelles sont alors en fin de vitellogénèse primaire ou en début de vitellogénèse secondaire, c'est-à-dire en début de maturation. Cette étape correspond à la folliculogénèse des ovocytes. Ceci laisse supposer que les ecdystéroïdes ovariens sont liés à cette étape de l'ovogenèse. Le taux diminue ensuite au fur et à mesure que le RGS augmente et ce, jusqu'à la ponte. Un schéma hypothétique de l'action des cellules folliculaires et des ecdystéroïdes sur l'entrée en vitellogénèse secondaire serait le suivant :

- les cellules folliculaires en cours de multiplication et de migration produiraient des ecdystéroïdes;
- ceux-ci favoriseraient la synthèse des réserves endogènes des ovocytes ;
- la taille des ovocytes augmenterait jusqu'à atteindre un diamètre leur permettant de folliculer et donc de rentrer en vitellogénèse secondaire.

Lorsque l'on compare les femelles ayant subi de fortes températures durant leur élevage avec celles élevées en bac ombragé, on constate que la taille des ovocytes folliculés des premières est légèrement plus faible et surtout que l'entrée en vitellogénèse secondaire est moins homogène. Il a été également observé que chez certaines femelles provenant de "bassins chauds", la vitellogénèse secondaire débute même si les taux d'ecdystéroïdes sont faibles au moment de la formation des follicules autour des ovocytes, et ce pour des ovocytes de diamètre relativement faible. Ceci voudrait dire que la crevette favorise le déroulement de la vitellogénèse secondaire aux dépens de la qualité des ovocytes et expliquerait pourquoi les pontes de saison chaude sont presque toujours de mauvaise qualité.

Ces premiers résultats sont à confirmer par d'autres expérimentations et à compléter par des études sur la caractérisation de la méiose et les facteurs régulateurs de la vitellogénèse secondaire.

Reproduction

Les géniteurs utilisés proviennent principalement des élevages expérimentaux et sont élevés suivant la filière intensive. Tous les mâles sont stockés en zone de maturation et conditionnés, avant leur utilisation, dans les bacs d'eau refroidie à 25°C. Les tris successifs durant l'élevage ont permis d'éliminer les mâles de mauvaise qualité et une seule production a nécessité l'utilisation du protocole de préparation des mâles (épédonculation + déspermation + régénération des spermatophores en eau refroidie) mis au point l'année dernière.

La technique permettant d'obtenir des mâles de bonne qualité étant appliquée, des expériences sont prévues en relation avec l'étude de l'ovogenèse afin de permettre l'amélioration de taux d'éclosion. En effet, même si les performances de ponte ont été améliorées par rapport aux lots antérieurs, principalement pour le nombre d'oeufs moyen par ponte et les taux de fécondation, les taux d'éclosion restent encore relativement faibles.

Objectifs	Nb de femelles	Moyenne d'oeufs/ponte	Nb de mâles/femelle	Taux moyen de fécondation	Taux moyen d'éclosion
familles 9701	18	249.000	1/2	48	42
familles 9705	18	252.000	1/2	55	38
familles 9711	16	219.000	1/2	42	24
sélection PROSPER	55	232.000	2/1	52	53
sélection divergente	20	262.000	2/1	71	21
queues vertes	13	218.000	1/1	54	52
Mexique	16	285.000	1/2	63	47
Mexique	5	278.000	1/1	37	31
Test fécondation	12	332.000	1/3	21	40
COP	17	260.000	2/1	67	45

Elevage larvaire

Le même protocole d'élevage larvaire redéfini en 96 a été utilisé en 97. La phase larvaire est suivie d'un stockage en écloserie, de durée variable selon la destination finale des post-larves. Tous les élevages ont été faits sur *Penaeus stylirostris*, espèce cible du programme génétique. Deux stratégies d'élevage sont utilisées, selon l'objectif final, production de familles ou autre. Pour la production de familles, les larves sont élevées séparément par familles de demi-frères paternels. Dans ce cas, les familles font l'objet d'un stockage jusqu'à P25 en écloserie permettant d'atteindre un Pm de 15 mg, compatible avec la mise en paniers pour la phase de prégrossissement. La perte d'une famille entraîne automatiquement l'élimination des demi-frères correspondants devenus inutiles pour l'analyse génétique. Contrairement à 96, toutes les familles à effectif suffisant ont été conservées. Ainsi, sur les trois élevages, nous avons pu obtenir jusqu'à 16 familles. La durée totale des élevages est en progression de 12 jours par rapport à 96, 195 contre 183 jours.

Elevage	Dates	Objectifs	Age à la pêche	% survie	Nb PL/litre	% survie à P25	Nb de familles
97/01	11/02 au 17/03	familles série 4	P7	49,5	43	*	13
97/02	12/04 au 5/05	sélection PROSPER	P3	30,7	12		
97/03	29/05 au 4/07	familles série 5 expédition Mexique	P5	52,4	58	47.5	16
97/04	9/09 au 2/10	sélection divergente	P12	44	43		
97/05	18/09 au 31/10	queues vertes	P4	44.7	49	28.8	
97/06	13/11 au 18/12	familles série 6	P7	102	104	29	16

* : pas de comptage total en fin de stockage

Le fait de conserver le plus grand nombre de familles ne présente pas de difficultés particulières, si ce n'est l'augmentation de la charge de travail non seulement à l'écloserie, mais aussi dans le suivi ultérieur. Aucune mortalité n'est venue perturber le bon déroulement des élevages.

Prégrossissement

Deux bacs supplémentaires scobalit 30 m³ ont été équipés afin de recevoir des paniers de prégrossissement. Le dispositif permet maintenant d'élever simultanément 18 familles avec des répliqués ou 32 sans répliqués.

N° élevage		Valeurs mini.	Valeurs maxi.	Valeurs moy.
9711df 16 familles - 32 paniers	survie à P75	41	100	61,7
	pm à P75	0,95	2,23	1,52
9710qv 11 lots - 27 paniers	survie à P80	43,3	87,4	63,6
	pm à P80	0,4	2,04	0,81
9706sd 4 lots - 4 bacs	survie à P60	0,68	0,76	0,73
	pm à P60	2,39	2,68	2,46
9701df * 8 familles - 16 paniers	survie à P90	24,3	49,5	33,1
	pm à P90	0,69	1,5	0,92
9702-3-4pro ** 13 lots - 13 bacs	survie à P90	0,07	0,42	0,24
	pm à P90	0,65	2,99	1,98
9705df ** 16 familles - 32 paniers	survie à P106	9,1	100	43,3
	pm à P106	0,96	2,62	1,67

* élevage affecté par la qualité de l'aliment

** élevages affectés par des températures basses

Les différents prégrossissements réalisés cette année aussi bien en paniers qu'en bacs ont montré que pour obtenir de bonnes survies et croissances, et limiter la dispersion des tailles, plusieurs conditions devaient être remplies :

* une température d'au moins 26°C, ce qui implique que l'on travaille sans toile d'ombrage. Les températures plus fraîches non seulement ralentissent la croissance, mais sont en plus particulièrement néfastes pour les survies des élevages en bacs qui sontensemencés avec des PL 10-12 (PL 25 pour les paniers). De plus, une croissance rapide diminue la dispersion des tailles.

* une alimentation adaptée quant à :

- la qualité nutritionnelle. L'utilisation de l'aliment J1 a été abandonnée au profit du Mocal.

- la taille des particules. L'élevage est commencé avec un mélange de particules de Mocal $\leq 300\mu$, puis se poursuit avec la distribution de Mocal broyé avec un mélange de particules $\leq 800\mu$. Le Mocal de 800μ est éventuellement employé en fin d'élevage. Tant que l'on distribue du Mocal $\leq 300\mu$ dans les paniers, on n'utilise pas d'aération à l'intérieur des paniers ceci afin d'éviter la dispersion de l'aliment vers l'extérieur. L'aération interne aux paniers commence avec le Mocal 800μ .

- la quantité distribuée. L'aliment ne doit pas être rationné en début d'élevage quand on utilise le mélange de Mocal $\leq 300\mu$. Le risque de pollution des paniers et des bacs est inexistant vu la très petite taille des particules et l'on assure ainsi la disponibilité de l'aliment. Par contre, dès l'utilisation des plus grosses particules, les rations doivent être ajustées à la consommation afin de ne pas polluer les enceintes d'élevage.

- la fréquence des distributions. Le minimum est de 3 distributions par jour. Il est probable que des distributions plus fréquentes, principalement la nuit, amélioreraient encore les résultats actuels.

* la qualité et la stabilité des blooms phytoplanctoniques. Les blooms de couleur brune semblent préférables pour la croissance à ceux de couleur verte, même s'ils sont plus difficiles à maintenir. La stabilité des blooms évite le développement trop important d'algues filamenteuses et facilite l'entretien des enceintes d'élevages. Avec l'expérience acquise au cours des dernières années, les élevages en eau claire pourraient être envisagés afin de mieux standardiser les conditions d'élevage ; mais les structures d'élevage actuelles ne sont pas adaptées.

* un suiivi zootechnique très rigoureux avec notamment un nettoyage régulier des parois des paniers et le siphonnage des fonds de paniers et de bacs. L'utilisation d'air-lifts à la place de l'aération centrale dans deux des bacs contenant des paniers n'a pas donné de meilleurs

résultats quant à la survie ou la croissance des animaux ; cependant, ils semblent favoriser la stabilité des blooms. Des modifications sont prévues afin de faciliter l'entretien et le changement des paniers en cours d'élevage.

Elevages expérimentaux

Le prégrossissement en paniers ou en bacs suivi du marquage des familles ou des lots fait maintenant partie de la routine des élevages expérimentaux. Cependant les mauvaises survies enregistrées pour certains élevages montrent bien à quel point, tout comme pour les prégrossissements, il est nécessaire d'avoir un suivi zootechnique très rigoureux. Les mortalités de cette année ont frappé les débuts d'élevage, à un poids de 1 à 2g, après le marquage ou après la mise en élevage d'animaux prégrossis mais non marqués. Comme en prégrossissement, on peut identifier trois facteurs dont les effets se cumulent :

* un aliment non adapté : les animaux récemment marqués, d'un poids moyen de 1 à 2g, étaient nourris sur un aliment de transition, le J1. Cet aliment, bien que d'une granulométrie adaptée, était mal consommé et a entraîné de fortes mortalités chroniques. La substitution du J1 par du Mocal (utilisé pour le prégrossissement) de même granulométrie a résolu ce problème.

* une température trop fraîche : d'une manière générale, dans les élevages en bacs, les températures inférieures à 26°C diminuent la prise de nourriture et ralentissent la croissance. Ce facteur, rajouté à celui de la qualité de l'aliment, favorise la dispersion des tailles et le cannibalisme. Des élevages avec le bon aliment et des températures >26°C ont donné de bonnes survies mais ont surtout montré que la dispersion des tailles à l'intérieur d'une population était une conséquence des plus ou moins bonnes conditions d'élevage et non une caractéristique génétique. Dorénavant, et avec la disponibilité du matériel, les toiles d'ombrage de 35% seront utilisées en saison chaude pour limiter les trop fortes températures à la place des toiles de 65%, et ces toiles seront enlevées en saison fraîche pour essayer de maintenir une température de l'eau >26°C.

* un suivi inadéquat ou insuffisant de l'élevage : le fait de travailler avec des blooms phytoplanctoniques (on ne peut pas travailler en eau claire en extérieur) empêche de suivre facilement la consommation des aliments, l'accumulation de déchets, le développement des algues benthiques ou des mortalités chroniques. Le respect d'un protocole unique pour tous les bacs a rapidement montré ses limites, chaque bac évoluant différemment sans raison apparente. Le suivi des bacs doit donc être personnalisé. Seul un siphonnage régulier des bacs, au moins 2 fois par semaine, permet de se rendre compte de l'état du bac; le diagnostic doit être confirmé, au moins une fois par semaine, par une inspection à l'intérieur du bac lors du changement des tuyaux centraux. Ces actions sont complétées par l'observation au jour le jour de l'évolution des milieux. Cependant, la rotation du personnel (congés, maladie, récupération, mission), les nombreuses tâches d'entretien (nettoyage) et le suivi des élevages (transferts, marquages, échantillonnages, archivage des données) ne permettent pas toujours d'être aussi vigilants qu'on le voudrait.

Remarque importante : La gestion de 36 bacs implique une logistique importante et un matériel spécifique et encombrant. L'équipe zootechnique ne dispose actuellement que d'un petit local pour stocker les aliments et remplir les fiches journalières. Le matériel est stocké de droite et de gauche et tous les documents de travail sont à l'autre bout du Centre. Cette dispersion se ressent au niveau de l'efficacité du travail, surtout quand on considère la complexité du suivi des élevages. Il est devenu indispensable qu'une zone soit aménagée, sur le site même des élevages, afin de pouvoir travailler de manière efficace. Une proposition a été faite pour un ensemble comprenant un local de stockage, une pièce humide et une pièce sèche, un bureau et des sanitaires.

Cryoconservation

L'objectif du programme est de mettre en place des techniques permettant la cryoconservation des produits sexuels et des embryons de crustacés, en vue d'une utilisation à un niveau production ou de la constitution de conservatoire de souches.

Spécificités du modèle

Les particularités physiologiques des crevettes pénéïdes rendent ce modèle très difficile . En effet, le sperme des pénéïdes a, par rapport aux espèces généralement étudiées en cryoconservation, les caractéristiques suivantes :

- le sperme n'est pas liquide, et se présente sous forme d'un « gel » contenant les spermatozoïdes : il faut donc, au niveau des cryoprotecteurs, se positionner en protecteur des spermatozoïdes, mais aussi du gel.
- les spermatozoïdes ne sont pas motiles : ils sont de morphologie classique, mais leur flagelle appelé « spike », n'est pas mobile : de ce fait, toutes les recherches qualitatives classiques basées sur la motilité des spermatozoïdes ne sont donc pas utilisables dans notre cas : d'où, recherche d'un test qualitatif adapté à notre modèle.
- la « boule de sperme », le « gel », a des propriétés de fixation, appelées « pouvoir collant » : ces propriétés doivent être conservées pour permettre le positionnement manuel de la boule de sperme sous la femelle.
- La fécondation est provoquée par le passage au contact de la boule de sperme des ovules lors de leur expulsion par la femelle, la fécondation artificielle in vitro est impossible chez les pénéïdes.

Travaux réalisés - Principaux résultats 1997

L'année 1997 a été principalement consacrée à la poursuite des essais expérimentaux sur le sperme, et notamment sur l'adaptabilité au froid du sperme dans le cadre du programme génétique et la nécessité d'importer du « sangneuf » en limitant les risques pathologiques.

Ces essais se sont déroulés en deux phases :

En premier lieu, une mission en Nouvelle-Calédonie a permis d'effectuer un essai d'importation de sperme dans des conditions réelles de transport aérien, suivi d'essais de fécondations sur des femelles du COP. Par mesure de sécurité, la zone de quarantaine n'étant pas encore opérationnelle, les nauplii ont été éliminés après éclosion.

Une deuxième phase de travaux au laboratoire, réalisés avec la collaboration d'un stagiaire, reprenant les tests de conservation en milieu liquide, similaires aux conditions de transport avec in fine fécondation sur femelles. Les essais ont porté sur le milieu de conservation: eau de mer additionné ou non par un antibiotique, avec suivi de l'évolution qualitative du sperme au point de vue morphologique et pouvoir fécondant, et suivi de l'évolution du milieu: développement bactérien et évolution du pH.

De ces expériences, il ressort que (rapport en cours de rédaction) :

- la conservation doit se faire à partir de la boule de sperme seule, sans le spermatophore. Le milieu de conservation actuellement utilisé ne permet pas de conserver la boule de sperme à l'intérieur du spermatophore et donc après quelques jours, le mélange boule de sperme et matière collante est par trop indivisible.

- l'adaptation du sperme au froid à des températures positives de 4-7°C est excellente pour du sperme de qualité, et si la perte de spermatozoïdes quantitativement et qualitativement est variable, elle reste compatible avec des fécondations. Des fécondations sont obtenus avec production de nauplii après une période de 5-6 jours de conservation. Cette capacité actuelle de conservation permet d'envisager une introduction de sperme sur le Territoire, pour un apport de sang neuf en limitant les risques pathologiques et avec une assurance de production de nauplii certaine.

- le milieu de conservation est améliorable rapidement en ajoutant un stabilisateur de pH. La diminution des fécondations et donc du pouvoir fécondant lors des tests coïncide avec la baisse sensible du pH du milieu.

- les essais de comptage de spermatozoïdes avec la technique d'analyse d'image sont en cours de mise au point et devraient être finalisés avant la fin de l'année. Ceci devrait permettre une régularité dans les comptages et une lecture plus rapide des résultats, donc un gain de temps.

Pour essayer de contourner le problème « boule de sperme » et permettre une meilleure approche expérimentale dans la comparaison des milieux, des tests de congélation comparatifs entre le sperme en forme initiale « boule » et le sperme dilué après broyat au potter ont été réalisés, et les résultats sont en cours d'observation après décongélation.

Ces résultats ont montré une fois de plus que la qualité initiale du sperme était prépondérante dans le taux de réussite des fécondations après congélation.

En conclusion et perspectives :

Si les résultats comparatifs « boule » et sperme dilué sont positifs, il sera possible de commencer à modifier le milieu utilisé, (qui donne des résultats positifs mais uniquement en présence de sperme de très bonne qualité), pour essayer de travailler avec des spermatozoïdes de qualité moyenne,

- en renforçant le pouvoir protecteur du milieu actuel : ajout de cryoprotecteur externe pour améliorer la protection des membranes,
- en remplaçant le Glycerol par un cryoprotecteur moins toxique,
- en améliorant la pénétrabilité des cryoprotecteurs avec utilisation de substances perméabilisantes.

Les conditions de décongélation seront aussi comme prévu analysées pour vérifier l'impact de la décongélation sur les résultats obtenus.

Ces essais seront faits au préalable sur *P. indicus* (meilleure qualité de sperme), et transposés dès que possible sur les autres espèces.

On peut de plus poursuivre l'amélioration sensible de la technique actuelle, toujours à partir des mâles de *P. indicus*, pour tendre vers des survies quantitatives et qualitatives (taux de spz spikés) plus élevés en améliorant la qualité des mâles : meilleurs stocks en bassins, donc possibilité d'optimisation de la préparation en maturation (déspermation, épédonculation, température, salinité, alimentation),

L'adaptation du sperme au froid positif devra se poursuivre notamment en améliorant le milieu de conservation liquide (antifongiques, et autres).

Amélioration et sélection de souches (E42003)

Testage de la 3ème génération de sélection divergente pour la croissance

L'expérience de sélection divergente sur la croissance initiée en 1994 s'est poursuivie en 1997 avec le testage de la F3 et la constitution de la F4. Les résultats de la F3 confirment ceux obtenus précédemment, avec une poursuite de réponse en lignée basse SI ($h^2r = 0,25$), et une lignée haute SS dont les performances de croissance ne sont pas significativement différentes de la lignée témoin ST (figures 3a et 4). Cette réponse régulière de la lignée basse suggère le maintien d'une certaine variabilité génétique au sein de la population domestiquée. La constitution de la génération suivante a donc été effectuée dans le but d'une part de vérifier le comportement de la lignée SS, sa stagnation étant peu compatible avec l'hypothèse du maintien de cette variabilité; d'autre part de vérifier le comportement des animaux issus du croisement des deux lignées extrêmes. Le maintien de ces lignées sur une génération supplémentaire permettait de plus de disposer d'un matériel expérimental intéressant pour les programmes de biologie moléculaire et de pathologie.

La génération F4 a été produite en octobre 1997, avec les intensités de sélection du tableau suivant :

	Mâles SS	Femelles SS	Population SS	Mâles SI	Femelles SI	Population SI
Moyenne	46.52	55.45	50.98	25.4	30.30	28.67
DS	3.32	6.65	5.43	0.00	2.00	1.77
i	0.97	1.50	1.15	0.00	0.34	0.30

Les performances de la lignée basse SI en F3 ont abouti à l'obtention d'animaux de 330 jours dont le poids moyen était de 27g à l'entrée en maturation (contre 40g et 45g pour les lignées ST

et SS). Ce faible poids moyen de la lignée inférieure a rendu très difficile la reproduction de ces animaux, et impossible le maintien d'une différentielle de sélection compatible avec une pression de sélection notable.

Les performances mesurées en F4, montrent fin 1997 (à 114 jours) une réponse de la lignée haute avec un gain de +18% par rapport au témoin, alors que la lignée basse montre un déficit de -9%, en régression par rapport à celui de la génération F3 (figure 5). Cette perte de réponse en lignée basse est due à la difficulté zootechnique de reproduction de cette lignée. Les performances de la lignée croisée SC ne diffèrent pas significativement de celles des témoins ST, ce qui est logique du fait de l'identité de la population d'origine.

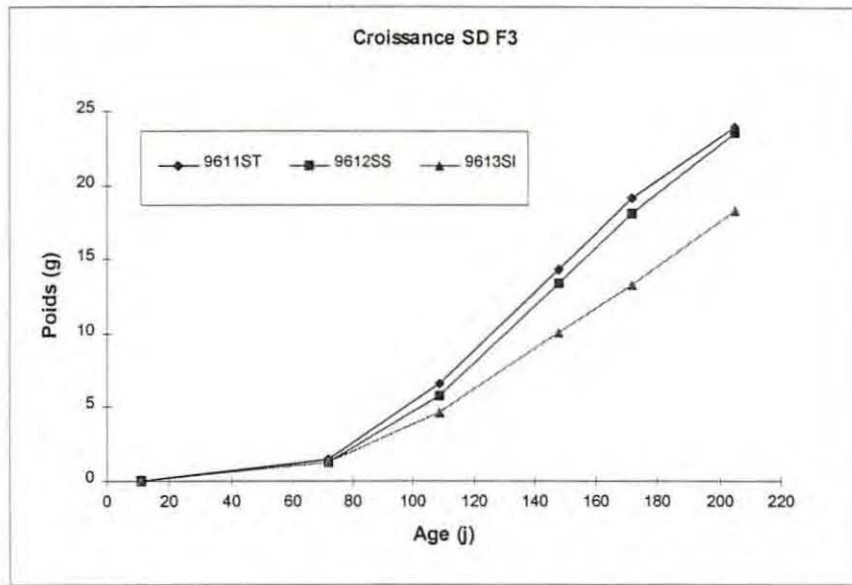


Figure 3a : Croissance des lignées divergentes en génération F3

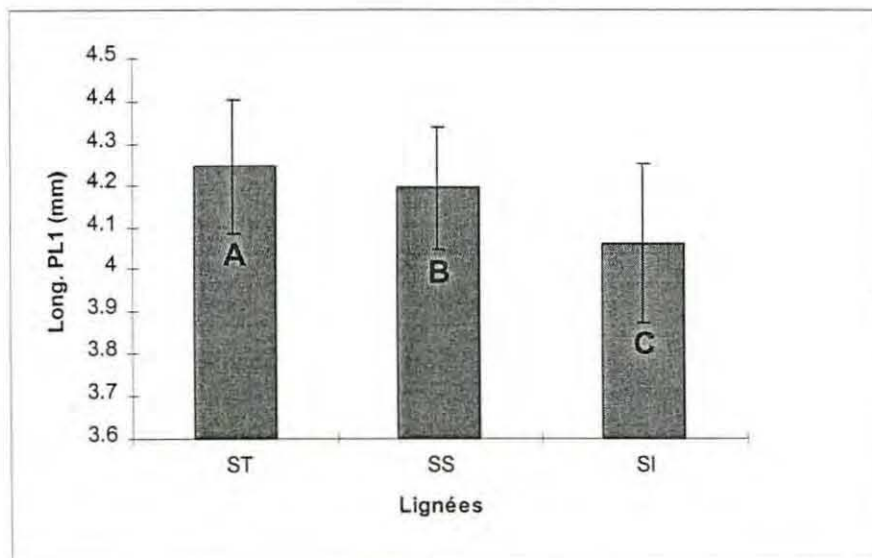


Figure 3b : Longueur des PL1 des lignées divergentes F3

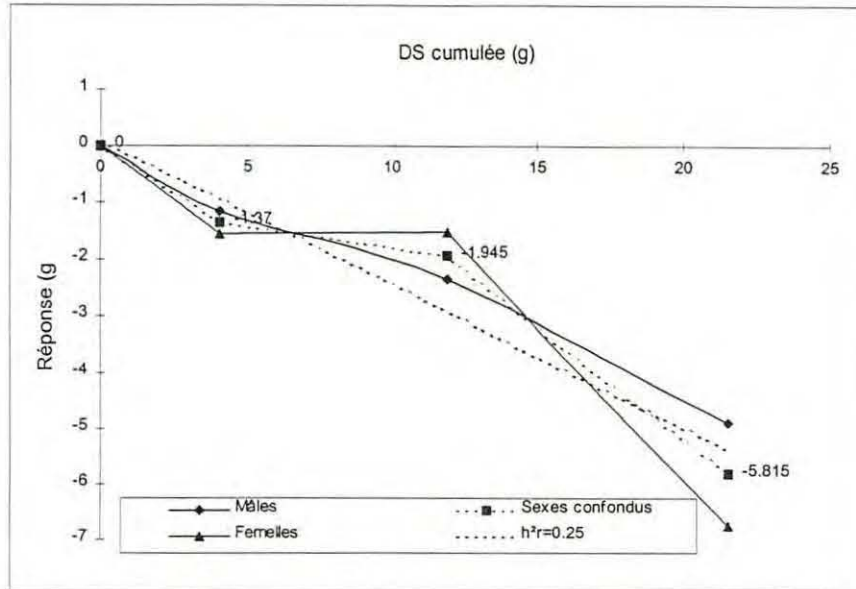


Figure 4 : Estimation de l'héritabilité réalisée en lignée basse après 3 générations de sélection

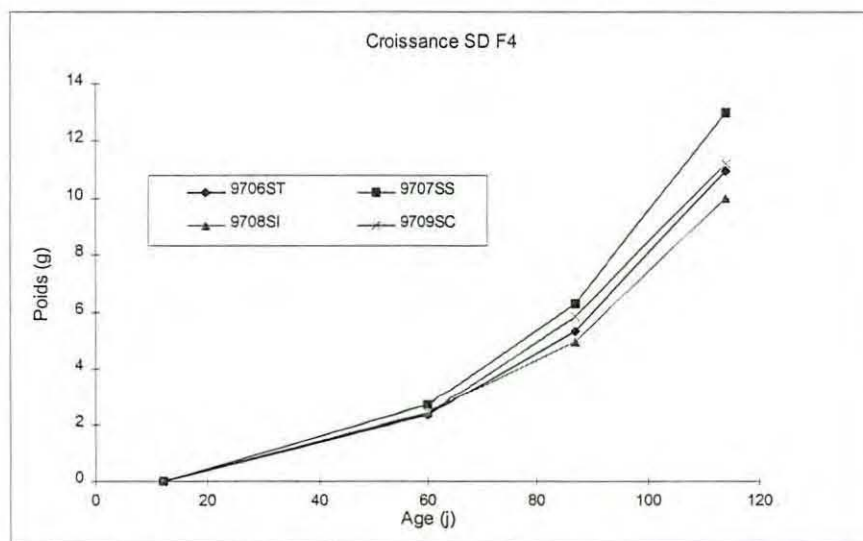


Figure 5: Croissance des lignées divergentes en génération F4

Les résultats de l'analyse de variance confirment que les populations divergentes sont significativement différentes du témoin.

Source	DF	F Value	Pr > F
Lignée	3	19,32	0,0001
Replicat	2	8,62	0,0002
Lignée*Replicat	6	0,38	0,8931

Lignée	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	N	Tests Duncan
SS	12,97	2,88	22,2	104	A
SC	11,22	3,50	31,2	105	B B
ST	10,96	2,54	23,2	105	B
SI	9,97	2,77	27,8	105	C

Si les performances de la lignée haute se confirment sur la durée du cycle, ce qui est probable, cela confirmera le maintien d'une variabilité génétique compatible avec une amélioration de la lignée domestiquée.

Estimation de l'héritabilité des stades précoces

Au sein d'une population, il existe une stabilité de la hiérarchie des performances individuelles, les individus à forte croissance précoce conservant cet avantage sur la durée de l'élevage. Par ailleurs, la hiérarchie entre performances précoces et tardives est conservée de manière inter-populations lorsqu'il s'agit de populations de caractéristiques différentes: les différences observées entre les lignées divergentes par exemple s'expriment dès le début de l'élevage. La mesure de la longueur des PL1 en sortie d'écloserie montre que sur ces lots, il existe une différence significative inter-lignées à ce stade, et que la hiérarchie qui s'exprime en élevage est respectée (figure 3b).

L'estimation de l'héritabilité de ces stades précoces est donc importante à vérifier, et des mesures systématiques de longueur de larves par analyse d'images ont été effectuées en sortie d'écloserie. Les valeurs sont en cours d'analyse.

Comparaison des testages communautaires et en isolement

Le problème principal auquel nous nous trouvons confrontés reste la minimisation de la variabilité environnementale. L'emploi des injections d'élastomère coloré permet de regrouper dans un seul bac de testage plusieurs groupes différents. Malheureusement le faible nombre de couleurs disponibles (4 + 1 "nulle" en 97), et la taille relativement petite (0,5g) à laquelle sont marqués les animaux limitent en pratique le nombre de groupes susceptibles d'être testés simultanément. La sélection divergente a donné l'occasion de comparer deux modes de testage: d'une part un testage communautaire dans lequel tous les groupes ont été regroupés en nombre égal après marquage; d'autre part un testage "en isolement" où chaque groupe a été élevé séparément, la présence d'une population extérieure et commune à tous les bacs de testage faisant office de témoin interne sensé refléter de la même manière que sur la population testée les variabilités environnementales. Dans ce cas, le témoin interne était représenté par la population croisée SC, dont les performances en communautaire étaient connues. La population témoin SC représentait 25% de la population totale de chaque bac.

Cette expérience permet également d'estimer (au biais du témoin interne près) si les performances mesurées sont effectivement des performances de croissance ou de compétition intergroupes.

Les croissances jusqu'à 114 jours, exprimées en différences par rapport au témoin interne, sont montrées sur les figures 6 et 7. La même évolution que celle exprimée en communautaire se retrouve en isolement, la population ST ne différant pas significativement du témoin interne, alors que les deux populations haute et basse montrent des différences significatives.

Les conclusions partielles sont d'une part que l'utilisation d'un témoin interne semble possible pour évaluer les performances de groupes d'animaux différents; et d'autre part que les performances mesurées correspondent bien à des performances de croissance.

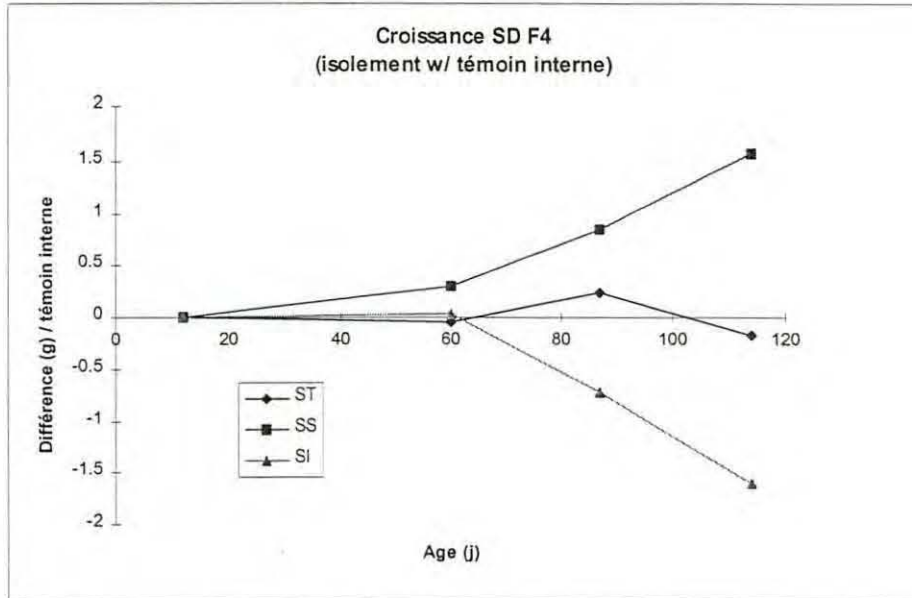


Figure 6 : Evolution des lignées divergentes, évaluée par un témoin interne

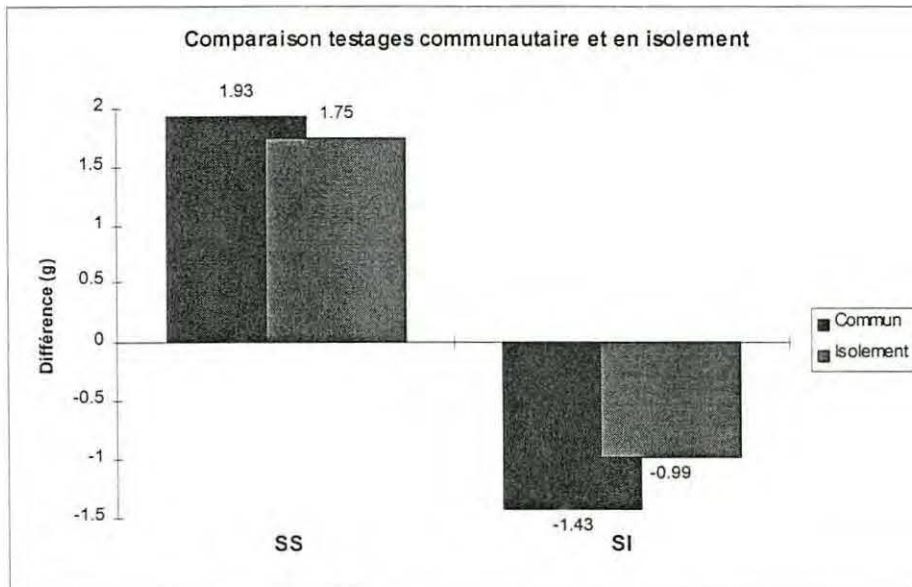


Figure 7 : Comparaison des testages communautaires et en isolement des lignées

Croisement intraspécifique

Dans le cadre d'une expérience de sélection de type PROSPER (stoppée par suite de mortalités survenues sur certains bassins), les croissances des deux populations tahitienne TT et néo-calédonienne CC, ainsi que de leur croisement TC, ont été suivies, les deux populations étant conservées séparément depuis l'introduction de la CC en 1993. Comme en 1996, le suivi a été effectué en bassins communautaires, dans lesquels chaque population, marquée par élastomère coloré, était représentée. Cette expérience est la 3ème série de ce type qui est suivie. Une première expérience, menée en 1995, sans utilisation de marqueurs, avait conclu à une supériorité du croisement sur les populations "pures". Cette supériorité ne s'était pas retrouvée lors de la 2ème série effectuée en 1996, avec cette fois utilisation des marqueurs colorés. Malgré la présence de replicats en 1995, la supériorité des hybrides avait donc été attribué à des effets environnementaux.

Les résultats de la 3ème série menée en 1997 confirment l'inexistence de vigueur hybride par croisement entre les lignées CC et TT, les performances des croisés n'étant pas significativement différentes de celles de la population TT. Ce résultat est somme toute logique compte tenu du peu d'éloignement entre les deux populations. La population TT s'avère cependant significativement plus performante que la population CC dans les conditions de l'expérience (fig. 8). Les mortalités survenues en cours d'année 1997 sur l'ensemble des élevages n'a pas permis de suivre les croissances au-delà de 118 jours, mais il est peu probable que cette hiérarchie se modifie sur un élevage complet.

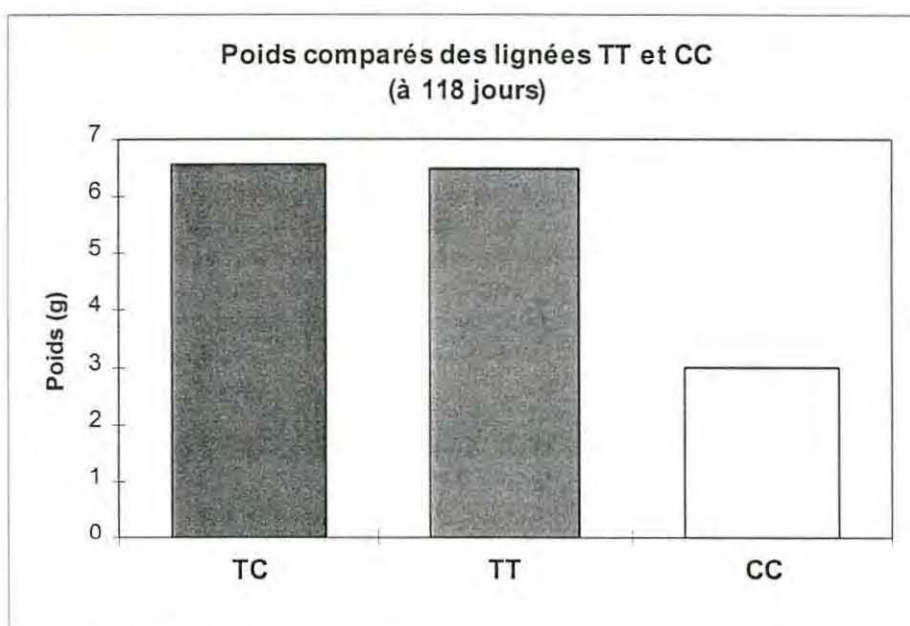


Figure 8 : Comparaison des croissances inter-souches

Source	DF	F Value	Pr > F
Population	2	40.84	0,0001
Replicat	2	2.81	0.0612
Population*Replicat	4	2.25	0.0630

Population	Moyenne	Ecart-type	N	Tests Duncan
TC	6,54	3,73	150	A
TT	6,47	3,27	150	A
CC	2,99	3,21	98	B

Etude de l'évolution des classes de taille dans une population

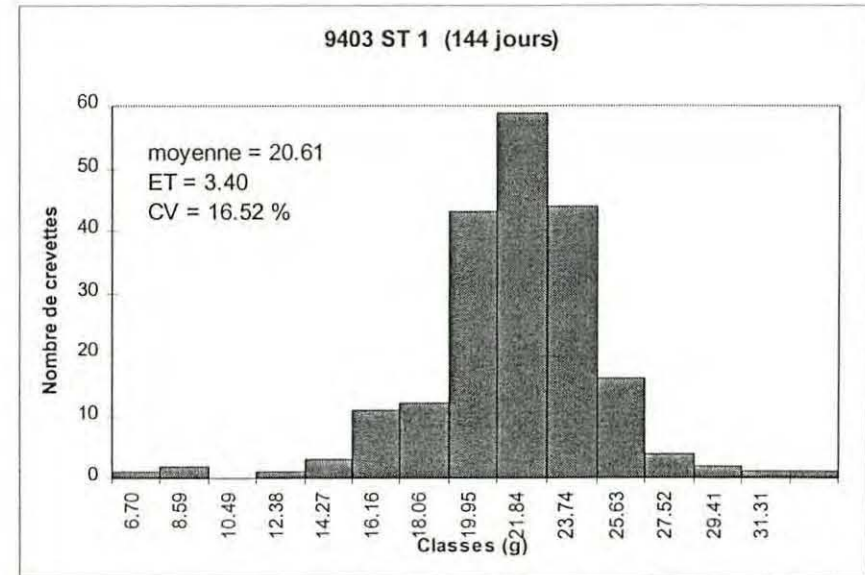
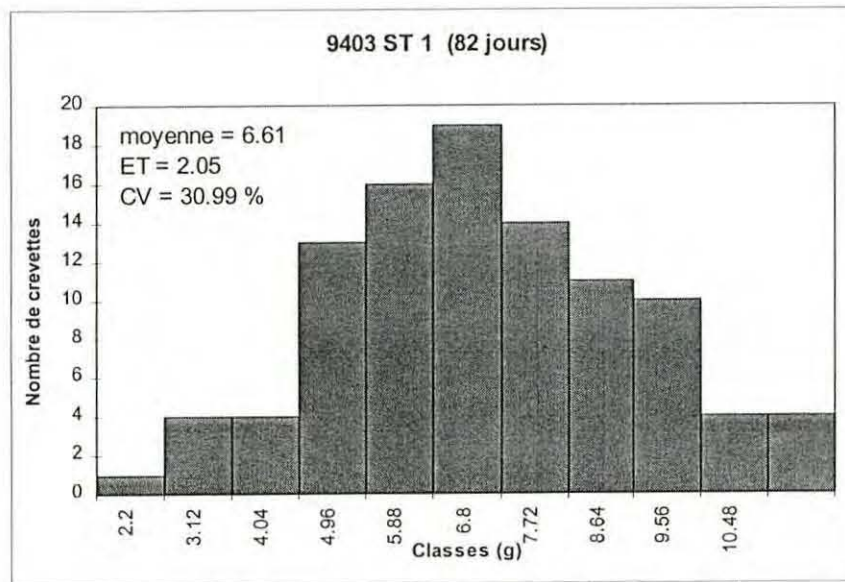
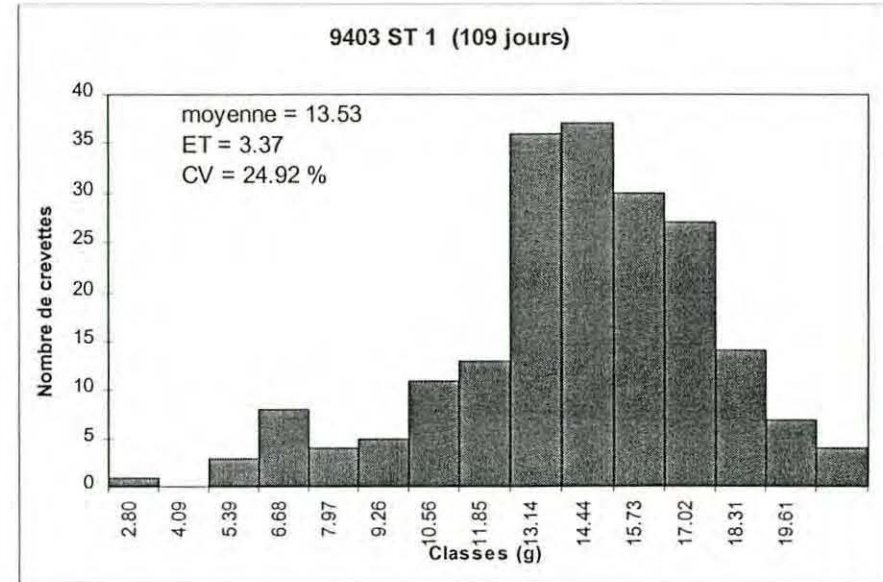
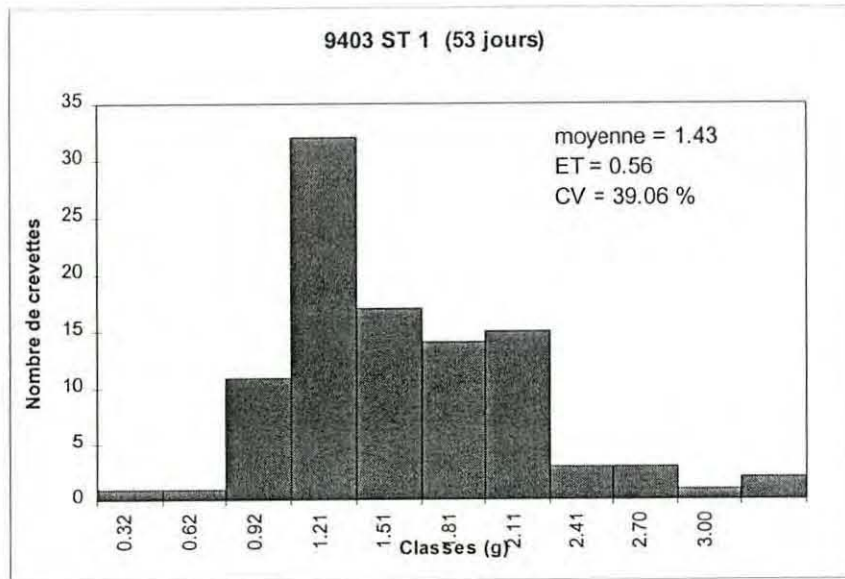
L'analyse morphométrique des larves en sortie d'écloserie a montré que la structure de la population, assez homogène en début de stade post-larvaire (courbe normale et CV de l'ordre de 30%), devient très hétérogène et dissymétrique (courbe log-normale et CV de l'ordre de 85%). Cette évolution suggère qu'une faible partie des individus possède un taux de croissance supérieur à la moyenne. Cette structure hétérogène se retrouve en prégrossissement mais évolue ensuite vers la structure homogène (CV < 25%) et gaussienne que les élevages présentent en fin de cycle, aux alentours de 20 g de poids moyen (figure 9). Une expérience a été menée afin de suivre l'évolution des différentes classes de taille entre leur sortie d'élevage larvaire et le moment de la sélection.

Cette étude a concerné des populations de crevettes d'origine TT et CC, élevées en bassins en scobalit de 30 m³. La densité de début d'élevage était de 5000 post-larves âgées de 12 jours. A 90 jours, un échantillon de chacune des populations a été pesé afin de vérifier que la structure pondérale correspondait encore à celle de sortie d'élevage larvaire. Cinq classes de poids de crevette ont alors été déterminées par rapport à la moyenne sur la base de l'écart-type :

Classes	Définition	% moyen
1	$P < \text{moyenne} - 0.5 * E.T.$	40,9 %
2	$\text{moyenne} - 0.5 * E.T. < P < \text{moyenne} + 0.5 * E.T.$	29,3 %
3	$\text{moyenne} + 0.5 * E.T. < P < \text{moyenne} + 1.5 * E.T.$	19,6 %
4	$\text{moyenne} + 1.5 * E.T. < P < \text{moyenne} + 2.5 * E.T.$	8,1 %
5	$\text{moyenne} + 2.5 * E.T. < P$	2,3 %

Le suivi de la croissance de chaque classe de poids (cf. figure 10) montre que les différences de croissance observées en sortie d'élevage larvaire se conservent jusqu'à 20 g de poids moyen: les grosses crevettes remarquables dès la sortie d'élevage larvaire ont atteint les 20 g de poids moyen avant le reste de la population.

Figure 9 : Evolution de la structure pondérale d'une population témoin



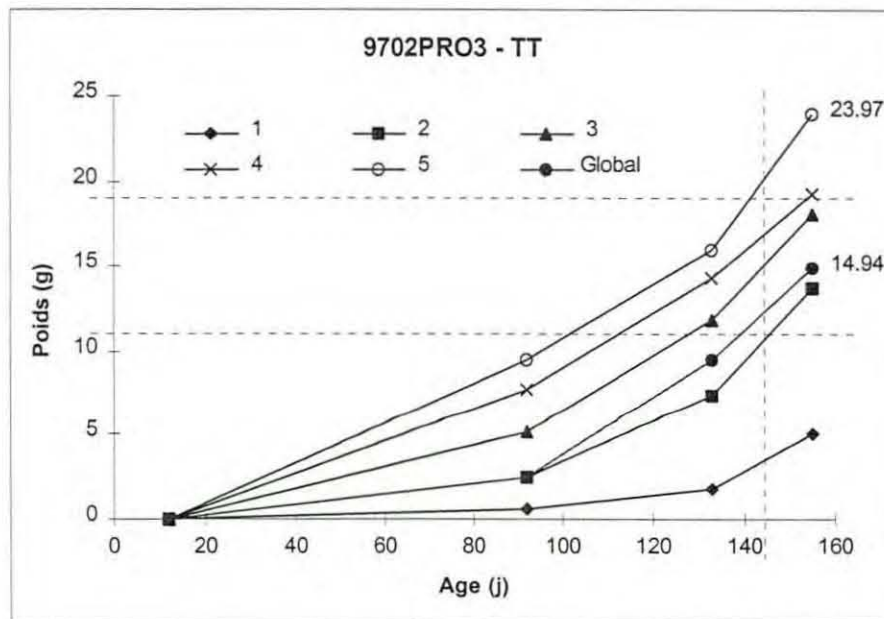
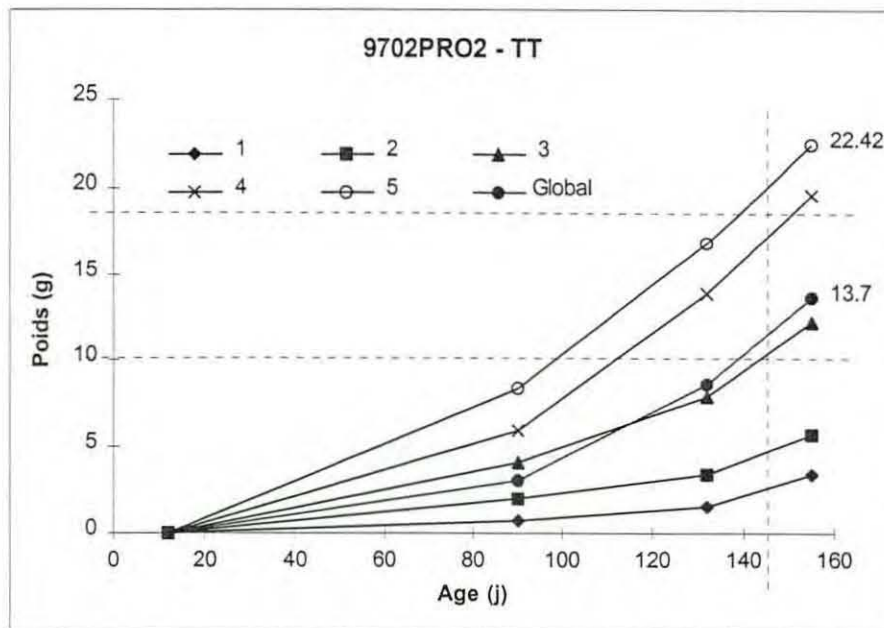


Figure 10: Croissances différentielles des différentes classes de poids au sein d'une population

La comparaison des moyennes et des intervalles de confiance ($P=0.95$) des classes montrent qu'il existe un rattrapage des classes supérieures par les classes inférieures avec un phénomène de recouvrement des classes. La forme sigmoïdale de la courbe de croissance permet de visualiser ce phénomène de rattrapage et de recouvrement des classes par le fait que les individus à forte croissance en fin d'élevage larvaire conserveraient cet avantage jusqu'à ce qu'ils atteignent le palier de croissance. Le rattrapage de leur retard de croissance par les classes les plus petites se situant encore dans la zone de croissance quasi exponentielle aboutirait à une homogénéisation des tailles au moment de la pêche.

L'absence de réponse significative à la sélection haute sur les trois premières générations de la sélection divergente, alors que la réponse à la sélection basse a toujours été présente, peut trouver là une part de son explication. La sélection des reproducteurs s'effectuant à un moment où l'ensemble des classes de poids est homogénéisé ($CV < 25\%$), tous les géniteurs de la lignée basse seraient des individus à faible croissance, alors que ceux destinés à la lignée haute pourraient appartenir à des "sous-populations" à croissance modérée: la génération résultante correspondrait alors à une population moyenne ne se distinguant pas de la population témoin non sélectionnée.

Une amélioration de la croissance passerait donc par une sélection précoce des géniteurs en isolant dès le prégrossissement les individus les plus gros. Les crevettes des classes 4 et 5 de la souche TT ont été conservées afin de produire une génération sélectionnée sur ce critère de croissance précoce.

Il faut cependant mentionner que de nombreux problèmes zootechniques ont affecté ces expériences, et que la croissance a été plus faible que la normale dans tous les élevages. Ces circonstances ont pu influencer sur le comportement des individus. En particulier, le CV est souvent le reflet des conditions d'élevage, et les mauvaises conditions rencontrées dans cette expérience a pu amplifier les écarts entre individus. Ces conditions "extrêmes" ont cependant permis de mettre en évidence ce phénomène de croissance différentielle, qui, s'il s'avère héritable, peut constituer un critère de sélection précoce intéressant.

Recherche de la variabilité génétique des paramètres immunitaires

Cette action est traitée dans la partie Pathologie - Immunologie.

Mentionnons simplement que la recherche de la variabilité génétique des paramètres immunitaires (hémocytes totaux, phénoloxydase) s'est poursuivie en parallèle de la mise au point de ces paramètres. La variabilité individuelle importante n'a pas permis de déceler de différences interfamiliales.

La maîtrise du modèle d'infection expérimentale a permis également de rechercher des familles ou des groupes génétiques plus résistants à ces infections. Bien que des différences interfamiliales apparaissent dans les survies à ces infections, la disparité des résultats entre les séries d'infection reste encore très importante.

Dans la mesure où les expériences en cours concluraient à la corrélation au niveau individuel entre certains des paramètres immunitaires et la survie à l'infection, l'établissement de lignées haute et basse pour ces paramètres permettrait d'envisager une sélection pour la résistance.

Etude du déterminisme d'une coloration spécifique au niveau de la queue

Les individus de *P. stylirostris* présentent généralement des uropodes de couleur bleutée, dont la bordure porte des bandes jaunâtres plus ou moins marquées. Certains individus, présentant une coloration très spécifique et intense de la partie caudale, avaient été découverts dans la population CC. Le croisement entre individus présentant cette coloration a permis de porter le pourcentage d'individus présentant cette caractéristique à près de 20% dans certains croisements. Le déterminisme de cette coloration semble complexe, et les structures ne permettent pas d'étudier réellement ce sujet.

Il faut noter que les croisements raisonnés ont non seulement augmenté le pourcentage d'individus porteurs de cette coloration, mais également la qualité de cette dernière, alors que

sur les premiers individus sélectionnés, la coloration se limitait à la région caudale (uropodes), les animaux produits en 1997 présentent non seulement un renforcement important de la coloration d'origine, mais également une coloration étendue aux pléopodes et périopodes.

L'intérêt de la stabilisation d'une telle coloration se conçoit dans une optique de marqueur de population (utilisation de témoin interne ou marquage "commerciale").

Cytogénétique

Le contrat de recherche passé en mai 1996 avec l'Université Française du Pacifique, et destiné à vérifier certaines hypothèses sur la polyplôidie laissées en suspens à la fin du programme Cytogénétique, s'est achevé en mai 1997.

Les expériences menées dans le cadre de ce contrat se sont inscrites dans le prolongement des résultats annoncés en 1996, et qui laissaient espérer que l'on était en mesure de produire, par **chocs thermiques**, des larves tétraploïdes de crevettes *Penaeus indicus*.

Les conclusions tirées des expériences menées sur *P. indicus* en 1996 étaient basées sur l'observation d'un phénomène de régressions du nombre de blastomères au cours des premières divisions cellulaires: il avait été observé une évolution du nombre de blastomères, passant de deux à quatre, puis régressant de quatre à deux, pour se poursuivre selon le taux normal (2-4; 4-8, etc.) des divisions. Des taux de régression de ce type étaient annoncés comme affectant près de 100% de la ponte.

Plusieurs élevages de larves issues de pontes ayant subi des phénomènes de régression ont été menés. Tous les contrôles du niveau de ploïdie (par analyse d'image) effectués sur ces animaux à l'issue de l'élevage n'ont révélé qu'un état diploïde pour chaque individu analysé.

Des larves de *P. indicus* traitées fin 1996 ont été élevées jusqu'à obtention de géniteurs, dans le but d'obtenir des descendants triploïdes. Toutes les larves (prélevées au hasard en cours d'élevage) se sont avérées être diploïdes. Les géniteurs issus du lot traité ont cependant été croisés avec des géniteurs contrôles diploïdes. Tous les nauplii issus de 22 croisements se sont avérés diploïdes après examen par analyse d'image, ce qui laisse supposer que tous les géniteurs utilisés étaient diploïdes. L'ensemble des géniteurs n'a cependant pu être testé.

Au vu des résultats annoncés, un transfert de la technique sur l'espèce *Penaeus stylirostris* semblait être envisagé. Les élevages de *P. stylirostris* tétraploïdes devaient être conduits afin de croiser les géniteurs issus de ces élevages avec des géniteurs diploïdes, le but étant l'obtention d'animaux triploïdes, putativement stériles.

Les phénomènes de régression du nombre des blastomères n'ont pu être reproduits lors des expériences de chocs thermiques menées sur *P. stylirostris*. Peu de pontes traitées ont engagé des processus de régression et aucune, parmi celles qui ont régressé, n'a suivi la séquence de régression attendue. De plus ces séquences changeaient d'une ponte à une autre. Les conditions expérimentales étant parfaitement identiques, les différences observées semblent dues à des états physiologiques différents d'une femelle à l'autre.

Une série d'expériences pour l'obtention d'animaux triploïdes par **chocs chimiques** a également été menée. Ces chocs, appliqués dans le but de retenir le globule polaire 1, ont été menés soit avec du 6-DMAP, soit avec de la cytochalasine D: toutes les larves survivantes se sont avérées être diploïdes.

Une expérience visant la rétention du globule polaire 2, avec utilisation du 6-DMAP à 12,5 mg/l, a également été menée. Sur les 1700 nauplii obtenus et mis en élevage, seules trois larves avaient survécu au 55ème jour. Deux de ces trois larves étaient probablement haploïdes (mesure par analyse d'image), la troisième étant diploïde.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce contrat n'a pas permis de confirmer ce qui avait été annoncé en 1996, à savoir la production d'animaux polyplôïdes viables de *P. indicus* et *P. stylirostris*.

Les crevettes pénéides constituent un matériel biologique très particulier pour lequel les différents essais de manipulation du génome ont toujours débouché sur davantage de questions de biologie fondamentale que de résultats applicables à l'aquaculture. L'ensemble de ces

expériences de ploïdisation montre que, compte tenu des moyens disponibles sur le COP, il ne semble pas réaliste de poursuivre ce programme tant que des connaissances plus fondamentales sur la qualité des gamètes et le développement embryonnaire précoce ne seront pas disponibles. La fin du contrat avec l'UFP a donc marquée l'arrêt de ce programme.

Ressources génétiques (E41003)

Obtention et testage de marqueurs microsatellites sur *P. stylirostris*

Nous disposons actuellement (mission de V. Vonau dans le cadre de l'URM16) des amorces de 10 locus microsatellites de *P. stylirostris* (Styli 1, Styli 2, Styli 5, Styli 6, Styli 8, Styli 9, Styli 11, Styli 19, Styli 21 et Styli 22), aux quelles il faut ajouter les amorces de 3 locus de *P. vannamei* (espèce plus proche de *P. stylirostris* que *P. monodon*) déterminées à partir de séquences publiées dans la banque de données GeneBank (Van1 et Van 2).

Les conditions de PCR permettant l'amplification de ces locus ont été déterminées, ce qui a nécessité de compléter les moyens techniques de résolution et de révélation du laboratoire de biologie moléculaire, ces moyens s'étant avérés insuffisants pour mettre à jour le polymorphisme de longueur de quelques paires de bases des locus microsatellites. Le matériel nécessaire au passage en gels d'acrylamide dénaturant a été acquis.

Les résultats de mise au point sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Locus	Remarque sur les amorces	Mise au point	Paramètres de la PCR			Remarques
			MgCl ₂	T.H	N.C	
Styli 1	OK	en cours	0,2 mM	42°C	50	Polymorphe en agarose ?
Styli 2	OK	en cours				
Styli 5	Douteux	OK	0,2 mM	50-55°C	40	Polymorphe et utilisable en agarose
Styli 6	Douteux	abandon				
Styli 8	Douteux	abandon				
Styli 9	OK	OK	0,2 mM	55°C	30	Polymorphe en acrylamide
Styli 11	OK	en cours				
Styli 19	OK	OK	0,2 mM	56°C	30	Polymorphe en acrylamide
Styli 21	Douteux	OK	0,2 mM	58°C	30	Monomorphe en agarose - Acrylamide ?
Styli 22	Douteux	OK	0,2 mM	60°C	30	Polymorphe en acrylamide
Van 1	OK (ORF)	OK	0,2 mM	55°C	30	Monomorphe en agarose - Acrylamide ?
Van 2	OK (ORF)	OK	0,2 mM	55°C	30	Polymorphe en acrylamide ?
Van 3	OK	abandon				

Tableau 1: Résultats provisoires des mises au point de PCR.

Douteux: Une des amorces dans une séquence potentiellement instable.

T.H: Température d'hybridation.

N.C: Nombre de cycles.

? : non encore testé ou validé.

ORF: Amorces définies dans un cadre ouvert de lecture.

Deux des trois locus de *P. vannamei* (Van 1 et Van 2) ont très bien amplifié sur *P. stylirostris*. Ceci est très surprenant compte tenu des résultats négatifs habituellement obtenus lors de transfert de locus microsatellites d'une espèce de Pénéides à une autre. Le choix d'ORF ("Open Reading Frame") pour le dessin des amorces peut être une explication de la stabilité de ces séquences d'une espèce à une autre. Le troisième locus, dont les amorces sont dessinées dans des séquences quelconques certainement non codées et instables, n'amplifierait pas pour cette raison. Quoi qu'il en soit, le possible transfert de marqueurs PCR (microsatellites mais aussi scnDNA) de *P. vannamei* vers *P. stylirostris* est une source à ne pas négliger. Finalement seulement 3 locus sur 13 ont du être abandonnés.

Les souches disponibles à Tahiti pour la recherche du polymorphisme de ces marqueurs ont été : TT (population du COP depuis 1990), CC (population importée de Nouvelle Calédonie sur le COP en 1993) et EPT (stock de l'Écloserie Polyvalente Territoriale). Des échantillons de populations mexicaines naturelles, sauvages ou d'élevages issus de géniteurs sauvages, ont en outre été obtenus grâce à la collaboration d'E. Cruz-Suarez de l'Universidad Autonoma de Nuevo Leon (Mexique).

Les premiers essais ont été réalisés sur gel d'agarose, et ont donné des résultats décevants puisque seuls les deux locus Styli 5 et Styli 1 se sont révélés être polymorphes. Le locus Styli 5, présentant deux allèles, a pu être utilisé sans nécessiter le passage en gel d'acrylamide. Les tests effectués sur les échantillons sauvages ont été effectués en gels d'agarose: ils présentent un niveau de polymorphisme qui semble important mais non quantifiable compte tenu du manque de résolution de la technique utilisée.

Le passage en révélation sur gels d'acrylamide dénaturant (gel de séquence) a permis d'améliorer la résolution. Seule cette technique permet de révéler la totalité du polymorphisme, deux allèles microsatellites pouvant n'être distants que de 2 paires de bases. Compte tenu de l'isolement du COP, et de la complexité à gérer des stocks d'isotopes radioactifs à durée de vie limitée, la révélation à l'argent a été utilisée et a donné de très bons résultats. Cette technique est une alternative à la radioactivité pour la révélation des gels.

Fin 97, 4 locus (Styli 5, Styli 9, Styli 19, Styli 22) ont été testés sur les populations du COP et de l'EPT, et se sont tous les trois révélés être polymorphes. Van 3 a également été testé sur la population de l'EPT et a présenté un léger polymorphisme (2 allèles dont un très rare: $q=0.01$). Les valeurs des fréquences alléliques et des Fis pour les trois premiers locus sont données dans le tableau suivant :

Pop	TT	EPT g1	EPT g3	CC
(N)	2x30	30	48	30
Styli 5				
180	0,7167	0,8	1	1
210	0,2833	0,2	0	0
Fis				
	-0,223	0,798***	-	-
Styli 19				
210	0,7667	0,55	0,4375	0,8167
214	0,2333	0,45	0,5625	0,1833
Fis				
	0.072	0.275	0.079	0.237
Styli 9				
	(N = 30 + 17)			
210	0		0.1875	
218	0.3085		0.4063	
220	0.2979		0.2396	
222	0.3936		0.1667	
Fis				
	0.206*		0.397** *	
Σ locus Fis				
	-0,0826	0,4814**	0.2675* *	-

Tableau 2 : Fréquences alléliques et Fis aux locus Styli 5, Styli 19 et Styli 9. Fis traités à l'aide du logiciel Genetix (Belkhir *et al*, 1996).

* : $0.01 < p < 0.05$ ** : $0.001 < p < 0,01$ *** : $0.0001 < p < 0,001$, tests sur 1000 permutations.

Si les fréquences génotypiques ne s'écartent pas significativement (à l'exception du locus Styli 9) de la panmixie dans les populations du COP, la population EPT présente un déficit en hétérozygotes très net sur l'ensemble des locus. Les valeurs de Fis obtenues suggèrent l'existence d'un phénomène autre que la consanguinité, influant dans le sens contraire, au moins au locus Styli 5. On peut émettre l'hypothèse d'une contre sélection agissant sur les homozygotes et annulant les effet de la consanguinité, et cela de façon plus importante au COP qu'à l'EPT.

Cette contre-sélection peut s'effectuer, soit sous l'effet de la consanguinité, les individus les plus consanguins présentant la plus faible valeur sélective, soit par avantage des hétérozygotes, du fait du fonctionnement des gènes (dominance, superdominance ou épistasie).

Mise en évidence d'une relation hétérozygotie - croissance

Suite à ces premiers résultats, et aux travaux sur la consanguinité et l'hétérosis chez les bivalves obtenus par l'URM16, des mesures de paramètres de la fitness individuelle (croissance, survie et asymétrie fluctuante) ont été couplées aux expériences de génotypage. Les analyses ont porté sur la souche TT, et les animaux d'origine EPT.

Le test de la **relation génotype-survie** a été réalisé sur la population TT, sans détecter d'effet. Les échantillonnages ont cependant été effectués à des stades avancés de l'élevage (30g et 40g), et on peut supposer que les mortalités différentielles se produisent essentiellement

pendant les stades plus jeunes. La recherche de cette relation mérite d'être reprise sur un élevage complet.

Des mesures d'**asymétrie fluctuante** ont été réalisées sur la souche TT. Pour ce faire, la taille des pédoncules oculaires et des uropodes a été mesurée à droite et à gauche de chaque individu. Le coefficient d'asymétrie est obtenu par le quotient de la somme des mesures droites par la somme des mesures gauches. Cette expérience nous a donné un effet non significatif de l'hétérozygotie au locus Styli 5 sur l'asymétrie, mais avec un échantillonnage faible (N = 50). L'utilisation de l'analyse d'image peut permettre d'augmenter le nombre de mesure.

La **relation hétérozygotie-croissance** a été testée par mesure du poids dans les populations TT et EPT. Cette relation s'est avérée significative au locus Styli 5 et Styli 9 dans la population TT, et au locus Styli 19 pour la population EPT (figure 11).

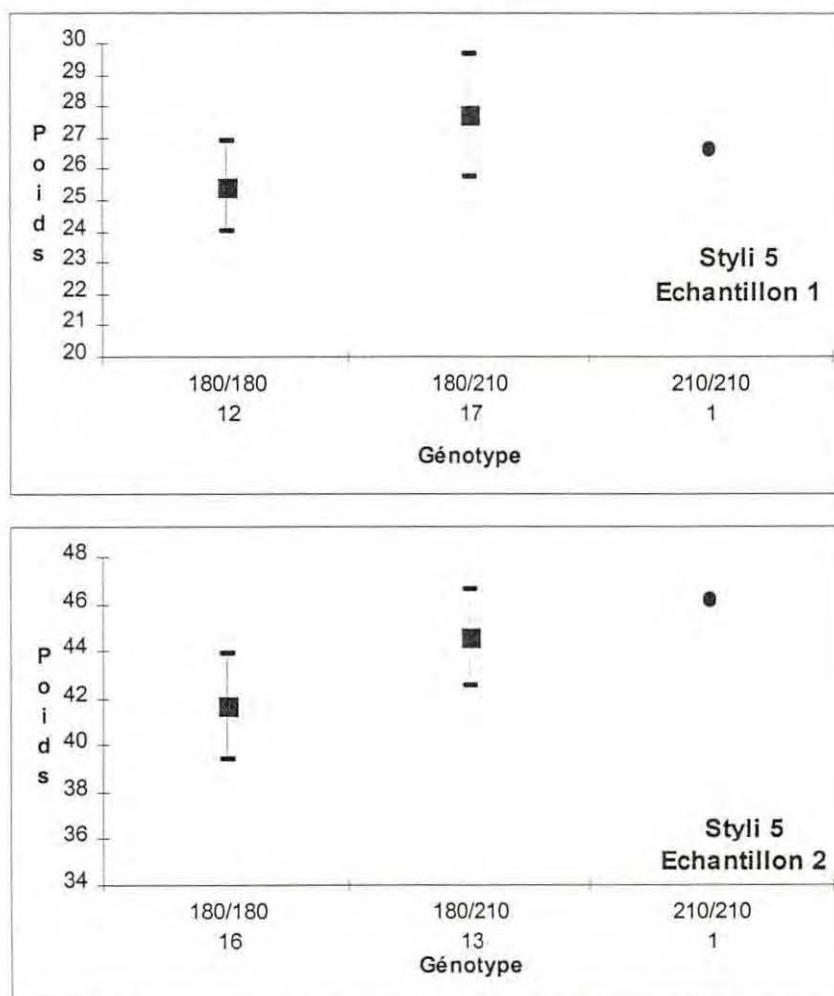


Figure 11 : Poids moyen et intervalle de confiance à 95% en fonction du génotype (le nombre d'individus par génotype est indiqué en dessous) au locus Styli 5 pour les deux sous-échantillons de *P. stylirostris* souche TT.

Cette relation hétérozygotie-croissance est un argument en faveur de la contre-sélection des homozygotes telle qu'elle a été mentionnée plus haut, soit qu'elle agisse par dépression de consanguinité, soit qu'elle soit le reflet de déséquilibres de liaison, agissant sur le mode de fonctionnement des gènes.

Il existe deux méthodes principales d'amélioration génétique, l'une étant la sélection sans consanguinité et l'autre consistant en croisement précédé de consanguinité. En croisant deux lignées dans lesquelles différents allèles sont fixés, on obtient une F1 dans laquelle tous les individus sont hétérozygotes alors que dans une population non consanguine, 50% des individus

au plus peuvent être hétérozygotes pour une paire particulière d'allèles. En conséquence, si les hétérozygotes pour une paire d'allèles sont supérieurs aux homozygotes, la consanguinité et le croisement seront un meilleur moyen d'amélioration que la sélection sans consanguinité.

Au niveau des populations du COP, les résultats obtenus sur deux locus ont montré que le niveau de consanguinité de la souche TT était inférieur à ce que l'on pouvait supposer *a priori*. L'analyse des générations futures permettra de suivre l'évolution du coefficient de consanguinité et éventuellement de le contrôler. L'utilisation des marqueurs devrait permettre l'optimisation du choix des géniteurs en limitant leurs liens de parenté.

Sur les 3 locus analysés, tous montrent un effet hétérotique que ce soit dans une population ou une autre. Ces premières analyses permettent de penser qu'un mode de sélection par croisement peut donner de bons résultats. La souche SPR43 est bien évidemment la meilleure candidate pour servir de lignée élite, mais elle ne doit pas être la seule.

PROGRAMMES SCIENTIFIQUES FILIERE HUITRE PERLIERE

Programme Général de Recherche sur la Nacre

Projet A31002: Huître Perlière/Ecosystème conchylicole

Rappel des objectifs

Pour l'année 1997, les objectifs scientifiques de l'équipe Huîtres perlières sont axés pour l'essentiel sur la réalisation des contrats liés à la deuxième phase du PGRN. En effet, l'Ifremer est signataire de 8 conventions particulières sur les 10 que comporte ce programme de recherche financé par l'état (FRT et Ministère des Dom-Tom) et par le Territoire de Polynésie française.

Le PGRN constitue un effort coordonné depuis 1994 pour apporter à la perliculture les connaissances scientifiques nécessaires à son développement. Il ne fédère pas la totalité des travaux sur la nacre, mais il a pour ambition de faire avancer notre connaissance dans deux domaines jugés essentiels : la connaissance du milieu lagonaire dans lequel vivent les nacres, et notamment sur le plan de la production de nourriture assimilable par celles-ci, et la détermination du nombre de nacres que peut supporter un atoll semi fermé ou fermé. Cette dernière notion de capacité trophique repose sur la compréhension de la façon dont les nacres utilisent l'énergie contenue dans les aliments. Pour que ces connaissances puissent être utilisables, un troisième volet a été prévu sur la vulgarisation de ces connaissances auprès des milieux professionnels.

La deuxième phase du PGRN doit se dérouler sur deux ans (1997 et 1998), la signature des conventions étant intervenue à la fin de 1996.

Réalisation du PGRN

L'Ifremer est particulièrement impliqué dans la mise en oeuvre de la deuxième phase du PGRN, et en particulier dans l'estimation de la capacité trophique des lagons perlicoles. Pour ce faire un certain nombre d'actions de recherche ont été réalisées par plusieurs partenaires scientifiques, correspondant à autant de conventions d'application.

L'action principale, sous la responsabilité d'Ifremer, concerne l'établissement d'un modèle de croissance de la nacre, basé sur la quantification des lois physiologiques régissant le comportement de la nacre sur le plan énergétique. Ces lois ont été établies et complétées en 1997, notamment pour ce qui concerne la détermination des lois régissant la filtration *in situ* par des méthodes complémentaires (méthodes des biodépôts et fluorimétrie). Pour ce qui concerne les eaux de pompage, la détermination de la surface ouverte des siphons a fait l'objet de mesures basées sur la prise de photographie *in situ*.

Pour compléter les résultats précédemment acquis, il a été nécessaire en 1997, de réaliser des expérimentations *in situ* et un suivi de la croissance et de la reproduction de la nacre sur une durée d'un an. Les expériences ont porté sur la détermination de la filtration par différentes méthodes et à différentes saisons, au cours de mission de terrain. En laboratoire, a été effectué un test de maturation en conditions contrôlées, qui avait pour objet de quantifier l'impact énergétique de l'émission des gamètes dans le bilan énergétique. La détermination de la surface des siphons, paramètre intervenant dans les mesures de taux de pompage, a également fait l'objet d'une analyse biométrique.

Le suivi de la croissance et de la reproduction de la nacre avait pour premier but de fournir des données permettant de caler le modèle de croissance. Ce suivi a été effectué sur un an, pour des huîtres de trois classes de taille. La maturation a été suivie par des observations histologiques. Un suivi du milieu a été effectué en parallèle, afin d'évaluer la nature de la nourriture potentiellement disponible pour la nacre et son utilisation au cours du temps.

Mais d'autres actions de recherche auxquelles a participé l'équipe nacre ont également contribué à l'établissement de cette notion de capacité trophique. Il s'agit de l'estimation de la production primaire des lagons perlicoles, du renouvellement des eaux des lagons, de la détermination du rôle joué par les bivalves compétiteurs de la nacre sur le plan alimentaire, des stocks des principales espèces de bivalves et enfin de l'étude du régime alimentaire de la nacre.

Il faut enfin mentionner trois actions de recherche sans rapport direct avec la notion de capacité trophique, dans lesquelles l'équipe s'est retrouvée impliquée. Il s'agit de l'étude des stress subis par la nacre lors des opérations d'élevage, notamment à l'occasion des opérations de transfert entre sites, de la participation de l'Ifremer à la mise en place d'un réseau de suivi des lagons et de la perliculture, et enfin de la réalisation d'une action de suivi zoosanitaire des cheptels en Polynésie française.

Principaux résultats

Suivi du Milieu et de la Croissance

Le suivi de la croissance d'un lot d'huîtres âgées d'un peu plus d'un an a permis de quantifier les différentes productions réalisées par l'animal sur un cycle annuel, sur les classes d'âge 1 & 2, ainsi que sur la durée de l'étude (de juin 1990 à septembre 1991). La production de coquille (P_{sc}) mobilise 50 % de l'énergie consacrée à la croissance. Pendant le suivi, deux pontes importantes ont été identifiées, l'une en mars 1991, et l'autre en septembre de la même année. Chacune de ces pontes a engendré une perte croissante de poids sec de chair de 12 puis de 17 %. En outre, l'existence de pontes partielles et asynchrones est hautement probable tout au long de l'année. Sur la durée du suivi, l'énergie consacrée à ces deux pontes (P_r) représente 42 % de l'énergie emmagasinée dans les tissus ($P_g + P_r$).

La production d'un mois sur l'autre est assez constante, et un bilan moyen mensuel peut être estimé sur la durée du suivi. L'énergie de la production se partitionne comme suit :

$$P = P_g + P_r + P_{sc}$$

$$\text{avec } P_g = 4 \text{ kJ/mois}$$

$$P_r = 3 \text{ kJ/mois}$$

$$P_{sc} = 7 \text{ kJ/mois}$$

Date	Lot d'huîtres de			
	1 an	2 ans	3 ans	4 ans
01-janv	50	50	50	50
15-janv	50	50	50	50
01-févr	50	50	50	50
15-févr	50	50	50	50
01-mars	50	50	50	50
15-mars	50	50	50	50
06-avr	50	50	50	50
15-avr	50	50	50	50
01-mai	50	50	50	50
15-mai	50	50	50	50
01-juin	50	50	50	50
15-juin	50	50	50	50
01-juil	50	50	50	50
15-juil	50	50	50	50
01-août	50	50	50	50
15-août	50	50	50	50
01-sept	50	50	50	50
15-sept	50	50	50	50
01-oct	50	50	50	50
15-oct	50	50	50	50
01-nov	50	50	50	50
15-nov	50	50	50	50
01-déc	50	50	50	50
15-déc	50	50	50	50
Total	1200	1200	1200	1200

Tableau 1 : Plan d'échantillonnage prévu pour l'étude la croissance et de la reproduction de l'huître perlière à différent âge.

Ce premier suivi a permis de montrer que la croissance en coquille était importante et continue tout au long de l'année, et que la croissance en chair pouvait présenter de petits accidents (palier ou diminution) imputables à des phénomènes de ponte. Mais ce suivi ne concerne que des individus des classes d'âge 1 & 2. Il semble que l'effort de ponte devienne de plus en plus important avec l'âge, mais aucune quantification n'est actuellement possible pour des huîtres de plus de deux ans.

Ainsi ce suivi ne concerne que les individus de la phase d'élevage comprise entre le collectage et la greffe. Un suivi de la croissance et de la reproduction sur une période plus longue est indispensable. Ce suivi devra se dérouler sur une année, l'utilisation de cohorte permettra de suivre différentes classes d'âge. On se propose de suivre bi-mensuellement 4 cohortes sur l'année 1997. Compte tenu de la mortalité naturelle, on prévoit un stock initial de 6000 huîtres perlières (1500 x 4). Un lot supplémentaire de 500 huîtres de 2 ans sera greffé en cours d'année afin d'étudier l'impact de la greffe sur la physiologie et la croissance de l'huître. Un stock de 6500 huîtres a donc été constitué à la fin de 1996.

Physiologie

Filtration

La relation d'allométrie suivante peut être appliquée en première approche aux populations d'huîtres perlières en élevage dans le lagon de Takapoto :

$$CR = e^{(4.029 - 2.296 * PIM)} W^{0.607}$$

Avec CR : Débit de filtration (l/h)
PIM : Seston minéral (mg/l)
W : Poids de chair sèche

Elle met en évidence l'importance des capacités de pompage de l'huître. Ceci peut être considéré comme une adaptation à l'oligotrophie du milieu lagunaire.

Actuellement cette relation n'inclut pas l'effet de la température, ni de la quantité de matière organique (POM) présente dans le milieu. Ces deux facteurs agissent probablement aussi sur les capacités de filtration de l'huître.

Le débit de filtration permet une estimation de la consommation FR (mg/h) par la relation : $FR = CR * TPM$. Ce qui équivaut à :

$$FR = TPM * e^{(4.029 - 2.296 * PIM)} W^{0.607}$$

Avec FR : Consommation (mg/h)

TPM : Seston total (mg/l)

W : Poids sec de chair

Ingestion

L'huître perlière semble produire toujours des pseudofèces en permanence, bien que la charge en seston soit faible. Il n'existe donc pas de seuil inférieur de production de pseudofèces comme c'est le cas chez la plupart des bivalves. En outre, ces pseudofèces sont enrichies en matière minérale. L'huître perlière semble donc capable d'effectuer un tri pré-ingestif.

Cette production dépend à la fois du poids de l'animal, selon une relation pratiquement linéaire, et de la concentration en matière minérale. Une augmentation de cette concentration même faible provoque une hausse de la production de pseudofèces. Ces relations peuvent être formulées comme suit :

$$PF = PF_o + PF_m = e^{(-1.527 + 2.416 * PIM)} W^{1.047} + e^{(-1.394 + 2.884 * PIM)} W^{1.131}$$

Ainsi un individu de 1 g de poids sec produit de 0,5 à 2,5 mg/h.

La production de fèces n'est pas influencée par la concentration en seston. Par contre elle dépend du poids de l'animal, selon l'équation :

$$F = F_o + F_m = 3.35 W^{0.422} + 7.776 W^{0.488}$$

Cette production est plus élevée que celle de pseudofèces : une huître de 1 g produit 11 mg/h de fèces.

L'absorption intestinale est directement corrélée à la fraction minérale du contenu stomacal, elle même dépendante de la concentration dans le milieu : elle augmente de 60 % à plus de 80 %, quand la matière minérale passe de 0,52 à 0,25 mg/l. L'équation estimée est la suivante :

$$Abs = e^{(4.615 - 0.782 * PIM)} W^{0.034}$$

Le poids n'a pratiquement pas d'effet sur l'efficacité d'absorption.

Excrétion

Des mesures en laboratoire dans des conditions proches du milieu lagunaire de Takapoto ont permis de mettre en évidence que l'huître perlière excrétaît très majoritairement de l'azote ammoniacal. Elle rentre par conséquent dans la classe des mollusques ammoniotéliques.

L'étude plus précise de l'excrétion ammoniacale a montré que l'existence d'une relation allométrique entre cette fonction et le poids sec de chair de l'animal. Cette relation est la suivante :

Les autres facteurs susceptibles $U = 1.644 * W^{0.783}$ d'influer sur l'excrétion (état de maturation, température, salinité...) n'ont pas encore été étudiés. En outre des mesures *in situ* et peut être même en continu semblent être envisageables prochainement.

Respiration

La relation allométrique entre le poids sec de chair et le niveau de respiration a été établie *in situ* en juillet 1994 à une température de 27 °C. L'équation est la suivante (R en ml d'O₂/h) :

$$R = 0.61 * W^{0.67}$$

Cette relation est très proche de la plupart de celles obtenues sur d'autres bivalves. Cependant le coefficient a (0.61) est généralement fonction de plusieurs facteurs, notamment la température. De nouvelles mesures sont à envisager pour définir les principales sources de variabilité de ce coefficient *in situ*. Des mesures couplées de la respiration et du pompage permettraient en outre de définir le coût énergétique de l'activité de filtration qui est très forte chez l'huître perlière.

Suivi quantitatif de la reproduction

Un suivi quantitatif de la reproduction a été conduit en 1997 sur une période de 6 mois. Des nacres ont été alimentées ad libitum avec des cultures d'algues et l'évolution des gonades a été suivie par des méthodes histologiques. La ponte est survenue dans un délai de 2 mois et l'effort de reproduction a pu être quantifié et intégré au bilan énergétique puis au modèle de croissance. Ces résultats recourent ceux obtenus sur le suivi de la croissance de lots de nacre à Takapoto, pour lesquels l'évolution du poids sec reflète la perte de poids sec lié à l'émission des gamètes en milieu naturel pendant les périodes de mars et de septembre.

Apports de la télédétection

L'objectif scientifique essentiel de la deuxième phase du Programme Général de Recherche sur la Nacre est de pouvoir estimer la capacité trophique d'un lagon, dans le but de proposer des règles de gestion de l'activité perlicole qui permettent de ne pas dépasser cette capacité trophique. Cette estimation repose essentiellement sur l'évaluation qualitative et quantitative des consommateurs de la nourriture végétale que sont les mollusques filtreurs et principalement les nacres. Mais la connaissance des mécanismes permettant de renouveler la biomasse phytoplanctonique est tout aussi importante, car la capacité trophique d'un milieu résulte finalement des équilibres qui peuvent s'établir entre les flux de matière circulant parmi les différents niveaux trophiques de l'écosystème en question.

Les aspects qualitatifs, concernant la composition spécifique du phytoplancton et sa consommation par les nacres font l'objet d'une action de recherche individualisée au sein du PGRN qui a trait au régime alimentaire de la Nacre.

Il est donc prévu, dans la convention de recherche concernant "l'influence du milieu sur la production et le renouvellement de la nourriture" que soient mesurées par l'ORSTOM la photosynthèse ainsi que la concentration chlorophyllienne, en tant qu'estimateurs des productions et biomasses phytoplanctoniques. Parallèlement, des mesures de l'atténuation de la lumière dans la masse d'eau doivent être réalisées par Ifremer.

Résultats concernant le coefficient d'atténuation de la lumière dans le lagon de Takapoto.

Les traitements d'image satellitaire ont été effectués sur des clichés de l'atoll de Takapoto, en s'appuyant sur des travaux de terrain de J. Maritorena, de l'Université Française du Pacifique. Les travaux en question ont porté sur l'utilisation d'un spectroradiomètre immergeable, permettant de reconstituer la réponse satellitaire à des qualités d'eau possédant différentes signatures spectrales, et donc caractérisées par leur coefficient d'atténuation des radiations. L'utilisation de ces travaux a permis de caractériser dans les images satellitaires l'existence de variations locales dans le coefficient d'atténuation, et ce, dans différents sites, lagons et îles hautes.

Dans l'atoll de Takapoto, le traitement de l'image satellitaire a permis de caractériser des valeurs du coefficient d'atténuation de la lumière, au moyen d'un algorithme comparant la réponse fournie par les trois canaux du satellite SPOT. Cette analyse repose sur l'absorption différentielle en fonction des longueurs d'onde caractéristiques de chacun des capteurs. La représentation cartographique des résultats montre que les eaux centrales du lagon présentent un caractère océanique. La transmission de la lumière dans cette zone ne diffère pas de ce qui a été observé sur les eaux profondes environnant l'atoll. Par contre, les valeurs du coefficient d'atténuation de la lumière semblent en première analyse plus élevées à la périphérie du plan d'eau, et plus particulièrement le long de la bordure Est. Ces valeurs semblent également plus

fortes dans la partie Nord du lagon. Une présentation cartographique schématique sera proposée pour illustrer la répartition des valeurs de ce coefficient d'atténuation.

Le spectroradiomètre étant encore sur le Territoire de Polynésie Française, un essai de remise en route a été tenté, avec le concours d'un ingénieur spécialiste du traitement du signal (Eric Fougeray). Cet essai s'est avéré infructueux, la réparation n'étant pas réalisable sur le territoire, et le retour en métropole trop onéreux par rapport au budget prévu pour cette action de recherche.

L'indisponibilité de ce matériel n'a pas permis de confirmer l'usage d'un algorithme pour le calcul des coefficients d'atténuation de la lumière. Par ailleurs, l'usage d'une seule photo pour le calcul de coefficients présente l'inconvénient majeur de ne pas correspondre à la situation exacte du plan d'eau le jour où sont réalisées les mesures de production primaire. Elle n'indique que l'existence d'une situation donnée, ne correspondant pas forcément à une organisation permanente ou même seulement habituelle de la répartition géographique des valeurs d'atténuation de la lumière.

Il sera difficile de remédier à cet état de chose, l'achat de vues spot correspondant aux dates de mission étant trop onéreux. On peut cependant envisager de caractériser la situation météorologique correspondant au jour de la prise de vue, grâce aux données météorologiques de la station de Takaroa, qui sont disponibles, et comparer cette situation à celle correspondant le jour où sont effectuées les mesures.

Les travaux entrepris par Yann Morel en 1997 sur la détermination de la bathymétrie des atolls de Polynésie française, ont permis de montrer que les coefficients d'atténuation de la lumière présentaient des caractéristiques contrastées selon la typologie des atolls. Le site de Takapoto ayant servi d'atelier pour ces travaux, il est maintenant possible de restituer une approche cartographique pour ces coefficients. La disponibilité d'une bathymétrie numérisée et d'une meilleure connaissance de la pénétration de la lumière dans l'eau de cet atoll permettra d'extrapoler les mesures, ponctuelles mais exactes, de la production primaire in situ, à l'échelle du lagon.

Alimentation de la nacre

L'équipe Nacre a apporté un concours à la réalisation de cette action d'un intérêt primordial pour ses propres objectifs, et qui est conduite par un chercheur Ifremer du Crema L'Houmeau, par Bruno Delesalle de l'EPHE, et par Pascale Loret, doctorante à l'Université française du Pacifique. Le régime alimentaire de la nacre est recherché à travers deux techniques complémentaires. L'une est basée sur l'analyse de la composition des peuplements algaux présents dans l'eau dans les contenus stomacaux et dans les fèces de la nacre. L'autre utilise le fait que les pigments caractéristiques des principaux groupes floristiques présentent des signatures spectrales particulières qu'il est possible de révéler en HPLC, ceci permettant de connaître quelles sont les groupes voire les espèces ingérées préférentiellement par la nacre. Cette approche de nature qualitative est donc complémentaire des mesures quantitatives effectuées tant au laboratoire qu'*in situ* dans le cadre des programmes de l'équipe.

Pascale Loret a réalisé des expérimentations dans nos locaux avec le concours de techniciens de l'équipe. Par ailleurs, au cours de ses missions à Takapoto, une assistance en plongée lui a été apporté par les plongeurs du COP. Des échanges de bons procédés ont permis d'évaluer l'aspect quantitatif de l'énergie contenu dans des fèces dont elle avait déterminé la composition spécifique. elle a en retour apporté ses connaissances pour caractériser la composition spécifique des peuplements phytoplanctoniques présents lors des expériences de physiologie sur la nacre

Etude des compétiteurs alimentaires de la nacre

Un certain nombre d'espèces de bivalves filtreurs se nourrissent d'algues du phytoplancton de taille comparable à celles ingérées par les nacres.. L'étude de leur physiologie et de leur régime alimentaire constitue une partie du sujet de thèse de Loana Addessi. Pour des raisons évidentes d'intercalibration, les méthodologies employées sont les mêmes que celles utilisées pour l'étude

de la physiologie de la nacre, ce qui devrait permettre de comparer les résultats sur le plan de la compétition énergétique interspécifique. L'encadrement de cette doctorante a été assuré par l'équipe nacre, et les installations expérimentales de physiologie, ainsi que le matériel nécessaire lui ont été fournis, en fonction du planning d'occupation de cette salle. Par ailleurs, une assistance en plongée lui a été procurée lors des missions d'étude *in situ* de la physiologie de ces bivalves à Takapoto.

Etude des stocks de nacres et de compétiteurs à Takapoto.

La connaissance des stocks de bivalves présents dans le lagon de Takapoto constitue le deuxième volet nécessaire pour transposer du niveau individuel vers le niveau des populations les résultats obtenus en physiologie. Compte tenu de la nature des peuplements une stratégie d'échantillonnage incluant la réalisation d'opérations préliminaires avant les études proprement dites a été mise en place. Les compartiments concernés sont les stocks naturels de bivalves, puis les populations naturelles de bivalves compétiteurs, les stocks de nacres en élevage et enfin les stocks de compétiteurs installés sur les supports d'élevage. Les opérations de pré-échantillonnage ont été réalisées en 1997, au cours d'une mission de trois semaines, à laquelle ont pris part 4 plongeurs. L'ensemble du lagon a été couvert à cette occasion, les densités étant mesurées sur différentes espèces. Les densités de nacres sont comparables à ce qu'avait mesuré Jean-marc Zanini au cours d'une opération précédente. Le stock de nacre en élevage naturel est estimé à 4,5 millions de nacres. Le point le plus important concerne les stocks d'*Arca ventricosa* qui sont estimés à plus de 600 millions d'individus.

Par ailleurs, une enquête de terrain sur les stocks en élevage a permis d'évaluer ceux-ci à environ 1,7 millions d'individus (enquête conçue et réalisée par le SRM).

Réseau de suivi des lagons et de la perliculture

Le démarrage de ce réseau qui est sous la responsabilité du SRM a subi quelques vicissitudes qui ont entraîné une modification du protocole initial. L'Ifremer apporte son concours à la mise en place de ce réseau dans les différents atolls, au traitement des données obtenues, et assure le suivi de l'un des points dans la baie de Vairao. Les analyses biochimiques qui devaient initialement être réalisées par l'Ifremer ont été confiées par le SRM à un bureau privé.

Etude des stress subis par la nacre au cours des opérations d'élevage

En fait, cette action a deux volets, l'un consacré à l'étude des conditions de transferts des nacres au cours du cycle d'élevage et l'autre à la détermination des tolérances de l'espèce à diverses conditions d'environnement (température, oxygène dissous et salinité). L'équipe nacre a participé à la première action en intervenant sur le plan conceptuel, et en apportant une assistance au cours des opérations de terrain. Les analyses biochimiques prévues sur les différentes expériences mettant en jeu les conditions d'exposition et les durées lors des transferts simulés, seront effectuées par le COP.

Le deuxième volet expérimental n'a pas été abordé en 1997 pour des raisons de planning des installations expérimentales. Ces expérimentations devraient être réalisées au COP en 1998.

Veille pathologique

Michel Comps a effectué au mois de septembre, la deuxième mission prévue dans le cadre de l'action intitulée surveillance zoosanitaire des cheptels de nacre. Il a pu repasser sur certains des sites qu'il avait déjà visités, et il a surtout eu l'opportunité de pouvoir effectuer des prélèvements aux Gambiers, ce qui lui aura permis de couvrir la totalité des archipels concernés par la perliculture en Polynésie française.

Bien que son rapport ne soit pas terminé, ses impressions de mission confirment les résultats obtenus lors de la première mission, à savoir l'existence de problèmes sanitaires localisés, dont la description détaillée reste à faire. Il est à signaler que le SRM a exprimé un intérêt particulier à ce que soit identifié l'agent pathogène identifié dans certaines poches perlières.

Le travail de terrain est terminé, et il n'existe actuellement aucun dispositif pour pérenniser l'action entreprise par Michel Comps. Pour mémoire, le nombre de nacres en élevage en Polynésie française dépasse probablement le milliard d'individus, sans compter les stocks

naturels. La mise en place d'un suivi zoosanitaire semble être une nécessité absolue au regard des missions définies pour l'Ifremer dans le décret de création de l'organisme.

Fonds bibliographique

Il existe au COP un fond bibliographique sur l'huître perlière et les lagons perlicoles qui a été initié en 1992. Il comprenait 1500 références à la fin de 1996. Un effort particulier a été fait en 1997 pour accroître et rationaliser ce fonds. Les références doubles ont été supprimées et plus de 700 nouveaux articles sont venus enrichir la base de données. Ce fond a été mis à la disposition des organisme du territoire, des chercheurs, stagiaires et doctorants travaillant sur la nacre, sous la forme de communication de listes de références sous forme papier et disquette informatique (logiciel Procite). Il était ouvert jusqu'à présent, des emprunts pouvant être fait pour photocopie et retour. Le dernier pointage ayant révélé la disparition d'environ 70 articles parmi les plus intéressants, et la demande de retour de ces articles s'étant révélée infructueuse (0 retour d'articles manquants), ce fond sera désormais fermé, et seule la liste des références sera communiquée aux tiers. L'effort de recherche bibliographique sera poursuivi en 1997, malgré les difficultés à se procurer en Polynésie des articles parus dans des supports peu répandus. L'identification de sites internet et l'amélioration des profils de recherche dans les grandes bases de données (ASFA et Currents Contents) est l'objectif prévu en 1998.

Projet Amphybi

Ce projet est resté au point mort en 1997, malgré les visites effectuées à Brest en cours d'année par A. Bodoy puis par Dominique Buestel à la DITI. Le plan de charge du bureau d'étude de la DITI ne comprend pas de place pour ce projet avant... l'an 2000. Ce projet est donc pratiquement enterré pour ce qui concerne l'équipe nacre, sauf miracle.

PUBLICATIONS 1997 DU LABORATOIRE AQUACULTURE TROPICALE

ARTICLES DANS REVUE À COMITÉ DE LECTURE

- (E120) **Amouroux J.M., G. Cuzon and A. Gremare (1997).** Association of pulse chase design, compartmental analysis and analog modeling to assess absorption and assimilation efficiencies in *Penaeus stylirostris* fed an artificial diet. *Aquaculture*, Vol. 149, n° 1-2, pp 71-86.

ARTICLES DANS REVUE SANS COMITÉ DE LECTURE

OUVRAGES OU ARTICLES DE SYNTHÈSE DANS OUVRAGES

COMMUNICATIONS POUR COLLOQUE OU GROUPE DE TRAVAIL

- (A310) **Buestel D., S. Pouvreau, G. Jonquières et S. Robert (1997).** Comportement nutritionnel et bilan énergétique de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (A310) **Buestel D. and A. Bodoy (1997).** Culture of black lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera* in French Polynesia. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E120) **Aquacop and G. Cuzon (1997).** An example of 15 years of shrimp feed production in New Caledonia. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E120) **Cuzon G., G. Nedelec and Aquacop (1997).** Recent advances in nutrition and feeding of Seabass, *Lates calcarifer*. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E120) **Cousin M., G. Cuzon and J. Guillaume (1997).** Protein-energy balance in two species of panaeids tridimensionnal approach with response-surfaces. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*

- (E120) Lee H.H., G. Cuzon, R. Chou, H.H. Heng and J. Guillaume (1997). Nutritional requirements of *Lates calcarifer*. Determination of the absolute requirements for digestible protein and energy. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E220) Martin J.L., J. Calvas and Aquacop (1997). A twenty-five years experiments in shrimp tropical island aquaculture. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E220) Nedelec G., E. Thouard and Aquacop (1997). Controlled year-round spawning of tropical Seabass *Lates calcarifer*, in captivité in French Polynesia. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E110) Cochard J.C., P. Garen, I. Heyvang, H. Lemonnier, A. Magliozzi and Aquacop (1997). Osmoregulatory capacity of *Penaeus stylirostris* as a tool for *in situ* evaluation of the toxicity of rearing pond sediment. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E110) Cochard J.C., P. Garen, I. Heyvang, A. Magliozzi and J. Moriceau (1997). Acute toxicity of rearing pond sediments on *Penaeus stylirostris*. *Int. Conf. Martinique 97, Island Aquaculture and Tropical Aquaculture, les 3 ilets, Martinique, French West Indies, May 4-9, 1997.*
- (E420) Bedier E., J.C. Cochard, G. Le Moullac, J. Patrois et Aquacop (1997). Sélection génétique et pathologie en pénéculture : l'approche génétique de la résistance aux pathogènes. *Papier présenté la WAS 97 à Seattle (U.S.A.).*

ARTICLES DE VULGARISATION

- (A310) Bodoy A. (1997). Comment poussent les nacres ? *Te Reko Parau, Vol. 6*, pp 5-9.

RAPPORTS INTERNES DRV RÉFÉRENCÉS

RAPPORTS FINAUX DE CONTRAT (CEE, FAO, CONVENTION)

- (A320) Garen P. et G. Cuzon (1997). « Déchets organiques et minéraux, alimentation, qualité du milieu et préservation de l'environnement dans les fermes de crevettes ». *Rapport final du Contrat CORDET*, 24 pp.
- (E110) Cochard J.C. (1997). SAN 619 F 240 OL : 96-hour toxicity study to two marine shrimps *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* under static conditions. *Rapport final du Contrat SANDOZ (NOVARTIS)*, 71 pp.
- (E220) Le Dean L. et J. Goguenheim (1997). Observations et évaluations des protocoles d'élevages larvaires et de constitution des stocks de géniteurs à l'Ecloserie Polyvalente Territoriale de Tahiti. Suivi du cycle de production d'Août 1997. 34 pp.

- (A410) Gangnery A. (1997). Aspects quantitatifs de la reproduction de la nacre. *Rapport de contrat, Proservice/ESITPA*, 94 pp.

AUTRES TYPES DE RAPPORTS

Missions à l'étranger et groupes de travail

- (E310) Le Moullac G. et D. Saulnier (1997). Mission en Equateur du 20 Octobre au 16 Novembre 1997. *Rapport de mission*, 15 pp.
- (E420) Bedier E. (1997). Mission effectuée au Cenaim (Equateur) du 31 Novembre au 12 Décembre 1997.
- (E420) Bedier E. et D. Saulnier (1997). Mission effectuée sur le projet Aquanova (Mexique) du 24 Août au 31 Août 1997. *Rapport de mission*, 17pp.
- (E420) (E120) Bedier E. et G. Cuzon (1997). Participation à la World Aquaculture Society à Seattle (USA). Conférence annuelle sur l'Aquaculture.
- (A320) Chim L. et G. Cuzon (1997). Aquaculture et Environnement. Physiologie nutritionnelle et alimentation. *Rapport de mission*, 28 pp.
- (E110) (E320) Soyez C. et J.C. Avarre (1997). Ecophysiologie et Pathologie. *Rapport de mission*, 14 pp.
- (A310) Bennett A. (1997). Rapport de mission à l'EVAAM de Rangiroa du 16 au 29/06/97, 8 pp.

Missions à la mer

Mémoires d'étudiants (DEA, ISPA, IUT, Maîtrise, Ingénieurs)

- (E310) Philip de Laborie L. (1997). Etude en conditions *in vitro*, *in vivo*, *in situ* des effets de deux substances immunostimulantes sur les défenses immunitaires de *Penaeus stylirostris*. *Rapport de stage DESS-Caen*, 99pp.
- (A310) Gangnery A. (1997). Etude *in situ* et expérimentale de l'effort de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. *Mémoire de fin d'étude E.S.I.T.P.A.*, 89 pp.

Documents de travail de laboratoire

- (E110) Cochard J.C., H. Lemonnier, E. Bernard, E. Boglio et C. Goarant (1997). Expériences 97 sur l'influence des sédiments du bassin d'élevage sur la physiologie de *Penaeus stylirostris*. *Rapport des travaux menés du 22 Février au 7 Mars 1997 à la Station de Saint-Vincent et du 7 au 20 Juin 1997 au Centre Océanologique du Pacifique*. 19 pp.
- (E110) Lemaire P. (1997). Etude de la charge énergétique adénylique sur deux espèces aquacoles : les crustacés *Penaeus stylirostris* et *Penaeus vannamei* et l'huître perlière *Pinctada Margaritifera*. *DRV/AQ/TAH 97.37*, 40 pp.
- (E110) Soyez C. (1997). Evaluation des conséquences d'une situation hypoxique simulée sur la Capacité Osmorégulatrice des crevettes d'élevage *Penaeus stylirostris* et *Penaeus vannamei*. *DRV/AQ/TAH 97.31*, 50 pp.

- (E410) Vonau V. (1997). Recherche de microsatellites chez la crevette *Penaeus stylirostris*. *Rapport de stage effectué à l'Université Montpellier II*, 56 pp.
- (E420) Viallon J. (1997). Analyse morphométrique et pondérale de *Penaeus stylirostris*. Conséquences pour la sélection divergente. *DRV/AQ/TAH 98.006*, 22 pp.
- (E110) Poulain M. et J. Viallon (1997). Etude de la croissance (1-20g) de *Penaeus stylirostris* en fonction du paramètre « température ». 18 pp.
- (E420) Pons B. (1997). Techniques de production de *Penaeus stylirostris* en captivité et contribution à la recherche de critères morphométriques de sélection précoce. *Rapport de stage*, 25 pp.
- (E410) Bedier E., N. Bierne et V. Vonau (1997). Etat d'avancement du programme de biologie moléculaire (utilisation des marqueurs microsatellites).

Plaquette, document technique, lettre aux médias,...

Rapports intermédiaires de contrat ou de convention

- (A410) Pouvreau S., A. Bodoy, D. Buestel, A. Bennett, X. Caisey, G. Haumani, G. Jonquière, D. Méro, S. Robert, H. Teissier et J. Tiapari (1997). Détermination du bilan énergétique chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* et premier modèle écophysio-logique de croissance dans le lagon d'atoll de Takapoto (Polynésie Française). Bilan des connaissances et avancée des travaux. 75 pp. *Rapport intermédiaire, convention de recherche sur le modèle de croissance de la Nacre, Programme Général de Recherche sur la Nacre, Service de la Mer et de l'Aquaculture, Territoire de Polynésie Française*.

Notes à DPMCM, régions, groupes de réflexion IFREMER ou autres

Projets de rapport interne DRV ou synthèse sur un sujet

THÈSE

- (E320) Le Groumellec M. (1997). Etude de la virulence de vibrions pathogènes chez les crevettes pénéides. *Thèse de Doctorat soutenue à l'Université Française du Pacifique le 6/02/97*. 173pp.
- (E110) Lignot J.H. (1997). Effets de deux polluants (l'oxyde de tributylétain et le fénitrothion) sur l'osmorégulation de crevettes pénéides (crustacés décapodes). *Thèse de Doctorat soutenue à l'U.S.T.L. Montpellier II le 21/03/97*.

BREVET