



**ETUDE DE LA CHARGE ENERGETIQUE ADENYLIQUE
SUR DEUX ESPECES AQUACOLEES LES CRUSTACES
PENAEUS STYLIROSTRIS ET PENAEUS VANNAMEI
ET L'HUITRE PERLIERE *PINCTADA MARGARITIFERA***

Pierrette LEMAIRE

1997



Centre Océanologique du Pacifique

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

- 5 NOV. 97-015255

ETUDE DE LA CHARGE ENERGETIQUE ADENYLIQUE
SUR DEUX ESPECES AQUACOLEES LES CRUSTACES
PENAEUS STYLIROSTRIS ET PENAEUS VANNAMEI
ET L'HUITRE PERLIERE *PINCTADA MARGARITIFERA*

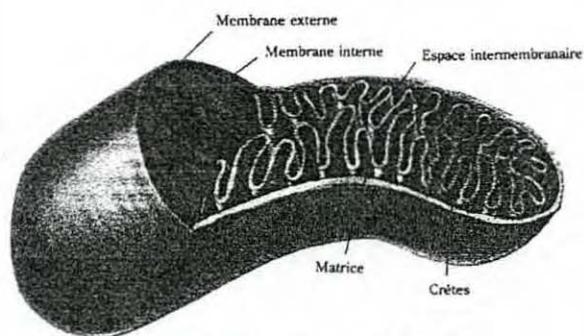
Pierrette LEMAIRE

1997

**ÉTUDE DE LA CHARGE ENERGETIQUE ADENYLIQUE SUR DEUX
ESPECES AQUACOLES LES CRUSTACES *PENAEUS
STYLIROSTRIS* ET *PENAEUS VANNAMEI* ET L'HUITRE
PERLIERE *PINCTADA MARGARITIFERA*.**

Pierrette Lemaire

1997



La mitochondrie siège de synthèse de l'ATP.

Type de rapport : Rapport interne	
Numéro d'identification du rapport : <u>DRV/AQ/TAH 97.37</u> Diffusion : libre. Validé par :	date de publication 1997 nombre de pages 40 bibliographie (Oui) illustration(s) (Oui) langue du rapport Français
Titre et sous-titre du rapport : ÉTUDE DE LA CHARGE ENERGETIQUE ADENYLIQUE SUR DEUX ESPECES AQUACOLEES LES CRUSTACES PENAEUS STYLIROSTRIS ET PENAEUS VANNAMEI ET L' HUITRE PERLIERE PINCTADA MARGARITIFERA.	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Lemaire Pierrette	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer COP Tahiti DRV/RA Aquaculture tropicale Ecophysiologie
Mots-clés : Aquaculture tropicale, péneides, mollusques, charge énergétique adénylique, stress.	
Résumé : La charge énergétique adénylique (CEA) est le reflet de l'énergie disponible dans les cellules. Ses variations ont été recherchées comme indice physiologique pour détecter un stress chez les crevettes péneides <i>P. vannamei</i> et <i>P. stylirostris</i> et chez l'huître perlière <i>Pinctada margaritifera</i> . L'étude a porté dans un premier temps, sur la recherche des conditions optimales de préparation des échantillons aussi bien pour les crevettes que pour la nacre et dans un second temps sur des variations dues aux stress. La plupart des stress induits (hypoxie, vibriose) ne provoquent pas de variations significatives de la charge énergétique des crevettes $p > 0.05$. Chez l'huître perlière une émergence à 20°C, 30°C et 40°C ($p < 0.05$) ou une baisse de salinité (10‰) ($p < 0.05$) font varier la CEA de façon significative.	
Commentaire :	

SOMMAIRE

1. Introduction	6
1.1 <i>Historique.</i>	6
1.2 <i>Rappel du métabolisme.</i>	8
1.2.1 Biochimie de l'ATP	8
1.3 <i>Présentation des travaux.</i>	12
2. Matériel et méthodes	13
2.1 <i>Matériel biologique.</i>	13
2.1.1 Les crevettes	13
2.1.2 Les nacres	13
2.1.3 Préparation des animaux.	14
2.2 <i>Protocoles de dosages</i>	14
2.2.1 Dosage des adénosines phosphates seules	14
2.2.2 Dosage des adénosines et de l'inosine monophosphate	16
2.2.3 Analyse des résultats.	18
3. Résultats	18
3.1 <i>Choix de la méthode de préparation des échantillons</i>	18
3.1.1 Méthodes d'ouverture de la nacre	18
3.1.2 Essais avec aplatisseur en aluminium (gaufrière)	19
3.1.3 Conservation des échantillons	20
3.1.4 Types de tissus	21
3.1.5 Méthode arrêtée	23
3.2 <i>Influence de différents stress sur la charge énergétique adénylique de la crevette et de la nacre.</i>	23
3.2.1 Chez la crevette.	23
3.2.2 Chez la nacre.	27
4. Discussion et conclusion	35
4.1 <i>Crevettes.</i>	35
4.2 <i>Nacres.</i>	36
5. Bibliographie	38

1. Introduction

1.1 Historique.

La perliculture ainsi qu'à une moindre échelle l'aquaculture de crevettes se développent en Polynésie. Les pratiques intensives en bassins pour les crevettes, les surcharges des filières pour les nacres dans les fermes perlières et d'une manière générale, les biomasses trop élevées sur un site aquacole, les manipulations diverses peuvent provoquer des baisses importantes des performances et une augmentation des risques d'épizooties. Elles demandent une connaissance plus poussée des conditions d'élevage et plus particulièrement des limites adaptatives de ces espèces

Il est souhaitable de pouvoir mesurer un indice physiologique permettant l'évaluation de l'état général des animaux. Un animal en situation de stress d'origine environnementale est contraint à une dépense énergétique considérable pour s'adapter à ces nouvelles conditions. Cette énergie est fournie au niveau cellulaire par la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate (AMP).

Dans le métabolisme, l'ATP est un élément essentiel des réactions enzymatiques. Le stock d'ATP cellulaire est sollicité de toutes parts mais un équilibre se crée naturellement dans le vivant. Chaque cellule vivante régule en permanence la balance entre les différents nucléotides. La charge énergétique adénylique (CEA) est le rapport entre ces derniers et mesure l'énergie disponible des cellules et donc des organismes.

$$CEA = \frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

La CEA a d'abord été une mesure de l'énergie directement disponible dans les cellules (Alkinson et Walton, 1967 et Bonsel et Pradet. 1967). Elle est en général très stable (Atkinson, 1977) et ne varie que lorsque les organismes sont placés hors de leurs limites adaptatives.

La CEA a été par la suite adoptée par Ivanovici (1980) et Romano et Daumas (1981) comme index pour estimer les conditions physiologiques des organismes. Les résultats d'expériences menées sur des micro-organismes indiquent que la CEA a des valeurs allant de 0,8 à 0,9 quand ils sont dans des conditions non stressantes, des valeurs de 0,50 à 0,75 indiquent un stress avec un retour possible à la normale, par contre au-dessous de 0,50 les organismes sévèrement stressés ne pourront revenir à l'état normal (Giesy et al., 1988).

Les investigations pour évaluer la CEA comme indicateur de stress ont montré qu'elle était altérée par des toxiques organiques et inorganiques chez des macro-organismes tels que des langoustes, des coquilles St Jacques et des poissons (Haya et al., 1980, Ivanovici and Wiebe, 1981, Giesy et al., 1983). Chez l'écrevisse, une forte diminution de la CEA de 0,90 à 0,50 est mesurée en fonction de la concentration en cadmium (Giesy, 1981).

Une diminution du pH peut provoquer une diminution de la CEA de 0,90 à 0,40 chez certains poissons selon l'organe concerné (Mac Farlane, 1980). Une pollution pétrolière n'entraîne pas de variation de CEA chez des mollusques, mais pour d'autres espèces, une diminution de la CEA par rapport à des témoins a été constatée à long terme (l'année suivante) (Shafer, 1987). Romano et Navarro (1985) ont étudié l'impact du collecteur de la ville de Marseille sur le benthos entre autre par le calcul de la charge énergétique adénylique. sur des fractions vivantes ou mortes du microplancton.

Ivanovici (1980), Wicjman (1976), Barthel (1984), Sylvestre (1988) ont décrit chez différents bivalves une diminution de la charge énergétique en réponse à l'émersion ou à l'anoxie. Le Coz (1989), étudiant la réponse de trois mollusques bivalves (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Pecten maximus*), a observé des chutes de la CEA dues à l'anoxie et à la saison.

Selon Paterson (1993), l'absence de fonctionnement du cycle purine nucléotide expliquerait pourquoi, l'inosine monophosphate (IMP) ne s'accumule pas chez les crustacés en condition physiologique normal. (l'activité de l'AMP désaminase est basse). L'accumulation d'IMP due à une pollution ou à un moyen de pêche ou à une conservation post-mortem suggère que l'activité de l'enzyme croît pendant le stress.

Paterson et Al (1995), ont noté que l'IMP se forme quand la crevette fatiguée continue à consommer de l'ATP à un taux plus rapide qu'elle ne peut restaurer la CEA. L'accumulation de l'IMP dans la crevette *P.monodon* et *P. esculentus* a été étudiée pour définir le rôle possible de ce composé dans la mesure de la fraîcheur ou bien de la détérioration biochimique de la crevette conservée après la pêche.

Depuis plusieurs années, la capacité osmorégulatrice (CO) des crevettes a été étudiée puis utilisée au COP comme indicateur d'état physiologique chez *Penaeus stylirostris* et *P. vannamei*. Son analyse a permis de définir les conditions stressantes chez ces animaux mais la méthode peut être considérée comme spécifique de ces crustacés qui sont de puissants osmorégulateurs, essentiellement par la régulation de leur milieu intérieur (hémolymphe). Elle ne pouvait en revanche être adaptée à l'étude du mollusque bivalve *Pinctada margaritifera* pour lequel il a été montré que cette régulation se fait au niveau cellulaire.

La charge énergétique adénylique pouvant théoriquement être considérée comme un indice universel du niveau énergétique des organismes et donc de leur état physiologique, ce travail a été engagé pour déterminer si la CEA varie au cours de stress provoqués artificiellement. La surcharge des lagons cause de pénurie alimentaire pour les nacres, les manipulations et le transport des naissains ainsi que l'émersion en vue de la greffe, la greffe elle même, sont autant de causes de stress possibles de ces nacres et, éventuellement, de variation de la charge énergétique. Chez les crevettes les conditions déjà définies comme stressantes sur la base des mesures de capacité osmorégulatrice ont servi de base à l'étude de l'influence du stress sur la CEA.

1.2 Rappel du métabolisme.

1.2.1 Biochimie de l'ATP

L'ATP est un nucléotide entrant dans la synthèse de l'ADN et des ARN. Il est composé d'un sucre (le ribose) portant une base pyrimidique (l'adénine) et une chaîne de trois phosphates.

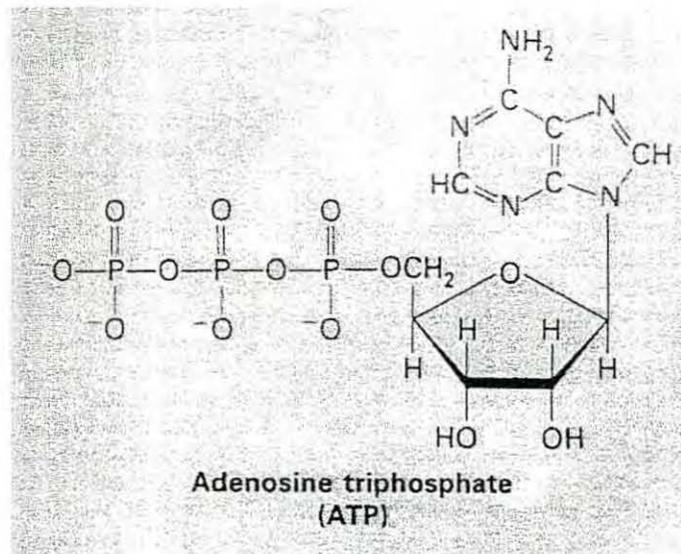


Figure 1 : Molécule d'ATP

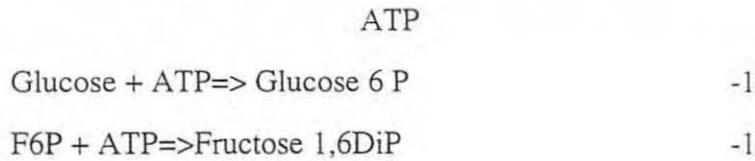
Cette molécule libère de l'énergie en perdant successivement deux de ses phosphates :

ATP (Adénosine triphosphate) --> ADP (A. diphosphate) --> AMP (A. monophosphate).

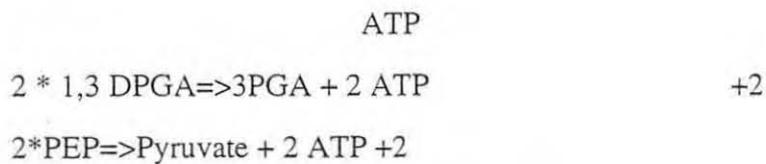
L'AMP est régénéré en ATP par la glycolyse et le cycle de Krebs ou la phosphorylation oxydative.

1.2.1.1 La glycolyse

Dans le cas de la glycolyse il y a d'abord utilisation de l'ATP.



Les produits finaux de la glycolyse le glycéraldéhyde 1,3 diphosphate et le phosphoénolpyruvate se dégradent respectivement en phosphoglycéraldéhyde et pyruvate avec production d'ATP.

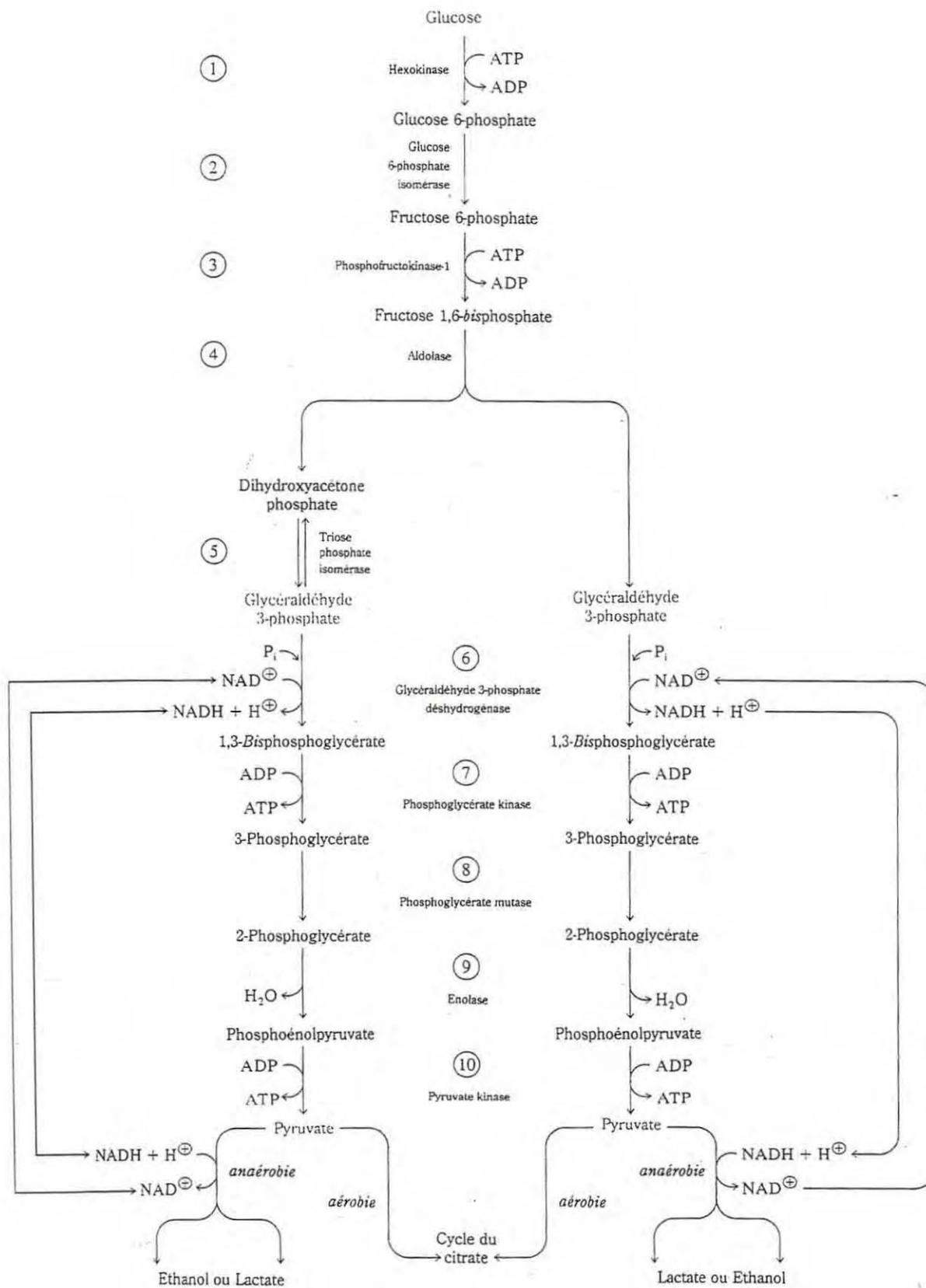


*DPGA= glycéraldéhyde 1,3 diphosphate

*PEP= Phosphoénolpyruvate.

Le bilan de ces réactions est un gain net de 2 moles d'ATP / par molécule de glucose.

Voir ci-dessous figure 2 : Schéma de la Glycolyse.



Cycle de Krebs

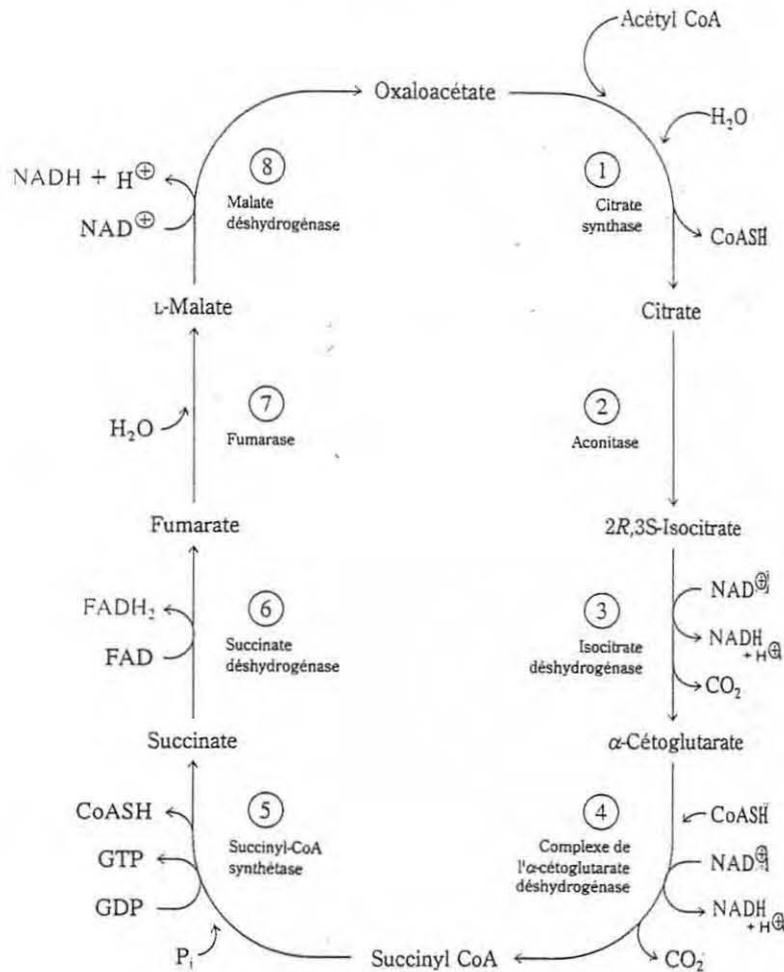
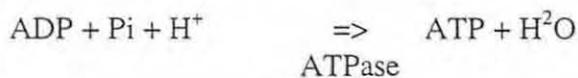


Figure 3 : Cycle de Krebs

1.2.1.2 La phosphorylation oxydative

L'adénosine diphosphate est phosphorylée par l'ajout d'un phosphore inorganique catalysée par l'enzyme ATPase :



La phosphorylation oxydative s'opère aussi sur différents nucléosides et, notamment l'inosine monophosphate qui donne l'AMP, celle-ci se transformant en ADP puis en ATP.

Mitchell (1960) conçut un modèle où le rôle de l'intermédiaire riche en énergie est joué par la force proton-motrice. La théorie chimiosmotique postule que le couplage de l'oxydation à la phosphorylation est indirect. Des protons sont transférés dans l'espace intermembranaire par les complexes de la chaîne respiratoire de transport d'électrons. Ces protons refluent alors, en descendant leur gradient de concentration, dans la matrice mitochondriale, en traversant un

canal membranaire formé par l'ATP synthase. La phosphorylation de l'ADP est ainsi couplée au retour des protons à l'intérieur de la matrice.

L'utilisation de l'ATP au niveau cellulaire se produit dans la mitochondrie.

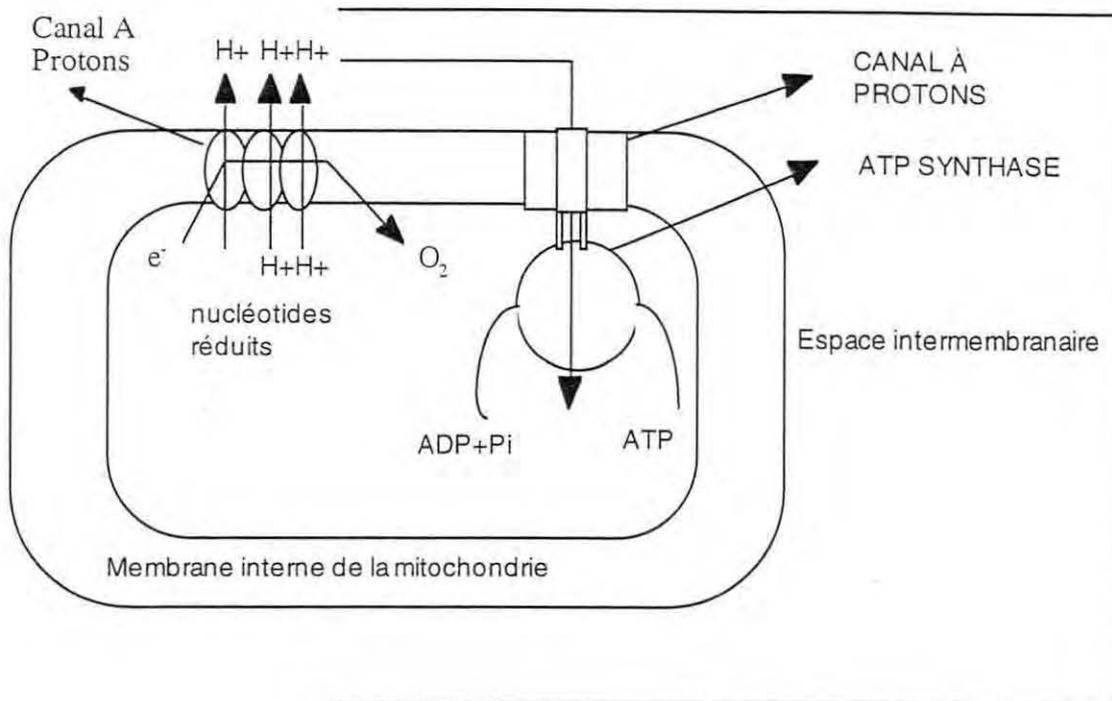


Figure 4 : Transduction d'énergie de la mitochondrie : Système dit de pompe à protons.

Les cellules qui, dans un organisme ont une dépense énergétique importante, se caractérisent par un nombre élevé de mitochondries. Un exemple d'augmentation de ces mitochondries a été observé par Lin (1993) dans les épipodites branchiaux de *Penaeus japonicus* exposée à un stress dû à la turbidité terrigène. L'épipodite exposé montre un fort épaissement des cellules épithéliales, une augmentation importante des invaginations de la membrane basale et des mitochondries. L'auteur émet l'hypothèse que le stress induirait une surproduction de mitochondries. Cela pourrait-il générer plus de pompes à protons donc de production d'ATP, pour pallier une chute de l'ATP due à un besoin accru en énergie, au moment du stress?

1.3 Présentation des travaux.

Ces travaux ont consisté en la mise au point de la méthode d'extraction et dosages des adénosines en vue de la mise en évidence des variations de la charge énergétique adénylique.

Ainsi, différentes parties de la crevette ont été testées dans un premier temps pour déterminer la zone de l'animal qui permet d'obtenir la meilleure CEA. La tête, la queue puis les branchies ont été successivement étudiés sur des individus non stressés. Dans un second temps les variations dues au stade d'intermue, au nourrissage, à l'hypoxie et à l'infection par un vibron (AM23) ont été testées sur ces espèces. Chez la nacre, il a fallu rechercher en premier lieu, le mode optimal de prélèvement (scalpel, couteau, « gaufrière »). Cette étape est importante puisqu'il est possible à ce niveau de provoquer un stress manipulateur susceptible de fausser les différentes observations. Pour obtenir le meilleur reflet de la CEA, les différentes parties de la nacre ont été déterminées. Les variations de la CEA dues à l'émersion simple ou couplée à la température, à la durée, et à la salinité ont été par la suite étudiées.

2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique.

2.1.1 Les crevettes

La position systématique des crevettes étudiées est la suivante :

EMBRANCHEMENT :	Arthropodes
SOUS-EMBRANCHEMENT :	Antennates (Mandibulates)
SUPER-CLASSE :	Crustacea
CLASSE :	Malacostraca
SUPER-ORDRE :	Eucarida
ORDRE :	Decapoda
SOUS-ORDRE :	Penaeidea
FAMILLE :	Penaeidae
GENRE :	<i>Penaeus</i> (Fabricius, 1789)
ESPÈCE :	<i>stylirostris</i> (Stimpson, 1874) <i>vannamei</i> (Boone, 1931)

Penaeus stylirostris et *Penaeus vannamei* se trouvent à l'état naturel, le long des côtes pacifique de l'Amérique latine; du Mexique (Baja) au Pérou pour la première et de Sonora au Mexique, jusqu'au nord péruvien pour la seconde (Holthuis, 1980).

Les cultures de *Penaeus stylirostris* et *Penaeus vannamei* sont pratiquées essentiellement en Equateur. La production équatorienne dépasse ainsi les 95.000 tonnes/an. La Colombie, le Honduras ainsi que le Mexique en produisent chacun environ 8000 tonnes/an. Le Pérou et les Etats-Unis en produisent respectivement. 3000 et 2000 tonnes/an.

Dans les TOM, la mise au point d'une technique semi-intensive a permis le développement de plusieurs fermes industrielles. La production est réduite puisque moins de 1000 tonnes sont produites chaque année essentiellement en Nouvelle-Calédonie (680 tonnes en 1993).

Les crevettes utilisées au cours des expériences ont été élevées au COP en bassin de terre. Leur âge était de 7 mois environ et leur poids était de l'ordre de 15 à 20 gr.

2.1.2 Les nacres

La position systématique de l'huître perlière est la suivante :

EMBRANCHEMENT:	<i>Mollusca</i>
CLASSE:	<i>Bivalvia</i>
ORDRE:	<i>Pteriodia</i>
SOUS-FAMILLE:	<i>Pteriicea</i>
FAMILLE:	<i>Pteriidae</i>
GENRE:	<i>Pinctada</i>
ESPECE:	<i>margaritifera</i> (Linné, 1758)
VARIETE:	<i>cumingii</i> (Jameson, 1901)

Cette espèce est communément appelée huître perlière à lèvres noires (« black lip pearl oyster » pour les anglo-saxons) ou nacre.

Les populations naturelles de *Pinctada margaritifera* se trouvent habituellement à l'intérieur des lagons, jusqu'à des profondeurs de 50m. Elles vivent fixées par leur byssus au substrat dur (corail vivant ou mort, débris de coraux ou de mollusques).

Les nacres sont élevées suspendues à des filières, à des profondeurs de 5 à 20m

Les animaux utilisés ont été élevés sur filière dans le lagon de Takapoto, puis transportés par avion sur le site de Vairao. Ils ont été entreposés en filières dans le lagon de Vairao. En début d'expérience, ils ont été placés sous des praticables de cages d'élevage de poisson près de la côte jusqu'au moment des prélèvements. Leur âge était de 24 mois environ et leur taille de 120 mm.

2.1.3 Préparation des animaux.

Les crevettes ont été stabulées dans des bacs expérimentaux de 60 ou de 300l avec renouvellement d'eau de mer, à une température moyenne de 28°C. Elles étaient nourries avec du granulé.

Les nacres ont été stabulées sous le ponton. Elles subissaient les fluctuations des eaux lagunaires et se nourrissaient dans le milieu marin. Les nacres mises à jeun étaient placées dans un bac de 300l avec un renouvellement d'eau de 20 l par heure.

2.2 Protocoles de dosages

2.2.1 Dosage des adénosines phosphates seules

La méthode utilisée dérive de celle qui a été décrite par Le Coz (1989).

Conditions expérimentales :

Les tissus à étudier ont été broyés sous glace à l'Ultra-Turrax[®] dans un volume d'acide trichloracétique (TCA) à 15% correspondant à 5 à 6 fois le poids de l'échantillon.

Après 30 mn d'extraction dans la glace, le broyat a été centrifugé à 8000tr/mn pendant 20mn, à 0°C. Un millilitre de surnageant a été prélevé et neutralisé par 3 ml d'amine-fréon. 500µl du neutralisant ont été repris dans un tube filtrant Eppendorf[®] 0,45µm et centrifugés 3 mn à 15000 tr/mn.

Méthode d'analyse des nucléotides en HPLC :

La séparation des différentes adénosines (ATP, ADP et AMP) est faite par chromatographie en phase liquide (HPLC : High Performance Liquid Chromatography) à l'aide d'une colonne Sphérisorb composée d'une phase stationnaire en C₁₈ avec garnissage apolaire de silice. Le volume de l'échantillon est de 20µl.

L'élution est effectuée en phase inverse avec appariement d'ions. Dans la phase inverse seule, l'ordre de sortie est (1) l'ATP très polaire, puis (2) l'ADP et enfin (3) l'AMP. L'appariement d'ions (le tétrabutylammonium) rend l'ATP apolaire et l'ordre de sortie devient (1)AMP, (2) ADP, (3) ATP lequel sort 70 mn après l'injection. Pour réduire l'élution à 25 mn, du méthanol est ajouté à l'éluant. La vitesse de passage de l'éluant est de 1ml/mn.

Composition de l'éluant :

Tampon phosphate (NaH₂PO₄(2H₂O) + tétrabutylammonium + méthanol pour 1 l d'eau analytique, pH ajusté à 6. L'éluant est filtré sous vide à 0,45µm ou dégazé sous hélium lors de son utilisation.

Réactifs :

Acide trichloracétique (TCA) : 150g dans 1 L d'eau analypur.

Eluant :

-Dihydrogénophosphate de sodium, $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$: 23,4g.

-Tétraabutylammonium : 2,8ml.

-Méthanol : 50ml

-Eau analypur QSP 1 L.

Matériel :

Pompe isocratique Spectraphysics
Boucle d'injection de 20 μ l,
Colonne Sphérisorb^e apolaire C18
Décteur UV Spectraphysics
Intégrateur Varian ou logiciel Borwin

2.2.2 Dosage des adénosines et de l'inosine monophosphate

Les chromatogrammes obtenus à partir de l'extraction au TCA sont bien séparés pour les adénosines, l'IMP est aussi bien séparé, par contre l'extraction de l'AMP est incomplète. Le pic d'AMP présente une trainée et donc une imprécision du calcul de la surface considérée. L'acide perchlorique préconisé dans le protocole d'analyses (Wong et al., 91) a donc été retenu comme système d'extraction.

Principe

L'extraction des nucléotides acides, nucléosides et bases se fait dans l'acide perchlorique refroidi à 0.6M et neutralisation par l'hydroxyde de potassium à pH 6.5-6.8, de l'homogénéisat produit. Les nucléotides sont séparés selon le principe de la phase inverse par une colonne ODS haute performance lichrosorb.

L'ordre de sortie des différents constituants est IMP(1), ATP(2), ADP(3), AMP(4) et hypoxanthine (Hx,5), la recherche de ce dernier constituant n' a pas été poursuivie, seule l'IMP nous interessait.

Profil d'un chromatogramme

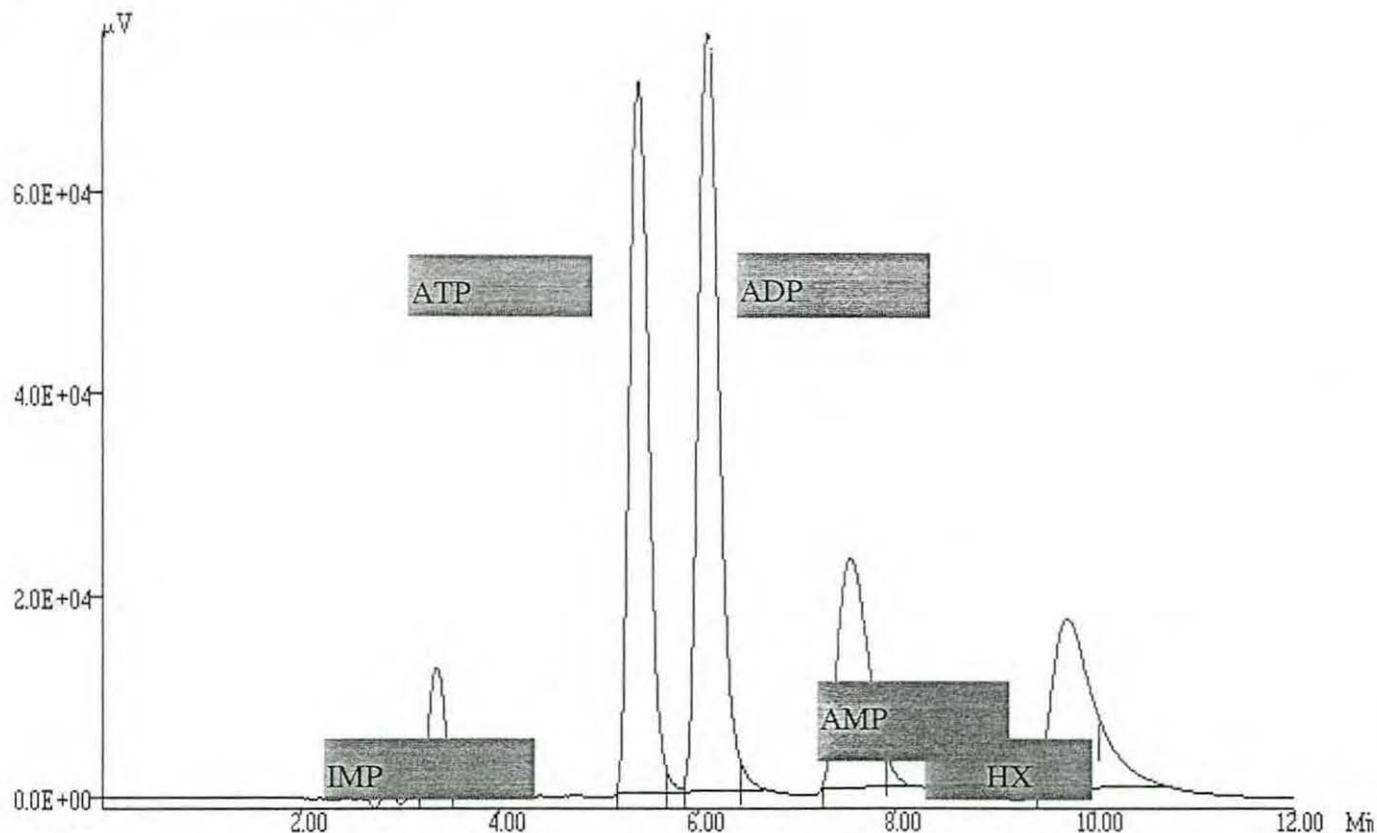


Figure 6 : Profil du chromatogramme d'un standard préparé et élué selon Paterson.

Procédure :

Les branchies des crevettes ont été prélevées, rapidement plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C .

Elles ont été homogénéisées à l'ultra-Turrax dans 1,5 ml d'acide perchlorique pendant 1 mn dans un tube Eppendorf. Le broyat a été centrifugé 15mn à 4000 rpm.

Le surnageant a été neutralisé à pH 6,5-6,8 par KOH 1,0M et 0,1M. La solution neutralisée a été laissée au repos 30 mn à 0°C .

La phase supérieure a été alors centrifugée à 15000 rpm pendant 3mn. Le surnageant a été alors conservé à -20°C en attente du passage en HPLC.

Réactifs :

Acide perchlorique 0.6M, conservé à 4°C .

Hydroxyde de potassium, 0.1M et 1.0M, pour neutraliser l'extrait.

Standard purine : inosine monophosphate.

Eluant:

Mélanger 0,04M de dihydrogenophosphate de potassium, (2,72 g/500ml) et 0,06M de phosphate dipotassique, (5,23 g/500ml). Cet éluant est à préparer chaque jour et à filtrer sur 0,45µm.

Matériel :

Un homogénéiseur Ultra-Turrax

Tubes à centrifuger.

Tubes à échantillon pour la neutralisation

pHmètre.

Tubes Eppendorf filtrant 0,45µm

Pompe HPLC, Détecteur Ultraviolet (254nm) et injecteur

Colonne phase inverse C18, longueur 25cm, Lichrosorb RP-18 Hibar 5µm.

2.2.3 Analyse des résultats.

Les résultats de CEA ont été analysés en Anova, à l'aide du logiciel Statview. La puissance expérimentale a été analysée avec le logiciel statgraphics.

3. Résultats

3.1 Choix de la méthode de préparation des échantillons

Les crevettes ont pu être traitées très rapidement et sans préparation particulière dès la sortie de l'eau. Pour les nacres, en revanche, le transport des animaux depuis les filières d'élevage, l'ouverture de la coquille puis la dissection a posé le problème de la stabilité de la CEA avant broyage. Différentes méthodes de préparation des animaux avant le broyage dans le TCA ont donc été étudiées.

3.1.1 Méthodes d'ouverture de la nacre

Trois individus ont été prélevés sur la filière et ouverts soit à l'aide d'un scalpel, soit à l'aide d'un écarteur de greffage soit encore d'un fort couteau de boucherie. Les chairs détachées rapidement de la coquille ont été directement plongées dans l'azote liquide. Après stockage pendant 3 jours à -80°C, elles ont été grossièrement concassées sous azote liquide et broyées dans le TCA à 0°C.

L'analyse des résultats montre une diminution significative de la CEA chez les nacres ouvertes au scalpel (Figure 2). Cette baisse semble être due au caractère laborieux et à la durée de l'opération d'ouverture de la coquille par ce moyen.

Tableau 1: Influence des différents procédés d'ouverture sur la CEA de la nacre.

	Nombre	Moy.	Ecart-type
Couteau	3	0,707	0,047
Pince	3	0,657	0,045
Scalpel	3	0,413	0,035

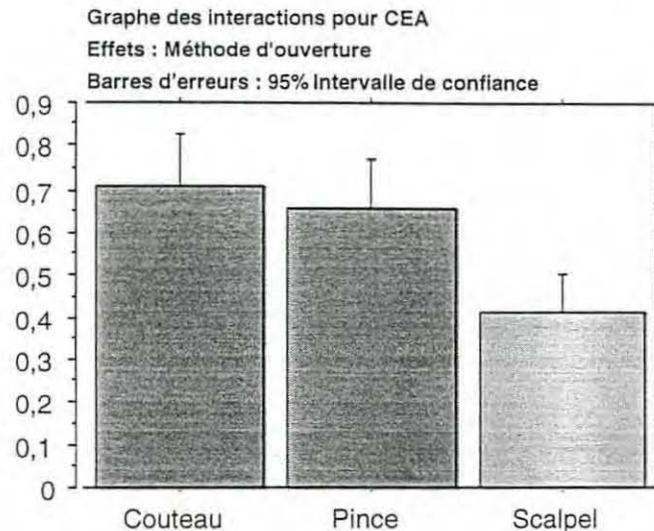


Figure 7 : Comparaison des CEA mesurées sur des nacres (n=3) ouvertes par différents procédés.

L'ouverture au scalpel provoque une diminution significative de la CEA ($p < 0,0003$).

3.1.2 Essais avec aplatisseur en aluminium (gaufrière)

Afin de la refroidir le plus rapidement possible, la chair des nacres a été aplatie à l'aide d'une gaufrière refroidie dans l'azote liquide immédiatement avant de les plonger dans l'azote liquide. Cette dernière est un appareil ménager dont les mâchoires ont été modifiées par l'adjonction de deux plaques d'aluminium permettant d'écraser la chair des nacres. Les nacres avaient été ouvertes au scalpel et leur chair détachées au couteau.

Avant le broyage, la chair congelée a été cassée grossièrement au mortier puis broyée dans l'azote liquide à l'aide d'un moulin à café. Sept nacres ont été aplaties de cette manière et neuf témoins ont été plongés dans l'azote liquide sans écrasement préalable.

Tableau 2: Influence de l'écrasement de la chair par la gaufrière sur la CEA.

	Nombre	Moyennes	Dev st
Gaufrière	7	0.536	0.055
Témoins	9	0.724	0.055

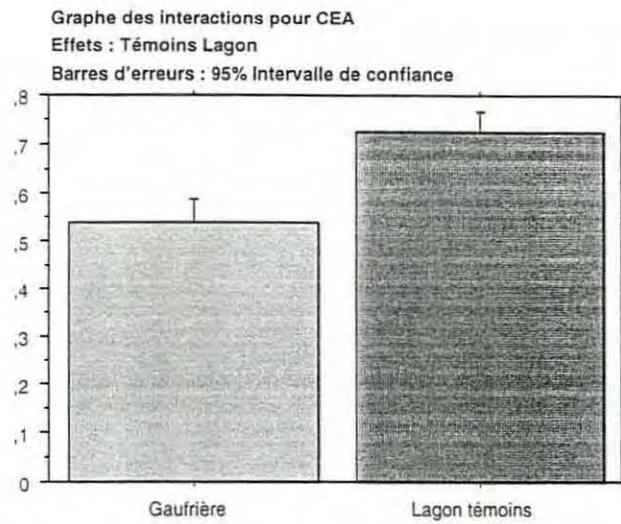


Figure 8 : Comparaison des CEA mesurées sur des nacres (n=7) ayant subi l'écrasement par la gaufrière (p<0,001).

L'hypothèse nulle d'égalité des moyennes ayant une très faible probabilité ($P < 0.0001$), elle est rejetée: l'écrasement à l'aide de la gaufrière n'améliore pas la détermination de la CEA. Cette méthode n'est pas satisfaisante car il faudrait une grande quantité d'azote liquide pour inclure totalement dans le liquide l'aplatisseur et la chair de nacre pour être dans de meilleures conditions de préservation de la CEA.

3.1.3 Conservation des échantillons

Des échantillons de crevettes broyés ont été conservés soit dans le TCA sans autre traitement, soit dans la glace (0°C) soit au congélateur (-18°C). Le protocole normal a été poursuivi après 3 à 24 h de délai. La CEA mesurée sur le même broyat, est présentée dans le Tableau 3. (n=3).

Tableau 3 : Influence de la conservation à long terme sur la CEA de trois échantillons broyés dans le TCA sans autre traitement.

	1 semaine	3 mois
Echantillon 1	0.795	0.810
Echantillon 2	0.891	0.870
Echantillon 3	0.878	0.880

Le stockage des broyats dans le TCA n'influe pas sur la CEA après une semaine à 3 mois à -80°C.

Temps	Nombre	Moyenne	Ecart-type
1 semaine	3	0.855	0.052
3 mois	3	0.853	0.038

L'hypothèse nulle est vérifiée ($p=0.97$), le temps de conservation n'influe pas sur la CEA.

Tableau 4 : Influence sur la CEA du stockage à court terme des broyats dans le TCA non traités.

Durée du stockage(heures)	Température	CEA
0	0°C	0.894
3	0°C	0.895
3	-18°C	0.900
24	-18°C	0.894

La conservation des échantillons, non traités directement à l'amine fréon, ne provoque pas de diminution significative au seuil de 5% de la CEA pendant 3 heures à 0°C ou 24 h à -18°C.

3.1.4 Types de tissus

Comparaison de la CEA de la tête et de la queue des crevettes

Le broyage des crevettes entières n'ayant pas permis d'observer une diminution de la CEA chez les crevettes stressées, une comparaison des CEA de la tête et de la queue a été envisagée chez les deux espèces.

Tableau 5 : Comparaison de la CEA de la tête et de la queue de *Penaeus stylirostris*.

	1	2	3	4	5	6
Tête	0.81	0.87	0.77	0.76	0.87	0.83
Queue	0.98	0.84	0.80	0.83	0.86	0.90

Tableau 6 : Comparaison de la CEA de la tête et de la queue de *Penaeus vannamei*.

	1	2	3
Tête	0.76	0.87	0.83
Queue	0.83	0.86	0.90

Aucune différence n'apparaît entre la CEA de la tête et de la queue. La tendance serait néanmoins à un plus fort taux de CEA dans le muscle de la queue. Cette grande stabilité peut être due à la présence dans les muscles de phosphagènes rechargeant l'ADP en ATP.

Essais sur les branchies des crevettes

Les branchies étant directement impliquées dans le processus d'osmorégulation par le fonctionnement de l'enzyme $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, il était raisonnable de penser que la baisse de la capacité osmorégulatrice chez les crevettes stressées soit la conséquence d'un déficit d'ATP et donc d'une faible CEA.

Au cours d'un test préliminaire, les branchies gauches et droites de 13 crevettes plongées dans de l'eau glacée (0°C) ont été comparées et l'opération d'ablation des branchies est aisée. Le volume de branchies est faible mais suffisant pour la préparation du produit et le passage en HPLC.

Tableau 7 : Valeurs des moyennes et écart-type de la CEA de ces branchies.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
Droite	14	0.825	0.049
Gauche	14	0.821	0.059

les parties gauches ou droites des branchies peuvent être utilisées indifféremment, l'hypothèse nulle est vérifiée avec une probabilité de $p=0.86$. Le fait de les traiter successivement n'a pas de conséquences sur la mesure de la CEA.

Relation entre le temps de réfrigération des branchies et la CEA

Les branchies d'un côté de la crevette ont été prélevées au temps zéro (T_0) et la crevette a été replacée dans un seau d'eau glacée pendant un temps en minutes (T_{mn}), au bout duquel la deuxième paire de branchies a été disséquée et broyée sur glace.

Douze crevettes étaient mesurées au temps T_0 , huit à 30mn.

Il n'y a pas de différence significative entre les différents temps de réfrigération et la CEA ($p=0,5587$). La puissance expérimentale était a priori suffisante pour les mesures à 30 mn

Tableau 8 : Résultats des moyennes pour la CEA de crevettes réfrigérées.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
0	5	0.884	0.072
30	5	0.852	0.092

A l'étude de statistiques, il apparaît que 66 échantillons seraient nécessaires pour rejeter l'hypothèse nulle et avoir une différence statistique entre les échantillons réfrigérés ou non.

3.1.5 Méthode arrêtée

Crevettes

La conservation des échantillons n'induit pas de changement de la CEA, et elle est stable dans l'acide trichloracétique à 15%, pendant plus de trois mois : une tête de crevette broyée dans le TCA à 15% et neutralisée à l'amine-fréon donne en moyenne une charge énergétique à 0,878, la CEA de ce même broyat conservé trois mois dans le TCA à -80°C ne varie pas au cours du temps (CEA = 0,88).

Les essais de mesure de la CEA, sur les têtes et les queues, puis sur la glande digestive et les branchies ont amené à choisir l'étude de la charge énergétique sur les branchies des crevettes. La neutralisation du broyat dans le TCA donne en outre un échantillon moins concentré, donc moins générateur d'encrassement de la colonne de séparation.

Les branchies ont donc été prélevées sur glace et placées dans l'azote liquide. Elles ont été broyées à l'Ultraturax dans deux ml de TCA froid sur glace puis centrifugées à 8000tr/mn, pendant 20mn à 0°C. A un ml de surnageant étaient ajoutés trois ml d'amine-fréon, l'ensemble était mélangé au vortex et 500µl de la phase supérieure étaient placés dans un tube Eppendorf® Filtrant Millipore 0.45µ et centrifugés 3mn à 15000tr/mn. A ce stade le neutralisant peut être conservé à -80°C plusieurs mois ou analysé, à raison d'un aliquote de 20µl injecté en HPLC.

Nacres

Les nacres ouvertes sur le terrain (au ponton), même placées immédiatement dans l'azote liquide ont une CEA significativement réduite.

La chair de la nacre garde par rapport au muscle une CEA plus élevée peut être en raison du forçage de l'ouverture.

Les nacres ont été transportées dans un seau d'eau de mer au laboratoire, elles ont été ouvertes au couteau ; la chair a été détachée sans le muscle, jetée dans l'azote liquide puis broyée au moulin à café que l'on avait refroidi avec un peu d'azote liquide. Le broyat (environ six fois le volume de la chair) a été récupéré dans le TCA froid.

A ce moment si une comparaison avec le taux de protéines est souhaitée, il faut tarer le récipient avec le TCA avant d'ajouter la chair et ainsi déterminer la quantité de matière qui sera broyée à l'Ultra Turrax.

3.2 Influence de différents stress sur la charge énergétique adénylique de la crevette et de la nacre.

3.2.1 Chez la crevette.

Stades

Deux stades de mues ont été comparés chez la crevette *Penaeus stylirostris*. Neuf individus au stade C ont été comparés à neuf crevettes au stade D2.

Tableau 9 : Valeur des moyennes et écart-type de la CEA de crevettes à différents stades.

	Nombre	Moyennes	Variance	Ecart-type
C	9	0.917	0.007	0.082
D ²	9	0.912	0.008	0.088

L'hypothèse nulle est vérifiée ($p= 0.91$), la CEA ne varie pas en fonction du stade d'intermue.

Effet du nourrissage

La CEA de deux lots de 8 crevettes a été mesurée au temps T_0 avant nourrissage et au temps 2h, 4h, 6h après le nourrissage.

Tableau 10 :Influence du nourrissage sur la CEA de la crevette.

	Avant nourrissage	2h après	4h après	6h après
N° 1	0.851	0.816	0.852	0.810
N° 2	0.872	0.869	0.846	0.880

Tableau 11 : Résultats des moyennes pour la CEA des crevettes après nourrissage.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
2 après nourrissage	2	0.843	0.037
4h après nourrissage	2	0.849	0.004
6h après nourrissage	2	0.845	0.049
avant nourrissage	2	0.861	0.015

Le nourrissage ne permet pas de mettre en évidence une diminution de la CEA. Le calcul du nombre d'échantillons nécessaires pour avoir 90 chances sur 100 de mettre statistiquement en évidence un effet au moins égal à celui observé ici est de 21 échantillons pour les 2 h, 46 pour les 4 heures, 26 pour les 6 heures. Il peut être conclu que le nourrissage ne perturbe pas la charge énergétique de la crevette.

Effet de l'hypoxie sur la CEA des crevettes.

- Interaction entre l'hypoxie(1,5ppm) et différentes parties de la crevette(T/Q).

Les crevettes *P. vannamei* ont été distribuées dans des bacs de 70 l thermostatés à 28°C munis d'un filtre biologique. Quatre crevettes ont été laissées 24h dans un bac en saturation d'oxygène et trois étaient placées dans un bac régulé à 1,5 ppm d'oxygène dissous, cette régulation de l'hypoxie a été celle mise au point au cours des expériences de capacité osmorégulatrice, (Charmentier G., Soyez C., Aquacop. (1994)). Au bout de 24h les crevettes ont été broyées, têtes et queues séparément.

Tableau 12 : Résultats statistiques des CEA de crevettes (têtes et queues) soumises à l'hypoxie.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
tête/queue	1	0.016	0.016	1.587	0.2364
hypoxie/normoxie	1	0.001	0.001	0.07	0.7965
Tête/queue, H/N	1	1.923E-4	1.929E-4	0.02	0.8915
résidus	10	0.09+8	0.010		

L'hypoxie ne provoque pas de variation significative de la CEA des crevettes quelle que soit la partie du corps considérée.

Tableau 13 : Moyennes et écart-types des CEA de crevettes(T/Q) en hypoxie.

	Nombrez	Moyenne	Ecart-type
Queue	7	0.856	0.047
tête	7	0.787	0.120

-Influence de l'hypoxie sur la CEA des branchies de crevettes

L'objectif de cete expérience était de vérifier que la CEA des crevettes placées en hypoxie ne revenait pas très rapidement à la normale dès que la crevette était sortie de l'eau et n'influaient pas sur la CEA des branchies des crevettes.

Les crevettes au nombre de 15 ont été distribuées dans des bacs de 60 l dont le taux d'oxygène dissous était régulé à 1, 3 et 6 ppm. Après 24 heures, elles ont été reprises dans les bassins, les branchies de gauche ont été disséquées au temps T0 et la partie droite a été prélevée aux temps T30mn.

Tableau 14 : Valeurs des moyennes et écart-types des CEA de crevettes ayant subi différentes durées et différentes concentrations d'oxygène.

	Nombre	Moy.	Ecart-type
1ppm	5	0,818	0,107
3 ppm	5	0,822	0,029
6 ppm	4	0,785	0,147

Quelles que soient les conditions de prélèvement aucune différence statistique ($p= 0,84$) n'apparaît en fonction du taux d'oxygène dont au moins un (1 ppm) pouvait être considéré comme stressant d'après les études de capacité osmorégulatrice.

- Etude de la variation de l'inosine monophosphate, après stress hypoxique sur la crevette *P.stylostris*.

Les mesures de la CEA ont montré une très forte homéostasie qui ne permet pas de mettre en évidence un état de stress chez les crevettes. Une autre voie a été envisagée pour tenir compte du produit de dégradation de l'AMP qui pourrait contribuer à maintenir l'homéostasie de la CEA. Dans ce cas, le rapport de la concentration en IMP sur le total ATP+ADP+AMP devrait augmenter sous l'influence d'un stress.

Les différentes procédures d'extraction des nucléotides, adénosines et inosine monophosphate ont été testées à l'acide trichloracétique et à l'acide perchlorique.

Les chromatogrammes obtenus à partir de l'extraction au TCA ont été bien séparés pour les adénosines, comme pour les études précédentes, l'IMP a été bien séparé, par contre l'extraction de l'AMP a été incomplète, une traînée au pic AMP a été observée, avec donc une imprécision du calcul de la surface considérée. Avec l'acide perchlorique la précision est meilleure c'est cette méthode qui a été retenue

Conditions expérimentales

Après la pêche, des crevettes de 19g de poids moyen ont été mises en stabulation dans des bacs de 70L, pendant 24H; à raison de 15 crevettes/bac. L'oxygène y a été descendue et maintenue à différents taux 0.5ppm, 1ppm et 5.8ppm pendant 6H.

Après 6 Heures, les branchies des crevettes ont été prélevées et rapidement plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Il n'a pas été noté de différence significative entre les lots à 0.5ppm, 1ppm, 5.8ppm. L'hypothèse nulle est justifiée ($p= 0.42$). L'hypoxie n'a pas d'influence sur une variation de la charge énergétique, ni sur une différence du rapport IMP/somme des adénosines.

Tableau 15 : Valeurs des moyennes et écarts-types des rapports IMP/somme des adénosines de crevettes en hypoxie.

	Nombre	moyenne	Ecart-type
0.5 ppm	14	0.365	0.046
1.0 ppm	15	0.389	0.149
5.8 ppm	14	0.441	0.218

Il n'y pas de différences significatives entre des crevettes stressées à 0.5ppm et 1ppm et des témoins à 5.8ppm, l'IMP n'a pas augmenté comme il avait été supposé.

- Effet du vibrio AM23 sur la CEA

Deux lots de 5 crevettes ont été infectés par injection de *Vibrio* AM23, un troisième lot (12 individus) servait de témoin, il a reçu une injection d'eau stérile.

Les crevettes ont été sacrifiées et les branchies disséquées au bout de 5h et 24heures. Dans ce dernier lot, deux crevettes ont survécu.

Tableau 16 : moyenne et écart-type des CEA de crevettes infectées au *Vibrion* AM23.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
Infectées 24h	2	0.700	0.141
Infectées 5h	2	0.808	0.081
Naïves	12	0.758	0.078

La CEA lue au bout de 5h d'infection restait inchangée. La faible survie des crevettes à 24 heures démontre qu'une pathologie a été déclenchée, en revanche il n'est pas possible d'affirmer ici que les deux survivantes étaient malades et donc que l'absence de modification de la CEA est due à la forte homéostasie de ce paramètre. La variation de la CEA n'est pas significative, $p= 0.3024$.

3.2.2 Chez la nacre.

- Comparaison des différentes organes de la nacre, chair, muscle et corps entier.

Dix nacres ont été prélevées sous le ponton à raison de quatre pour la chair, trois pour le muscle et trois pour la nacre entière.

Tableau 17 : Résultats statistiques de la CEA de différents tissus de la nacre

	DDL	Somme des carrés	carré moyen	valeur de F	valeur de p
Différents tissus	2	0.397	0.198	310.74	<0.0001
résidus	7	0.004	0.001		

La comparaison des différentes parties de la nacre (chair, entière ou muscle) donne une réponse significative ($P < 0.0001$) et le muscle est l'organe le plus sensible à une chute de la CEA, avant même une opération de stress.

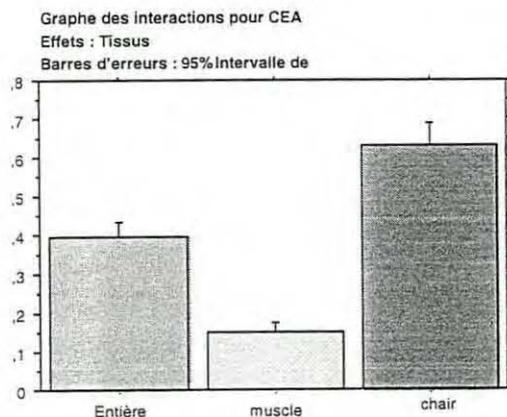


Figure 9 : Comparaison de la CEA de différents tissus de la nacre.

Tableau 18 : PLSD

	Ecart moyen	Ecart critique	valeur de p	signification
Entière/muscle	0.247	0.049	<0.0001	s
Entière/chair	0.233	0.046	<0.0001	s
Muscle/chair	0.480	0.046	<0.0001	s

Les différentes parties de la nacre, :la chair ,le muscle et la nacre entière, donne avec la PLSD une différence significative pour les 3 lots: $P < 0,0001$. La Cea est en générale basse sur les 3 catégories.

La chair sera donc retenue pour définir la teneur de la CEA

- Comparaison des nacres à jeun et des nacres nourries.

Les 9 nacres nourries ont été simplement prélevées au bout de 3 semaines sous le ponton; tandis que les 9 nacres non-nourries (à jeun) ont été mises en stabulation 3 semaines également dans un bac de 300l en salle de manipulation fine avec un léger renouvellement d'eau de mer pour éviter une pollution du bac (2 étaient mortes au bout de 3 semaines dans le bac).

Ce test du jeûne n'est pas probant, l'anova donne une probabilité de $P = 0,37$. Il n'y aurait donc pas de différence significative entre les deux lots nourri ou à jeun. On peut émettre une réserve quant à l'apport d'eau minimum dans le bac à jeun pouvant amener un léger apport de nourriture.

Tableau 19 : Valeurs des moyennes et écart-types de la CEA de nacres à jeun ou non.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
Jeun	7	0.697	0.063
Nourries	9	0.724	0.055

- Influence de l'anesthésie sur la nacre.

Six nacres ont été ramenées une à une du ponton en seau d'eau de mer, en attente d'ouverture sur la paillasse puis elles sont plongées dans le chlorure de magnésium à 30 ppt, pendant 5mn puis sacrifiées par le procédé habituel. Tandis que les dix nacres témoins ont été portées du ponton sans cette anesthésie.

Tableau 20 : Valeurs des moyennes et écart-types des nacres anesthésiées ou non.

	Nombre	moyennes	Ecart-type
Anesthésie	6	0.848	0.053
Témoins	10	0.814	0.033

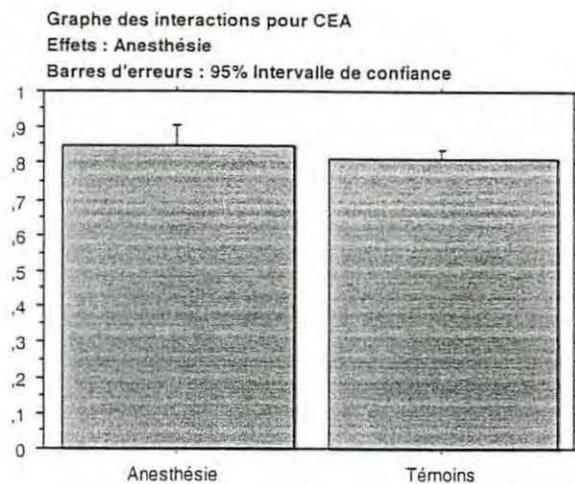


Figure 10 : Comparaison des nacres anesthésiées ou non.

L'anesthésie de la nacre par le chlorure de magnésium ne provoque pas de variations de la CEA comparée à celle des témoins, L'hypothèse nulle est vérifiée, $p = 0,133$.

Selon l'analyse statistique, une CEA plus stable que celle obtenue avec les témoins pourrait être atteinte à l'anesthésie avec une différence significative, si le nombre de nacres anesthésiées était de 17. L'anesthésie préalable à l'ouverture de la nacre semblerait bénéfique pour la tenue de la charge énergétique adénylique.

- Influence de l'émersion à 40°C.

Vingt-huit nacres ont été amenées du ponton au laboratoire dans un seau d'eau de mer, toutes les nacres ont été déposées à l'étuve à 40°C en atmosphère humide (petite coupelle d'eau), puis elles ont été retirées 5 par 5 respectivement au bout de 1h, 3h, 4h, 5h.

Tableau 21: Valeurs des moyennes et écart-types des CEA de nacres soumises à l'émersion à des temps de 1h à 5h, à 40°C.

	Nombre	Moyennes	Ecart-type
5H	5	0.460	0.169
4H	5	0.750	0.056
3H	5	0.6897	0.059
1H	5	0.713	0.054

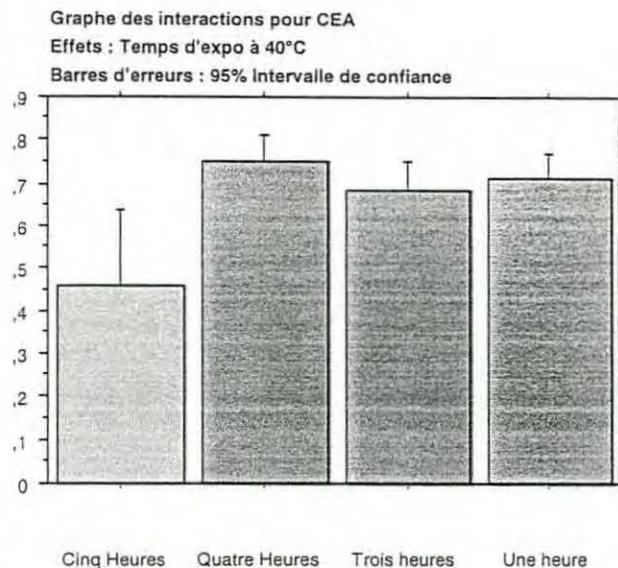


Figure11: Influence du temps d'émergence à 40°C sur la CEA de la nacre.

PLSD de Fisher pour CEA
Effets : Temps d'expo à 40°C
Niveau de signif. 5 %

	Ecart moyen	Ecart critique	Valeur de p	
Cinq Heures, Quatre Heur...	-,290	,118	<,0001	S
Cinq Heures, Trois heures	-,227	,118	,0007	S
Cinq Heures, Une heure	-,253	,118	,0002	S
Quatre Heures, Trois heu...	,063	,118	,2750	
Quatre Heures, Une heure	,037	,118	,5232	
Trois heures, Une heure	-,027	,118	,6416	

Les nacres émergées 1h, 3h, 4h, 5h à 40°C humide donne avec l'Anova une réponse significative : $P=0,0002$.

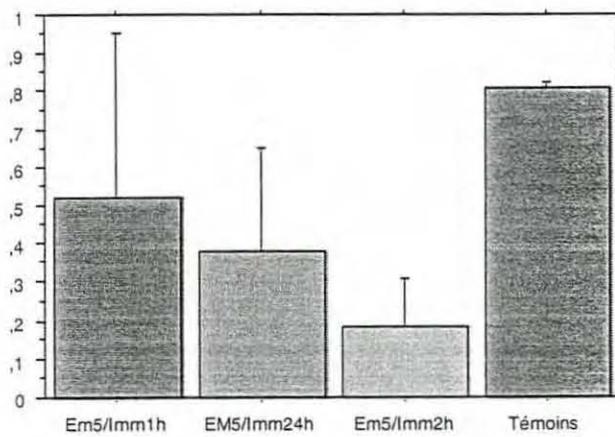
- Influence de l'émergence passagère 5 H à 42°C, couplée à une réimmersion à 28°C, pendant une période de 1H à 24H.

Huit nacres ont été émergées 5h à 42°C au-dessus d'un bain-marie, le premier lot a été réimmergé 1h dans un bac 60L à 28°C, le deuxième lot a été réimmergé 2h et le troisième lot 24h.

Tableau 22 : Valeurs des moyennes et écart-types des CEA de nacres à l'émergence couplée à la réimmersion.

	Nombre	Moyennes	Ecart-type
Em5/Imm1h	3	0.520	0.174
Em5/Imm24h	3	0.380	0.108
Em5/Imm2h	2	0.180	0.014
Témoins	4	0.814	0.010

Effets : Emmersion à 42°C 5h et Immersion à 28°C-1h à 24h.)



PLSD de Fisher pour Colonne 2

Effets : Em/Imm

Niveau de signif. 5 %

	Ecart moyen	Ecart critique	Valeur de p
Em5/Imm1h, EM5/Imm24h	,140	,194	,1341
Em5/Imm1h, Em5/Imm2h	,340	,217	,0068
Em5/Imm1h, Témoins	-,287	,181	,0064
EM5/Imm24h, Em5/Imm2h	,200	,217	,0658
EM5/Imm24h, Témoins	-,427	,181	,0006
Em5/Imm2h, Témoins	-,627	,205	,0001

Figure 12 : Comparaison des CEA de nacres émergées 5h à 42°C et réimmergées de 1h à 24h à 28°C.

L'émergence suivie de la réimmersion, donne une réponse significative avec le test d'Anova ($p=0,0005$). La comparaison des lots avec la PLSD donne d'une part une différence significative entre tous les traitements et les témoins et d'autre part entre 1h et 2h ($P=0,0068$).

- Influence de la température sur la nacre en émergence.

Les nacres ont été déposées respectivement pendant 5 heures, deux sur la paille au laboratoire à 20°C, 3 ont été laissées à l'extérieur à 30°C et 11 nacres ont été mises à l'étuve à 40°C en atmosphère humide

Tableau 23 : Valeurs des moyennes et écart-types des CEA à différentes températures.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
20°C	2	0.845	0.064
30°C	3	0.797	0.025
40°C	11	0.425	0.155

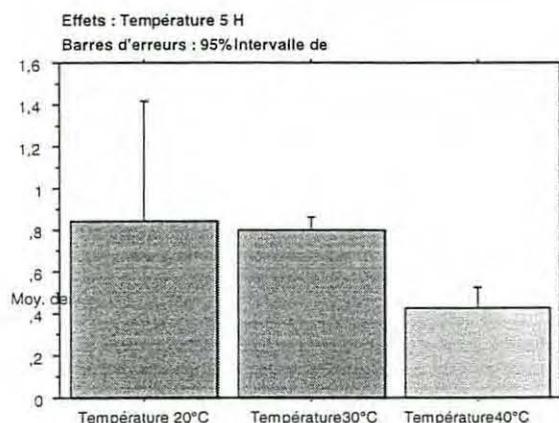


Figure 13 : Comparaison de la CEA des nacres soumises à différentes températures à l'émergence.

Il y a une différence significative entre les 3 lots 20, 30, 40°C ($p=0,006$). La PLSD nous donne une différence significative entre l'émergence à 20°C et celle à 40°C ($p=0,0016$), ainsi qu'entre l'émergence à 30°C et 40°C ($p=0,0011$).

- Influence de l'émersion à l'extérieur du laboratoire et de sa durée.

Quatre groupes de trois nacres subissent l'émersion à l'extérieur respectivement pendant 2h, 4h, 8h, 10h.

Tableau 24 : Valeurs des moyennes et écart-types de la CEA des nacres exposées à différentes températures externes et dans le temps.

	Nombre	Moyenne	Ecart-type
10h	3	0.847	0.045
1h	3	0.707	0.127
2h	3	0.727	0.04
4h	3	0.797	0.025
8h	3	0.820	0.052

Cette étude ne donne pas une différence significative à l'Anova : $p=0,12$.

- Influence de la salinité sur la CEA.

Trois bacs de 60l ont été amenés à différentes salinités par adjonction de sel de mer artificiel et dissous dans de l'eau douce, ils ont été placés en circuit fermé avec pompe filtrante sur corail et thermostatés à 28°C. Trois nacres ont été déposées au fond de chaque bac, pendant 24h

Tableau 25 : Valeurs des moyennes et écart-types des Cea de nacres à différentes salinités.

	Nombre	Moyennes	Ecart-type
10‰	3	0.550	0.0336
37‰	3	0.753	0.09
43‰	2	0.850	0.028

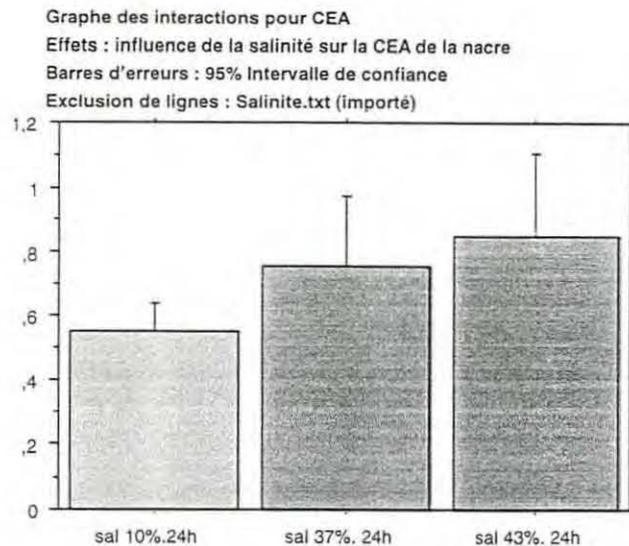


Figure 14 : Comparaison des CEA de nacres soumises à différentes salinités.

Il existe une différence significative entre les trois traitements ($p= 0.0073$). Les 3 lots ayant subi 10 ‰, 37 ‰ ou 43 ‰, donnent une réponse à la PLSD significative pour les lots deux à deux: 10-37 ($p= 0.0106$) et 10-43 ($p= 0.0034$). Le test-t séries non-appariées est de 0,022 pour 10 ‰ et 37 ‰, ($p=0,0023$) pour 10 ‰ et 43 ‰ et de 0,25 entre 37 ‰ et 43 ‰ ce dernier résultat s'expliquerait par les valeurs de ces salinités assez proches pour ne pas induire de variation de la CEA.

4. Discussion et conclusion

4.1 Crevettes.

Après étude des différents compartiments, le modèle « branchies » a été retenu pour l'étude de la charge énergétique sur les crevettes stressées. En effet, la queue de la crevette a donné une charge énergétique élevée et difficile à faire chuter, la réserve en phosphagène de la queue étant importante. Par ailleurs, l'hépatopancréas a été abandonné du fait de l'encrassement des colonnes de séparation de la chromatographie. Les stress opérés sur la crevette ne permettent pas de déceler une variation de la charge énergétique, comme il était attendu au préalable. Ainsi le jeûne, une forte baisse d'oxygène, la baisse de température et une infection sévère ne provoquent pas de variation significative de la CEA.

La charge énergétique adénylique de ces crevettes semble avant tout assujettie à l'importante régulation existant au niveau des différentes réactions biochimiques de la cellule vivante : cycle de Krebs et métabolisme intracellulaire de l'ATP. Cette perturbation attendue de la charge énergétique n'a peut-être pu s'exprimer du fait de cette régulation importante. En effet, des stress similaires ont été opérés sur les crevettes et testés par leur variation de la pression osmotique (exemple de l'hypoxie à 6H). Le plus souvent, une gêne provisoire avec augmentation de la pression osmotique suivi d'un retour à la normale ont été observés. La crevette semblait avoir surmonté le stress.

Les travaux de Paterson (1993) sur l'augmentation d'un corps de dégradation de l'adénosine monophosphate, l'inosine monophosphate, lors d'un stress par émersion, nous ont interrogé sur la possibilité du calcul erroné du rapport de la CEA. L'AMP aurait pu être masqué par son passage en IMP. Les stress de routine (stress hypoxique et ammoniac) appliqués pour cette étude n'ont peut-être pas été d'un choix judicieux et la crevette réagirait différemment selon la

nature du stress, l'émersion aurait pu également être choisie, mais ce stress ne se rencontre pas en temps normal sur les crevettes en élevage.

Les résultats non significatifs obtenus en réponse à différents stress, nous amènent à une conclusion analogue à celle de Lin (1993) : pour les pénéides et dans nos conditions expérimentales d'élevage, la CEA ne s'avère pas être l'outil le plus performant pour détecter un état de stress. Cependant nous pouvons émettre une réserve tant que des tests plus poussés ne seront pas poursuivis. Paterson (1993) a montré qu'il y avait une forte chute de la CEA pour *Penaeus esculentus* à la capture au chalut. Il a aussi démontré chez *P.monodon* une augmentation de l'inosine monophosphate (IMP) due à une désamination de l'AMP, parallèlement à une chute de la CEA, au cours du transport sur sciure de bois.

4.2 Nacres.

L'étape de la recherche du broyage optimum était nécessaire, car l'appareil de broyage au froid (Dangoumeau) préconisé par le Coz faisait défaut.

La charge énergétique adénylique de la nacre a diminué en réponse à plusieurs stress. Des durées d'émersion à 40°C de 1h à 5h ont donné une réponse significative, l'émersion à 42°C, couplée à une réimmersion a donné une réponse significative pour les lots 1h et 2h a provoqué une diminution significative de la CEA. Les nacres émergées à différentes températures ainsi que celles soumises à des salinités décroissantes ont permis d'enregistrer des variations significatives de leur CEA. Toutes ces réponses ont été obtenues suite à l'application d'un stress sévère.

Les premiers résultats de la charge énergétique sur les nacres avec la mise en évidence de sa faible valeur (0,75) a orienté le travail dans un premier temps sur la fiabilité des broyages et autres préparations. Cette première approche ayant été affinée le taux moyen pour les témoins anesthésiés ou non de la CEA comprise entre 0,80 à 0,85 conforte l'idée que la nacre ne peut atteindre des valeurs aussi élevées que celles que l'on rencontre chez la crevette. (0.85 à 1).

Plusieurs suppositions concernant cette valeur des témoins sont envisageables :

Le stress à l'ouverture de la nacre (p30), de meilleurs résultats seraient obtenus avec l'anesthésiant.

Le stress dû à la période de reproduction serait à vérifier en mesurant des petites nacres non matures sexuellement et des nacres matures adultes. Ce taux à 0,80 pour la nacre ne serait-il pas lié à un phénomène de reproduction? En effet, la période de reproduction peut-être pour les mollusques une cause de baisse énergétique adénylique ceci pouvant s'expliquer par une plus grande activité générale de l'animal (Le Coz, 1989). Sachant que chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* la période de reproduction est étalée sur toute l'année (Thielley. M. 1993).

D'autres stress seraient à poursuivre :

L'étude du transport d'huîtres à sec entre deux sites; En période de pontes, la charge énergétique étant plus faible (Le Coz, 1989), il est intéressant de contrôler la CEA lors d'un transport d'huîtres, à sec entre deux sites, (cas de *C. gigas* en juillet: un court temps d'émersion de 3h met l'animal en position critique).

L'étude du transport et de la greffe. Une étude de la CEA, avant et après l'émersion avec l'ouverture de la nacre en vue de la greffe et jusqu' à 3 mois de réimmersion, serait intéressante à reproduire également avec des nacres « protégées » par l'anesthésiant.

La fragilité des petites nacres au cours de leur mise en élevage. La fragilité des petites nacres est aussi à vérifier lors des manipulations des premiers mois (naissains et mise en filière sur des animaux de 6 à 8 cm).

L'anoxie couplée à la température, avec des températures d'émersion subies sur le terrain et la prolongation de la durée d'émersion à 72h. La privation d'oxygène influence différemment certains organismes. Ainsi, l'huître *C. gigas* peut survivre plusieurs jours en anaérobie, grâce au catabolisme des acides aminés et du glycogène. La moule (*Mytilus edulis*) hors de l'eau voit sa CEA passée de 0,85 à 0,68. De manière générale, les mollusques ont une chute encore plus importante de leur CEA si l'anoxie est couplée à une augmentation de la température. Les coques émergées 12h passent de 0,90 à 0,80 mais peuvent retrouver leur niveau initial en 1h. L'émersion des animaux couplée à une forte augmentation de la température provoque une diminution significative de la CEA. Certains auteurs (Wijsman, 1976) poursuivent l'anoxie jusqu'à 72h, il y a là matière à réflexion pour une étude plus poussée de l'anoxie sur les nacres.

L'étude de la salinité couplée à la température. Les fluctuations de salinité chez la nacre peuvent aussi induire des diminutions significatives de la CEA. Chez les mollusques gastéropodes (Ivanovici, A. (1980a), elle passe de 0,82 à 0,50 quand la salinité baisse de 34‰ à 17‰ et 5‰ avec retour à la normale quand les conditions optimum sont revenues. Mais la température a un effet aggravant au-dessus de 29°C et il n'y a plus de retour à la normale. Les variations de température induisent chez plusieurs espèces une chute de la CEA. La moule voit sa CEA tomber à 0,55 quand la température passe de 13°C à 22°C (à 34‰), mais s'il y a un choc conjugué température - salinité, la CEA passe à 0,45. Si la salinité passe de 34 à 18‰, il n'y a pas de retour à la normale. Chez les nacres, la température semble être un facteur perturbant de la CEA. D'autres études plus fines peuvent être conduites avec là aussi une gamme plus complète de températures.

Il nous est possible de conclure que ce paramètre étudié a répondu aux stress choisis. Cependant, il serait intéressant d'étudier des stress moins violents.

Plusieurs résultats sont significatifs et demandent une étude plus approfondie pour établir des tests sûrs avec une puissance expérimentale plus élevée. D'autres stress peuvent être envisagés, notamment le stress au moment de la greffe, 1h, 5h, 24h, 72h après.

La charge énergétique peut être un bon indicateur à long terme du dysfonctionnement dû à la pollution sur certaines espèces et non pas sur d'autres; il est normal de connaître les variations de la CEA sur une espèce avant de conclure.

Bien sûr, cet outil n'a pas la maniabilité et la rapidité de la capacité osmorégulatrice pour les crevettes, mais nous permet à force d'investigations de voir réagir les nacres au niveau biochimique à divers facteurs stressants. Cet outil est le seul donnant une indication de l'état physiologique de la nacre après un stress.

5. Bibliographie

- Atkinson D.E.,(1977). Cellular energy metabolism and its regulation- *Acad Press New York*: 293.
- Bomse J.P., Pradet A., (1968). Study of Adenosine 5' mono, di et tri phosphates in plant tissues. *Biochem. Biophys.acta*, 162: 230-242.
- Charmentier G., Soyez C and Aquacop., (1994). Effects of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, 178 : 233-246.
- Coste P., Chaisemartin C.,(1986). Action de la microsporide *thelohania contejani* sur la charge énergétique adénylique de l'écrevisse hôte: *Austropotamobius palipesle*. *C.R.Acad. Sc Paris*, 303, série 3, n°5: 171-174.
- Barthel D., (1984). Etude de la CEA sur trois bivalves marins en cours d'anoxies. *Ophelia*, 23-2 : 155-164.
- Furusho S and al., Changes in the concentration of ATP- related compounds and lactic acid in muscle of live prawn *penaeus japonicus* during storage in sawdust. *Nippon. Suisan. Gakkaishi*. 54 : 1209-1212.
- .-Giesy and Al., (1981).Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans : responses to physical and chemical stressors. *Chemical limnology*, 21 : 205-220.
- .-Giesy J.P., and al., (1983). The effects of season and location on phosphoadenylates concentrations and adenylate energy charge in two species of freshwater clams. *Oecologia*. 49 : 1-7.
- Haya K., Waiwood B.A.,(1983). Adenylate energy charge and ATPase activity of lobster *Homarus americanus* during sublethal exposure to zinc. *Aquatic toxicology*, 3 : 115-126.
- Ho and al., (1986). Effect of modified ice storage on the shell life of shrimp. *Bull. Jap. Soc. sci. Fish*. 52 : 479-488.
- Ivanovici A.M., (1980a). The adenylate energy charge in the estuarine mollusc *Pyrazus ebeninus* . *Laboratory studies of responses to salinity and temperature*. *Comp. biochem. physiol.* 66A: 43-45.
- Ivanovici A.M and Wiebe, W. J. (1981). For a working definition of « stress » : A review and critique. *In Barrett, G. W and Rosenberg (Eds), Stress effects on National Ecosystems*. *Wiley. New-York*, pp13-27.
- Le Coz J.R., (1989). La charge énergétique adénylique; mise au point, application à trois mollusques bivalves, synthèse et perspectives. *Mémoire Ifremer DRV, Brest* : 104p.
- Lignot J.H., (1995). La capacité osmoréglatrice chez *P Stylirostris* et *P. vannamei*. *Rapport d'activité Janvier-Décembre 1995 à l'Ifremer de Tahiti*, p25 à 34.
- Lin H., (1993). Effets de deux facteurs de stress (azote ammoniacal et turbidité terrigène) sur le métabolisme hydrominéral chez la crevette *P.Japonicus*. *Thèse de l'université de Montpellier II* : 181p.
- Mac Farlane R.B., (1980). Alterations in adenylate nucleotides metabolism in the gulf kill fish *Fundulus grandis* induced by low Ph water. *Comp. biochem. Physiol*, 68 : 193-302.

- Mitchell P., (1960).. La théorie chimiosmotique relie la force proton-motrice à la synthèse d'ATP. In Livre de Biochimie (Rawn) p377, Towson state university, Ed universitaire.
- .-Mongodin M.E., (1995). Consequences physiologiques d'infections bactériennes expérimentales chez *P. Stylirostris*. Rapport de stage à l'Ifremer Tahiti.RS7, p1 à 25.
- Nakamura K., Ishikawa S., (1986). Changes in freshness of Kuruna prawn muscle during chill- storage. *Bill. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab*, 120 : 69-72.
- Paterson B D., (1993).The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon* stressed by storage out of water.*Comp. biochem. Physiol*, 106B, n°2: 395-400.
- Paterson B. D., (1995).Inosine monophosphate(IMP) concentration in shrimp flesh cannot be used as an index of « freshness » when comparing shrimp that have been harvested in different ways. *Journal of Aquatic Food product Technology*, 4 : 3.
- Riaz Fatima., Bilquis Farooqui., R.B. Qadri., (1981). Inosine monophosphate and hypoxanthine as indices of quality of shrimp *Penaeus merguensis*. *Journal of Food Science*, 46 : 1125-1127.
- Ryder J.M., (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food. Chem*, 33 : 678-680.
- Romano J.C., Navarro A., (1985). Utilisation des mesures de charge énergétique d'ETS et 14-C assimilation pour le suivi de l'activité microplanctonique dans les eaux côtières sous l'influence de rejets urbains. *Mar. Biol*, 87 : 229-238.
- Shafer T.H., Hackney C.T., (1987). Variation in adenylate energy charge and phosphoadenylate pool size in estuarine organisms after an oil spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 38: 753-761.
- Suwetja K, and al. (1989). Changes in content of ATP-related compounds, homarine and trigonelline in marine invertebrates during ice storage. *Nippon. Suisan. Kagaishi*. 55: 559-566.
- Sylvestre C., (1987). Evolution de la charge énergétique adénylique de *Mytilus edulis* en fonction de divers facteurs de l'environnement. *Haliotis*, 16 : 488-496.
- Sylvestre C., Le Gal Y., (1987). In situ measurements of adenylate energy charge and assetment of pollution. *Mar. Pollut. Bull*. 18 : 36-39.
- Thielley M., (1993). Etude cytologique de la gamétogénèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pintada margaritifera* (L) Var. *Cumingii* (Jameson) et comparaison avec le cycle de *P.maculata* (Gould).Thèse Université Française du Pacifique. p1 à 223.
- Vetter R. D., Hodson R. E., (1982). Use of adenylate concentrations and adénylate energy charge as indicators of hypoxic stress in estuarine fish. *Can. J. Fish. Aquatic Sci*. 39 : 535-541.
- Wijsman C.M., (1976). ATP content and mortality in *Mytilus edulis* from differents habitats in relation to anaerobiosis. *Netherland journal of sea food research*. 10(1) : 140-148.