

E.S.I.T.P.A.

Ecole Supérieure d'Ingénieurs et de Techniciens Pour l'Agriculture

Rue Grande

27 106 VAL DE REUIL

***ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE
DE DEUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX
SUR LES DEFENSES IMMUNITAIRES ET
LA RESISTANCE A LA VIBRIOSE
DE LA CREVETTE PENAEUS STYLIROSTRIS***

GANGNERY Aline

Promotion 92

Stage effectué du 13 mai au 31 août 1996 au

Centre Océanologique du Pacifique

IFREMER

BP 7004 TARAVALO

TAHITI



E.S.I.T.P.A.

Ecole Supérieure d'Ingénieurs et de Techniciens Pour l'Agriculture
Rue Grande
27 106 VAL DE REUIL

*ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE
DE DEUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX
SUR LES DEFENSES IMMUNITAIRES ET
LA RESISTANCE A LA VIBRIOSE
DE LA CREVETTE PENAEUS STYLIROSTRIS*

GANGNERY Aline

Promotion 92

Stage effectué du 13 mai au 31 août 1996 au
Centre Océanologique du Pacifique
BP 7004 TARAVAO
TAHITI

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

Adresse : IFREMER
BP 7004
TARAVAO
Tahiti-Polynésie Française

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

<p>AUTEUR (S): Aline Gangnery</p>	<p>CODE:</p> <p>DRV/AQ/TAH 96.57</p> <p>GLM/AG</p>
<p>TITRE : Etude expérimentale de l'influence de deux stress environnementaux sur les défenses immunitaires et la résistance à la vibriose de la crevette <i>Penaeus stylirostris</i>.</p>	<p>date : Aout 1996 Tirage : 20 ex</p>
	<p>Nb pages : 34 Nb figures : 13 Nb photos :</p>
<p>CONTRAT (intitulé)</p> <p>N° :</p>	<p>DIFFUSION :</p> <p>Libre <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Restreinte <input type="checkbox"/></p> <p>confidentielle <input type="checkbox"/></p>

RESUME Cette étude a pour objectif de mesurer chez la crevette *Penaeus stylirostris* l'effet de deux stress environnementaux, ammoniacque et hypoxie, sur les défenses immunitaires (hémocytes et prophénoxydase) et la résistance à l'infection par la bactérie *Vibrio penaeicidae*. Les crevettes, sélectionnées en stade C du cycle de mue, ont été soumises pendant 24 heures à plusieurs doses d'ammoniacque N.NH₃ (1, 1.5, 2, 2.5 et 3 mg/l) ou placées en situation d'hypoxie (1ppm vs 6ppm en normoxie). L'effet du stress a été évalué à 24 h par la mesure de la capacité osmorégulatrice ainsi que les paramètres immunitaires.

Les résultats montrent que l'ammoniacque à 3 mg N.NH₃/l induit une diminution significative du nombre total des hémocytes, cependant que l'activité de la prophénoxydase ne varie pas significativement. Le comptage différentiel montre que la diminution du nombre des hémocytes est liée à une baisse du nombre des cellules hyalines, alors que les types cellulaires (LGC et SGC) contenant le système prophénoxydase ne varient pas. L'hypoxie a pour effet d'induire une baisse significative de l'activité de la prophénoxydase, alors que la baisse du nombre total des hémocytes n'est pas significative.

Les crevettes stressées soumises à l'infection ne présentent pas de mortalité significativement différente des animaux témoins dans le cas des deux stress. Cependant, les résultats des challenges bactériens sont discutés et ne semblent pas définitivement acquis.

mots clés : *Penaeus stylirostris*, *Vibrio penaeicidae*, immunité, hémocyte, prophénoxydase, infection bactérienne, capacité osmorégulatrice, ammoniacque, hypoxie.

REMERCIEMENTS

Je tiens vivement à remercier :

- *MES MAÎTRES* de stage : Messieurs Jean-Claude COCHARD et Gilles LE MOULLAC. Si le duo fait parfois des étincelles, ils n'en restent pas moins très complémentaires !

- Dominique ANSQUER...Bretonne pure souche, amie et confidente. Sans oublier Ranouil et Gros minet.

- Axoubidouhou, stagiaire d'infortune comme moi, solidaire dans presque toutes les circonstances...

- Jacquouille ma fripouille, bête de Mac (mais ça, ça devient banal dans les remerciements des rapports de stage), papa des VAT et confident aussi.

- Sharky LA syntaxe error, imbattable au jeu des citations....mais qu'est-ce-qu'on s'ennuierait sans lui !

- Le p'tit Stan, VAT du premier et du dernier jour, marmotte et tête de cochon à ses heures !

- La Pouvrette, thésard fêtard du front de mer, adepte acharné de la secte MARAMU I avec son compagnon de galère le Père Fouras.

- Mizou-mizou l'homme aux pieds froids, sans oublier la p'tite Gègène et Tapu.

- George Nédelecuzon, OOOK ALOOORS !!!

- Félix le chat, futur informaticien du COP. Une bonne dose d'énergie, une cuillerée de reggae et surtout la tête dans les nuages.

Et aussi tous les autres : l'équipe des gardiens sympas (Théo, Doug, Daniel), le Dieu lanceur de cafetière, Pierrette, Peva.....

Enfin, tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à rendre ce séjour inoubliable.

Ah ça non ! Je ne suis pas prête d'oublier !

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR LA BIOLOGIE DES CREVETTES... 3	
1.1. Systématique de l'espèce <i>Penaeus stylirostris</i>	3
1.2. Morphologie et cycle biologique.....	3
1.3. La mue et la croissance	4
1.4. La régulation du milieu intérieur : l'osmorégulation	5
1.4.1. Les différents types d'osmorégulation.....	5
1.4.2. Physiologie de l'hypo-osmorégulation.....	6
1.4.3. La capacité osmorégulatrice.....	6
1.5. Physiologie de l'excrétion.....	7
1.6. Les défenses immunitaires	7
1.6.1. Les défenses cellulaires.....	8
1.6.2. Les défenses non cellulaires.....	9
1.6.3. Les mécanismes de défense des crustacés face à une infection	9
2. MATERIEL ET METHODES	10
2.1. Intoxication à l'ammoniaque	10
2.1.1. Protocole expérimental.....	10
2.1.2. Dosage de l'azote ammoniacal	10
2.2. Stress par hypoxie	12
2.3. Contrôle de la pression osmotique	12
2.3.1. Les prélèvements d'hémolymphe	12
2.3.2. Mesure de la pression osmotique	12
2.4. La mesure des défenses immunitaires.....	13
2.4.1. Les comptages hématocytaires totaux et différentiels.....	13
2.4.2. Dosage de l'activité phénoloxydase.....	13
2.5. Les infections bactériennes expérimentales	14
2.5.1. Milieu de culture	14
2.5.2. Détermination de la dose bactérienne pour la balnéation.....	14
2.5.3. La balnéation.....	14
2.6. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.....	15
3. RESULTATS	16
3.1. Expériences réalisées sur l'ammoniaque	16

3.1.1. Vérifications préliminaires	16
3.1.2. Influence de l'ammoniaque sur la pression osmotique.....	17
3.1.3. Influence de l'ammoniaque sur les hémocytes totaux.....	18
3.1.4. Influence de l'ammoniaque sur l'activité de la phénoloxydase	19
3.1.5. Influence de l'ammoniaque sur les différents types hémocytaires.....	20
3.1.6. Stress à l'ammoniaque suivi d'une infection expérimentale.....	21
3.2. expériences réalisées sur l'oxygène	23
3.2.1. Echantillonnage.....	23
3.2.2. Influence du taux d'oxygène sur la pression osmotique	24
3.2.3. Influence du taux d'oxygène sur les hémocytes totaux.....	24
3.2.4. Influence du taux d'oxygène sur l'activité de la phénoloxydase	25
3.2.5. Stress par hypoxie suivi d'une infection expérimentale.....	26
4. DISCUSSION	27
CONCLUSION	30

INTRODUCTION

Depuis une quinzaine d'années, l'élevage de crevettes dans la zone tropicale a connu un essor important. La production mondiale en élevage de crevettes pénaïdes est passée de 12 000 tonnes en 1983 à 730 000 tonnes en 1991 (*Martin, 1995*). Néanmoins, depuis 1992, cette activité en développement est confrontée à des épizooties dues à des virus et des bactéries, engendrant de plus en plus de difficultés économiques dans les zones de grande production, en Asie et en Amérique du Sud.

Depuis 1993, les élevages néo-calédoniens de pénaïdes subissent des pertes importantes, dues à des pics de mortalité saisonniers, entraînant parfois une production à perte.

Pour soutenir la pénaïculture en Nouvelle-Calédonie, plusieurs laboratoires se sont mobilisés: le Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire (LTDV), le Centre Océanologique du Pacifique (COP) et l'IFREMER GIE-RA de Nouméa. Actuellement, deux orientations différentes ont été choisies. Le LTDV soutient une piste virale tandis que l'IFREMER porte ses efforts sur une piste bactérienne. Mais, en l'absence d'agent pathogène confirmé, les épisodes de mortalité affectant la pénaïculture calédonienne ont reçu le nom de « Syndrome 93 ».

Au cours de l'année 94, des études bactériologiques, effectuées en Nouvelle-Calédonie ont montré une forte prévalence de vibrios de type « 1042 ». Une des souches « 1042 », la souche AM 23, a été confiée au COP fin 94. Des infections expérimentales par injection intramusculaire ont révélé le fort pouvoir pathogène de l'AM 23 par rapport à d'autres souches testées. Ces résultats renforcèrent l'hypothèse selon laquelle les souches « 1042 » sont un des agents étiologiques du syndrome 93. La souche AM23 a d'ailleurs été identifiée comme étant un *Vibrio Penaeicidae* par différentes techniques (biochimiques, ribotypage et hybridation ADN/ADN) (*Berthe, 1996*).

Plusieurs modes d'infection ont été testés au COP en 1995:

- par voie intramusculaire où la virulence est très importante et ne permet pas de tester l'efficacité d'un traitement,

- par voies anale et orale où on observe une faible virulence de la souche,

- par balnéation (1 heure dans une suspension de Vibrio) qui constitue le modèle retenu pour les expériences menées au COP.

Cependant, la présence de ce vibrio pathogène n'explique pas à lui seul l'apparition des pics de mortalité en Nouvelle-Calédonie. Des facteurs aggravants, liés à la crevette ou à son environnement, sont en cause, confirmant l'hypothèse d'un syndrome plurifactoriel. Parmi les facteurs suggérés, l'influence du stade de mue a été mise en évidence mais elle n'explique pas le caractère saisonnier du syndrome 93. D'autres facteurs, environnementaux, doivent être mis en évidence: l'ammoniaque (résultat de l'excrétion de la crevette et de l'accumulation de déchets d'origine alimentaire), l'oxygène, la température, la salinité du milieu.

Il s'agit de tester l'hypothèse selon laquelle un ou plusieurs facteurs environnementaux aggravent la maladie due au vibrio. Une première expérience a déjà été réalisée au COP en 1995 sur l'effet d'un choc thermique sur la capacité osmoréglatrice et l'effet conjugué d'un choc thermique et d'une infection bactérienne par l'AM 23. Cependant, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre une chute brutale de la température et une septicémie à vibrions (*Mongodin, 1995*).

Dans ce rapport, nous nous attacherons à décrire puis comprendre les effets de stress à l'ammoniaque et à l'oxygène sur les défenses immunitaires de la crevette *P. stylirostris*. Ces deux facteurs ont déjà mis en évidence une diminution de la capacité osmoréglatrice de la crevette (*AQUACOP et al., 1988* ; *Cochard et al., 1993* ; *Charmantier et al., 1994* pour l'oxygène et *Lin et al., 1991* ; *Young-Lai et al., 1991* pour l'ammoniaque) ; la capacité osmoréglatrice étant connue pour être un indicateur de stress non spécifique d'une réponse à une infection (*Cochard et al., 1996*). Les paramètres des défenses immunitaires, spécifiques d'une réponse à une infection, sont les hémocytes. Les défenses immunitaires sont aussi le fait de facteurs humoraux (synthèse de peptides et de protéines antimicrobiennes) mais aucune molécule n'a encore été identifiée chez les Pénéides.

Les expérimentations, qui suivent, s'articulent autour de stress à 24 h à l'ammoniaque ou à l'oxygène. Les concentrations en ammoniaque et oxygène ont été déterminées à partir de résultats précédemment obtenus au COP. Les stress sont suivis d'une mesure de la pression osmotique (pour la détermination de la capacité osmoréglatrice), d'un comptage total et différentiel des hémocytes et d'un dosage de l'activité phénoloxydase. Dans un second temps, un challenge bactérien est réalisé à l'issue des stress à l'ammoniaque ou à l'hypoxie.

1. RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR LA BIOLOGIE DES CREVETTES

1.1. SYSTEMATIQUE DE L'ESPECE *PENAEUS STYLIROSTRIS*

Embranchement	: Arthropodes
Sous-embranchement	: Antennates (mandibulates)
Super-classe	: Crustacea
Classe	: Malacostraca
Sous-classe	: Eumalacostraca
Super-ordre	: Eucarida
Ordre	: Decapoda
Sous-ordre	: Penacidea
Famille	: Penaeidae
Genre	: <i>Penaeus</i>
Espèce	: <i>stylirostris</i>

P. stylirostris, communément appelée "crevette bleue", est une espèce américaine que l'on retrouve essentiellement au niveau de la ceinture tropicale, à l'est du Pacifique : de la Californie jusqu'au nord du Pérou.

Elle a donc été importée en Polynésie et en Nouvelle-Calédonie.

1.2. MORPHOLOGIE ET CYCLE BIOLOGIQUE

Comme tous les crustacés, les pénéides sont caractérisés par une métamérisation du corps (figure 1). Les métamères sont regroupés en une tête (ou acron), thorax (ou péréion) et abdomen (ou pléon). Chaque métamère porte une paire d'appendices spécialisés. La partie abdominale est composée de 7 métamères portant chacun une paire de pléopodes sauf le dernier que l'on appelle telson. Les pléopodes sont les appendices locomoteurs.

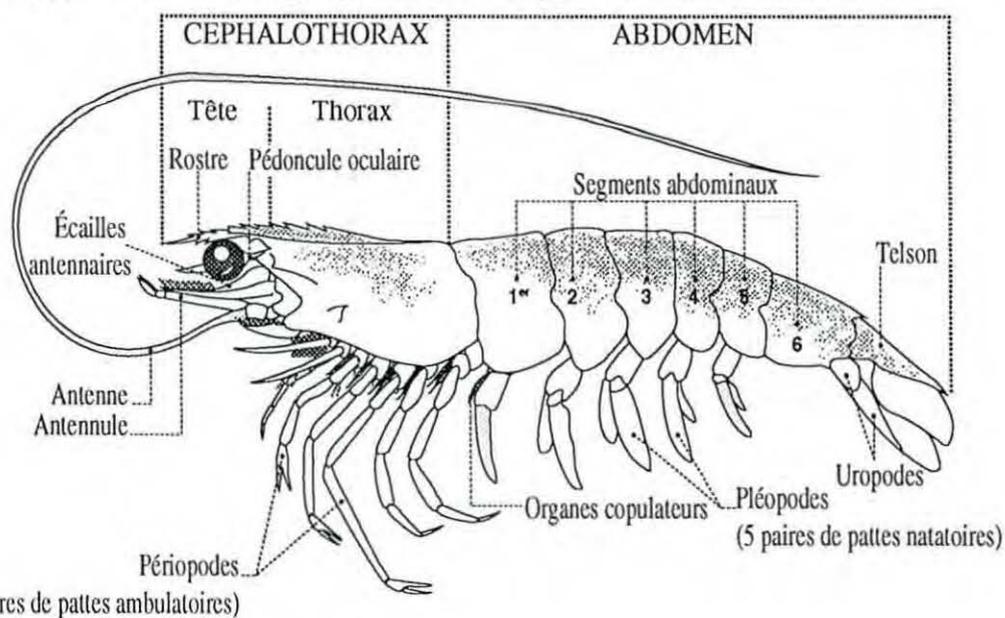


Figure 1 : Morphologie de *Penaeus stylirostris*

Le cycle biologique de la crevette est caractérisé par une succession de stades larvaires avant d'atteindre la morphologie définitive de l'adulte (figure 2).

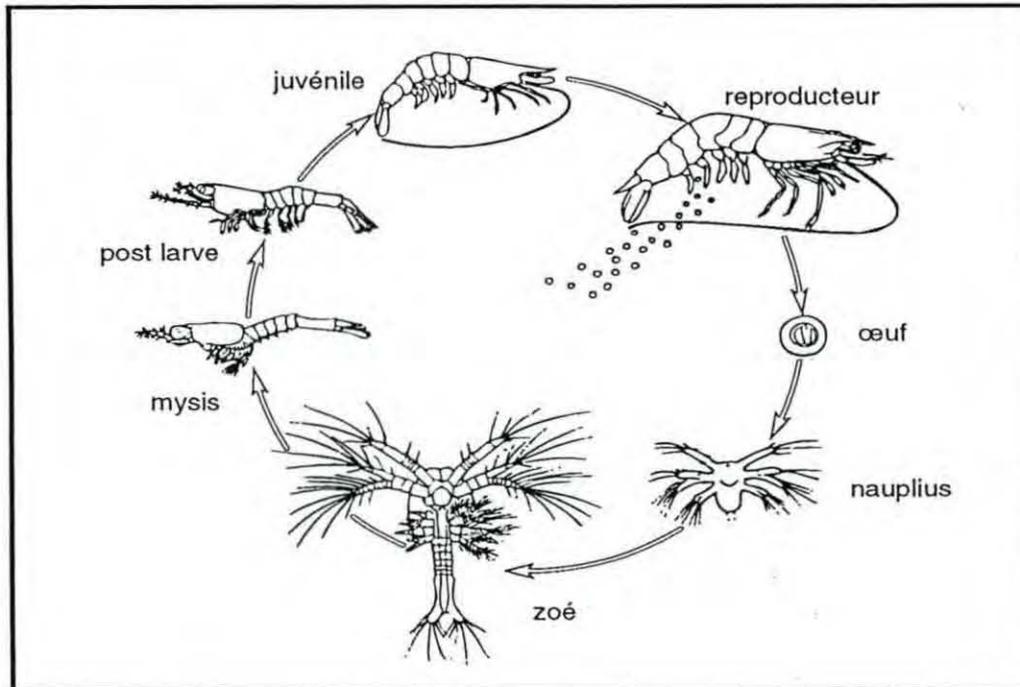


Figure 2 : Cycle biologique de *Penaeus stylirostris*

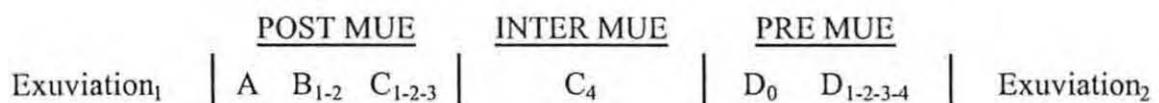
1.3. LA MUE ET LA CROISSANCE

Chez les crustacés, la croissance est un phénomène discontinu : elle se fait par mues successives. L'ancienne cuticule est remplacée par une nouvelle, permettant une augmentation du poids et de la longueur de l'animal.

Le cycle de mue peut être divisé en trois grandes étapes:

- la période post-exuviale (ou post-mue),
- la période d'intermue,
- la période pré-exuviale (ou pré-mue).

A l'intérieur de ces périodes, plusieurs stades de mue, dont la durée est variable, peuvent être distingués :



La détermination des stades de mue est basée sur les travaux de *Drach* et *Tchernigovtzeff* (1967). Elle s'effectue à partir de l'observation au microscope des soies d'une écaille antennaire ou de l'uropode de la crevette. A chaque stade correspond un aspect caractéristique des soies.

La mue entraîne des conséquences physiologiques sur :

- Le métabolisme hydrique : l'eau qui pénètre par diffusion libre au niveau des branchies ou par les intestins passe de 70 à 85% du poids frais de l'animal.

- Le métabolisme minéral : les concentrations ioniques de l'hémolymphe (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) sont modifiées suivant le stade. Ainsi, la pression osmotique globale augmente pendant la phase de pré-mue, diminue pendant la mue et le stade A. C'est au moment de l'inter-mue que la stabilité des paramètres physiologiques est observée.

Toutes nos expériences ont donc été réalisées sur des animaux en stade C. De plus, le stade C est celui qui dure le plus longtemps, permettant une plus grande flexibilité dans l'organisation des expériences. Enfin, à ce stade, l'hémolymphe coagule moins rapidement, facilitant les prélèvements.

1.4. LA RÉGULATION DU MILIEU INTÉRIEUR : L'OSMORÉGULATION

Durant son développement larvaire, la crevette *P. stylirostris*, à l'image des autres crevettes pénéides, migre vers les zones estuariennes, rencontrant un gradient de salinité décroissant qui entraîne une diminution progressive de la pression osmotique du milieu.

Les adultes retournent en mer pour la reproduction. Au cours de cette nouvelle migration, ils doivent faire face à un gradient de salinité croissant impliquant une augmentation de la pression osmotique du milieu.

Or, le maintien du volume cellulaire est une nécessité fondamentale pour tous les organismes. Il faut maintenir un équilibre entre la pression osmotique intracellulaire et la pression osmotique extracellulaire. Les crevettes doivent donc réguler la pression osmotique (PO) de leur milieu intérieur.

La PO est liée à la concentration totale des particules libres dissoutes dans un solvant. Si l'on considère deux milieux de concentration ionique différente, séparés par une membrane semi-perméable (laissant passer le solvant mais pas les ions), la PO peut être définie comme la pression qu'il faudrait exercer sur le milieu le moins concentré pour empêcher le passage du solvant vers le milieu le plus concentré.

1.4.1. Les différents types d'osmorégulation

Selon *Charmantier-Daurès et al (1988)* deux types d'osmorégulation peuvent être distingués chez les pénéides :

- pendant la vie larvaire, les crevettes sont légèrement hyper-osmoconformes quelle que soit la salinité, maintenant leur PO hémolympatique légèrement supérieure à celle du milieu extérieur.

- à partir du premier stade post-larvaire, la régulation devient hyper-osmotique en milieu dilué et hypo-osmotique en eau de mer.

En effet, au cours du développement post-embryonnaire, la mise en place des structures osmorégulatrices adultes est progressive (*Bouaricha, 1992*). En fonction de l'apparition des différents organes aux différents stades, il y aura possibilité ou non d'osmorégulation.

Les animaux sont donc capables de maintenir à peu près constante la PO de leur hémolymphe quelle que soit la PO du milieu extérieur.

Contrairement à ce qui est observé chez les vertébrés la régulation hémolympatique est imparfaite chez les crustacés. Une partie de la régulation est toujours d'ordre cellulaire.

1.4.2. Physiologie de l'hypo-osmorégulation

Les branchies, le branchiostégite et la pleure sont les sites majeurs de l'osmorégulation (Mantel et Farmer, 1983).

Lorsque la pression osmotique du milieu extérieur est supérieure à celle de l'hémolymphe, la tendance passive de l'hémolymphe est à une perte d'eau et une invasion par les ions du milieu. La perméabilité aux ions de ces tissus n'est pas significativement modifiée. Par contre, ils sont le siège d'une excrétion active d'ions.

1.4.2.1. Les épithéliums osmorégulateurs

L'hémolymphe et le milieu extérieur sont séparés par une fine barrière composée de la cuticule et de l'épithélium de la lame basale. Celle-ci permet une diffusion rapide des ions Na^+ , Cl^- et NH_3 . Il a été mis en évidence que ces épithéliums avaient un rôle dans les transports ioniques, actifs et passifs, ainsi que dans l'osmorégulation.

Chez les décapodes, la partie postérieure des branchies serait impliquée plus spécialement dans les phénomènes d'osmorégulation (Péqueux et al., 1988).

Ces tissus se caractérisent au niveau ultrastructural par la présence de microvillosités apicales et de nombreuses invaginations basolatérales associées à une grande quantité de mitochondries (Bouaricha, 1990).

1.4.2.2. L'ATPase Na^+/K^+

Il s'agit d'une enzyme membranaire qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP en ADP avec libération de phosphate inorganique et d'énergie. Son activation nécessite la présence des ions Na^+ , K^+ et NH_4^+ . Elle est localisée au niveau des épithéliums osmorégulateurs chez *P. stylirostris*. Son rôle dans l'osmorégulation et dans les transports ioniques actifs est considéré comme fondamental (Péqueux et al., 1988). Elle transfère les ions (Na^+ , K^+ , NH_4^+) de part et d'autre de la membrane contre le gradient de concentration. Différents agents stressants peuvent modifier l'activité de l'ATPase Na^+/K^+ .

1.4.3. La capacité osmorégulatrice

La capacité osmorégulatrice est définie comme la **différence entre la PO de l'hémolymphe et la PO du milieu extérieur.**

Elle a été proposée comme outil d'évaluation simple et rapide de l'état physiologique des crevettes et des crustacés osmorégulateurs par Charmantier et al. (1989). Sa valeur est représentative d'une espèce, d'un poids (Cochard et al., 1996), d'un stade de développement ou d'un stade de mue d'une espèce (Charmantier, 1992). Il a été montré qu'en eau de mer les fortes PO de l'hémolymphe (donc de faibles valeurs de capacité osmorégulatrice) traduisaient un stress chez les crevettes, l'inverse se produit en milieu saumâtre.

La salinité des bassins présents au COP variant peu, nous n'avons pas travaillé sur la capacité osmorégulatrice mais directement sur la pression osmotique.

1.5. PHYSIOLOGIE DE L'EXCRÉTION

Les tissus osmorégulateurs sont le site principal de l'excrétion azotée chez les crustacés et les pénéides en particulier.

L'excrétion correspond à un rejet des déchets azotés dans le milieu extérieur, aboutissant à une régulation du milieu intérieur. L'azote ammoniacal est excrété selon 3 modalités:

- diffusion de NH_3 (ammoniaque) et de NH_4^+ (ion ammonium) par les branchies.
- échange actif de NH_4^+ contre Na^+ ou H^+ par les branchies.
- conversion en urée, acide urique.

La désamination des acides aminés entraîne la libération d' NH_3 qui s'ionise en NH_4^+ en fonction du pH hémolympatique (environ 7,7). Dans l'organisme, la grande majorité de l'azote ammoniacal se trouve sous la forme ionisée. Dans les conditions normales, il existe un gradient de concentration entre l'hémolymphe et le milieu extérieur, permettant une sortie par diffusion de NH_3 et NH_4^+ au niveau des branchies. Cependant, la diffusion de NH_3 est majoritaire.

Au niveau des épithéliums osmorégulateurs, lors du transport actif, il y a diffusion de l'ammoniaque à travers les cellules basales où il est ionisé en NH_4^+ et échangé à l'extérieur avec un ion Na^+ grâce à une ATPase.

Chez *P. chinensis*, l'excrétion ammoniacale augmente quand l'ammoniaque ambiant augmente, jusqu'à 1 mg N. NH_3 /l, tandis qu'elle diminue entre 1 et 10 mgN. NH_3 /l (*Chen et Lin, 1993*).

Chez *P. monodon*, l'azote ammoniacal hémolympatique augmente quand l'azote ammoniacal du milieu augmente (*Chen et Kou, 1992*). Au-dessus de 10 mg N/l, la diffusion de NH_3 du milieu intérieur vers le milieu extérieur s'inverse : l'entrée d'ammoniaque devient supérieure à la sortie. Dès ce seuil, la concentration hémolympatique en NH_3 tend à s'égaliser avec le milieu extérieur. L'ion ammoniaque est considéré comme l'ion toxique du fait de sa solubilité à travers les branchies (*Llorca, 1996*).

1.6. LES DÉFENSES IMMUNITAIRES

Sur les mécanismes de défense, il reste encore beaucoup d'inconnues et l'objectif des recherches actuelles du COP est de déterminer des solutions pour retrouver une survie acceptable au plan économique, par la mise en élevage de crevettes moins sensibles à l'infection bactérienne.

Chez les crustacés, les mécanismes de défense immédiats et non inductibles sont essentiellement à médiation cellulaire et reposent sur l'activité des hémocytes. Les mécanismes de défense différés et inductibles sont à médiation humorale et reposent sur la synthèse de diverses protéines dont certaines sont pourvues de propriétés anti-microbiennes.

La description suivante des mécanismes de défense immunitaire est tirée de la synthèse proposée par *Le Moullac et Le Groumellec (1995)*.

1.6.1. Les défenses cellulaires

1.6.1.1.Type et fonctions des hémocytes

Les défenses cellulaires mettent en jeu les hémocytes dont les fonctions sont en relation avec le type cellulaire. *Tsing et al (1989) et Sagrista and Dufort (1990)* en définissent trois :

- les cellules à petits granules,
- les cellules à grands granules,
- les cellules hyalines qui contiennent peu de granules.

(photographie des types hémocytaires page ci-contre)

Il reste cependant des incertitudes sur les fonctions de ces types cellulaires.

1.6.1.2.La coagulation

C'est un mécanisme essentiel de défense des crustacés pour prévenir la perte d'hémolymphe lors d'une blessure et pour limiter l'invasion par des agents pathogènes. Les hyalinocytes initient la coagulation de l'hémolymphe par l'intermédiaire de facteurs cytoplasmiques, les sérines protéases activées par des hémocytes exposés à du LPS ou des β -1-3 glucans. Ces enzymes convertissent le coagulé en coaguline souple.

1.6.1.3.Le système prophénoloxydase

Le fonctionnement du système prophénoloxydase a été expliqué par *Johansson et Söderhäll, (1989)*.

Il s'agit d'un système enzymatique de défense contenu dans les cellules granuleuses et semi-granuleuses. Il permet la fabrication de mélanine entraînant la cicatrisation et possède une activité fongistatique (il est donc souvent associé aux blessures et aux infections). L'enzyme clé de la synthèse du pigment mélanine est la phénoloxydase, qui est présente dans l'hémolymphe à l'état inactif de pro-enzyme : la prophénoloxydase (proPO). La proPO est activée par des cellules microbiennes dont les parois contiennent des β -1-3 glucans, des lipopolysaccharides (LPS) ou les peptidoglycanes des bactéries gram - et gram +. Il a également été observé que ces composants stimulaient plusieurs réactions de défense cellulaire dont la phagocytose, la formation de nodules, l'encapsulation et la locomotion des hémocytes.

L'importance du système proPO dans la défense est aussi montrée par le fait que certains parasites ont développé des moyens pour se soustraire à ce système ou pour inhiber son activation.

Pour l'instant, sept protéines associées au système proPO ont été mises en évidence.

L'enzyme active (c'est-à-dire la phénoloxydase) oxyde les noyaux phénoliques en quinones qui se polymérisent en mélanine (de façon non enzymatique). La proPO est elle-même activée par une enzyme d'activation qui est une protéase de type sérine (ppA). Chez les crustacés, la ppA est activée par les β -1-3 glucans ou par des LPS (par un mécanisme encore inconnu). Dans le plasma, il existe deux protéases inhibitrices (α 2-macroglobuline et trypsine inhibitrice) pouvant bloquer la ppA et donc l'activation de la proPO.

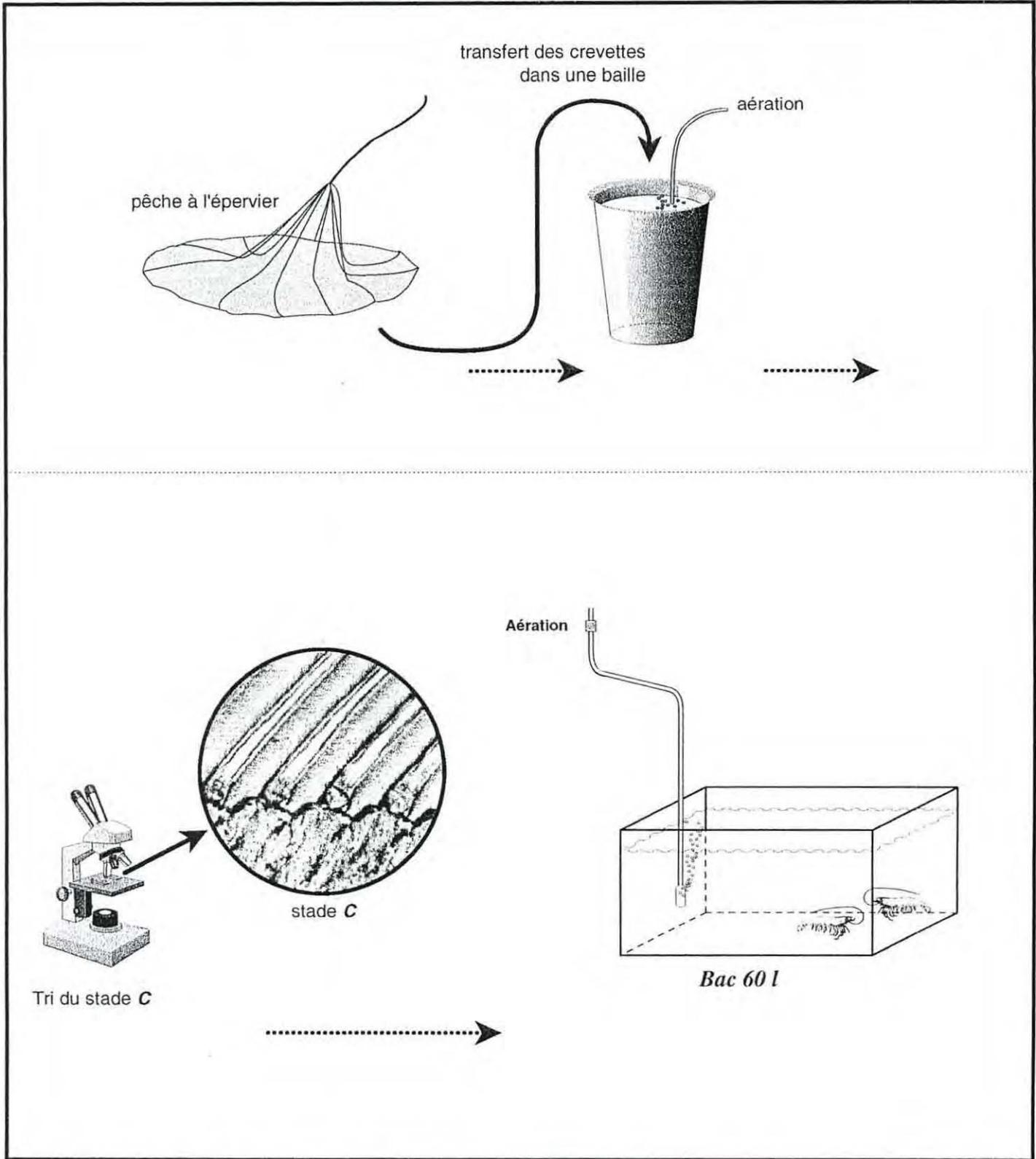
La phénoloxydase même ne stimule pas la phagocytose ou l'encapsulation chez les crustacés.

1.6.2. Les défenses non cellulaires

Les insectes et certains invertébrés marins possèdent un système de défense non cellulaire synthétisé lors d'infections ou blessures. Chez les insectes supérieurs, plusieurs familles de peptides antibactériens à large spectre d'activité leur permettent de combattre les agressions bactériennes. En ce qui concerne les crustacés, les connaissances dans ce domaine restent encore limitées. Des activités bactéricides ont été observées chez quelques crustacés (Evans et al., 196). Une inhibition de la croissance bactérienne a été mise en évidence dans l'hémolymphe chez *P.vannamei* (Rodriguez, 1994), cependant aucune molécule n'a encore été caractérisée chez les pénéides.

1.6.3. Les mécanismes de défense des crustacés face à une infection

Face à une infection, on assiste à une activation du système proPO et une baisse du nombre d'hémocytes circulants chez l'écrevisse (Cerenius et al., 1991, Persson et al., 1987). Chez le crabe *Carcinus maenas* infecté par *Bacillus cereus* et *Moraxella sp.* et chez *Cancer irroratus* infecté par *Vibrio*, le nombre d'hémocytes circulant chute de 90%, par le fait de l'encapsulation de ces bactéries par les hémocytes. Les nodules ainsi formés sont piégés principalement dans les branchies et dans une moindre mesure le sinus cardiaque et l'hépatopancréas. Le retour à la normale s'établit après 24 heures (Smith and Ratcliff, 1980a, 1980b, Newman and Feng, 1982). Chez *Sicyonia ingentis* infecté par *Bacillus cereus*, *Aerococcus viridans*, *Pseudomonas fluorescens* et *Vibrio alginolyticus*, on retrouve le même modèle de réaction c'est-à-dire une chute du nombre d'hémocytes qui sont mobilisés afin d'éliminer les bactéries de l'hémolymphe (Martin et al., 1993) ainsi que chez *P. monodon* infecté par *Vibrio alginolyticus* (Adams, 1991).



Protocole expérimental de l'intoxication à l'ammoniaque

2. MATÉRIEL ET METHODES

Pour les expériences menées sur l'ammoniaque comme sur l'oxygène, le protocole suivant a été retenu : dans un premier temps stress de 24 heures avec contrôle des paramètres immunitaires, puis un stress de 24 heures suivi d'une infection bactérienne expérimentale.

2.1. INTOXICATION À L'AMMONIAQUE

2.1.1. *Protocole expérimental (schéma page ci-contre)*

Les animaux ont été pêchés à l'épervier dans les bassins d'élevage à fond de terre du COP. Ils ont été rapidement transportés à l'unité écophysiologie au moyen de bailles de 50 litres.

Pour toutes les expériences concernant l'ammoniaque, le poids moyen des crevettes était de $18 \text{ g} \pm 0,55$. Elles ont été triées en fonction de leur stade de mue (seuls les stades C ont été retenus) et transférées dans les bacs de 60 litres de la salle expérimentale. Les bacs avaient été remplis avec de l'eau de mer (salinité : 37 ‰, pH : 8, T : 28°C) et équipés de systèmes d'oxygénation. L'eau n'a pas été renouvelée pendant toute la durée du stress.

Le stress à l'ammoniaque a été réalisé en exposant les animaux à différentes concentrations d'ammoniaque, en ajoutant directement à l'eau des bacs du chlorure d'ammonium, NH_4Cl , sous forme solide.

Concentration en mg $\text{N.NH}_3/\text{l}$	0	1	1,5	2	2,5	3
Qté NH_4Cl dissoute en g	0	3,55	5,34	7,12	8,9	10,68

Tableau 1 : Concentrations d'ammoniaque testées lors des expériences

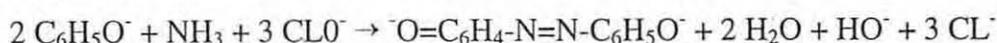
Une gamme progressive de concentrations a été testée pour mettre en évidence la présence éventuelle de paliers et donc d'effets dose. La dose de 3 mg $\text{N.NH}_3/\text{l}$ représente une concentration sub-létale pour cette espèce (Cochard *et al.*, 1996a). Chaque dose a été appliquée sur des triplicats de 10 crevettes. Le risque d'introduire une effet bac a été éliminé en testant des témoins (dose 0).

Les crevettes n'ont pas été alimentées pendant les 24 heures qu'a duré le test afin d'éviter une augmentation importante de la concentration en ammoniaque des bacs ainsi qu'une augmentation de la pression osmotique qui ne serait pas due au stress (Cochard *et al.*, 1996b).

Les dosages de l'ammoniaque ont été vérifiés à $t=0$ et $t=24$ heures sur l'eau des bacs expérimentaux.

2.1.2. *Dosage de l'azote ammoniacal*

La méthode décrite ci-dessous mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit N.NH_3 et N.NH_4^+ . Il s'agit de la méthode Koroleff (1969). C'est une application à l'eau de mer de la méthode de Berthelot.



Dans un premier temps, l'ammoniaque forme une monochloramine avec le dichloroisocyanurate de potassium. Cette dernière réagit en présence de phénol avec un excès de chlore pour donner le bleu d'indophénol, absorbant à 630 nm, en présence d'un catalyseur, le nitroprussiate de sodium, à pH basique. La précipitation des ions alcalino-terreux de l'eau de mer à pH élevé de la réaction est évitée par la complexation à l'aide de citrate de sodium (Aminot, Chaussepied, 1983).

2.1.2.1. Les réactifs

Le réactif 1 est une solution de phénolnitroprussiate. Pour obtenir un demi-litre de réactif, il faut dissoudre 17,5 g de phénol, 1,6 g de nitroprussiate qsp 500 ml d'eau distillée.

Le réactif 2 est une solution alcaline d'hypochlorite. Pour obtenir un demi-litre de réactif, il faut dissoudre 140 g de citrate trissodique, 11 g de soude, 2,3 g d'acide dichlorocyanurique déshydraté, du sel de sodium qsp 500 ml d'eau distillée.

Une solution mère de sulfate d'ammonium à 100 ppm est préparée en séchant pendant 1 heure, à 110°C du sulfate d'ammonium de pureté analytique (NH₄)₂SO₄ et en en dissolvant 471,4 mg dans un litre d'eau distillée.

Une solution fille, donnant une solution d'azote à 10 mg/l, est préparée par dilution au 1/10 de la solution mère. Elle permettra de réaliser une gamme d'étalonnage allant de 0,05 ppm à 0,5 ppm.

2.1.2.2. Mode opératoire

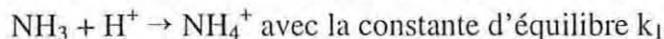
Sur une plaque de microtitration, l'échantillon de 280 µl d'eau à doser est mélangé à 50 µl de réactif 1; puis 50 µl du réactif 2 sont ajoutés.

La plaque est placée 2 heures à l'étuve à 60°C.

La lecture se fait au moyen d'un lecteur de plaque de microtitration à la longueur d'onde de 630 nm et par rapport à de l'eau de mer vieillie. La moyenne des différents réplicats lus est comparée à la gamme d'étalonnage (les échantillons d'eau à doser, qui sont très concentrés en ammoniaque, seront donc préalablement dilués pour pouvoir les comparer à la gamme).

2.1.2.3. Calcul de la concentration en NH₃

L'ammonium (NH₄⁺) et l'ammoniaque (NH₃) sont liés en solution par l'équilibre :



Une relation entre k_1 , la salinité (S) et la température absolue T (en kelvin) a été établie par Johansson et Wedborg (1980) :

$$\log k_1 = -0,467 + 0,0013 \cdot S + 2887,9 \cdot (1/T)$$

Le pourcentage d'ammoniaque par rapport à l'azote ammoniacal total est :

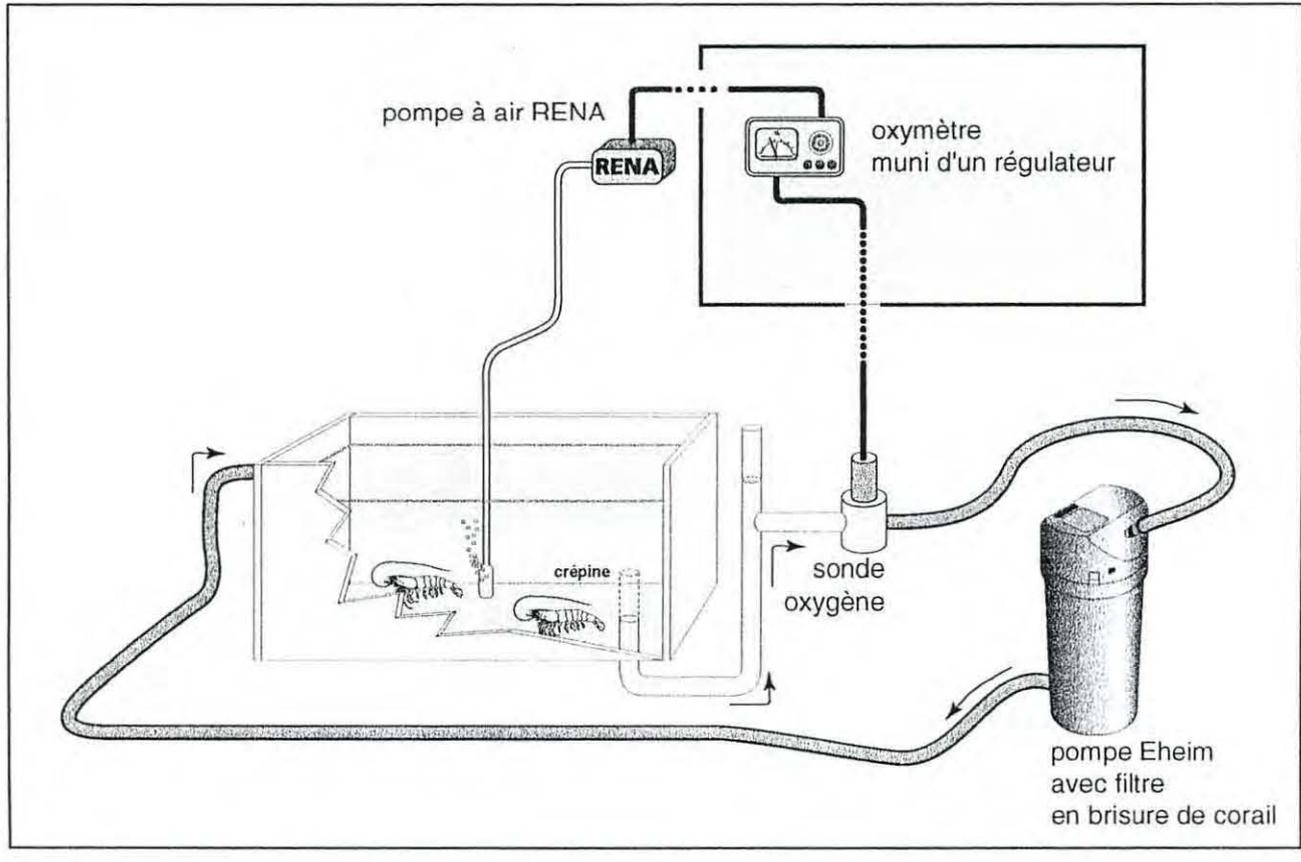
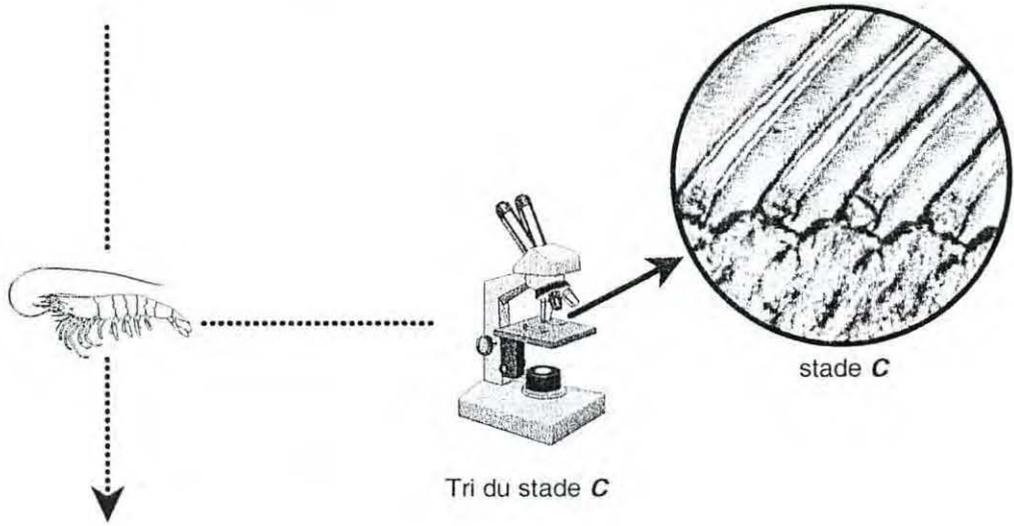
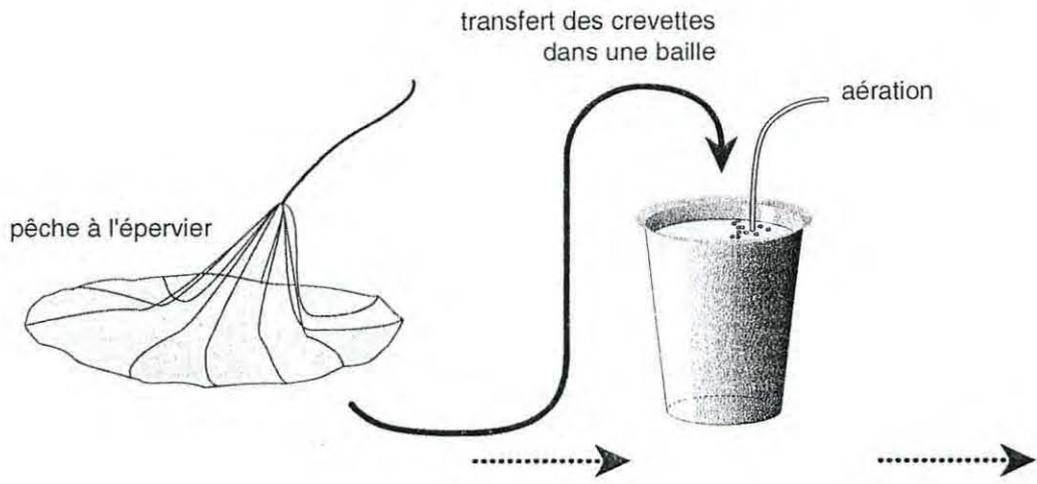
$$\% \text{NH}_3 = 100 / [1 + \exp(\log k_1 - \text{pH})]$$

Les tables de Johansson et Wedborg donnent dans le cas présent la valeur du taux de NH₃ :

$$S = 37 \text{ ‰}$$

$$T = 28^\circ\text{C} \quad \} \quad \% \text{NH}_3 = 6,44$$

$$\text{pH} = 8$$



Protocole expérimental du stress Hypoxique

Le calcul de la concentration en NH_3 s'effectue selon :

$$[\text{NH}_3] = 0,0644 * [\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3]$$

2.2. STRESS PAR HYPOXIE

Le protocole expérimental (*schéma page ci-contre*) suivi pour le stress hypoxique est semblable à celui utilisé pour le stress à l'ammoniac. Cependant, la méthode est plus simple, car le stress n'a porté que sur deux concentrations : un taux d'oxygène en saturation à environ 6 ppm (normoxie) désigné comme concentration témoin et un taux à 1 ppm d'oxygène (hypoxie), connu pour être une valeur stressante pour l'animal (*AQUACOP, données non publiées*). Deux jours avant le stress et pendant toute la durée du stress, les animaux n'ont pas été alimentés de façon à éviter des variations de la pression osmotique non dues au stress.

Pour ces expériences, les crevettes avaient un poids moyen de $12,3\text{g} \pm 0,45$. Elles ont été placées dans des bacs sans renouvellement d'eau. Chacun des bacs est relié à un filtre biologique constitué de pièces de corail préparé au moins deux semaines avant les expériences (*Charmantier et al., 1992-1993*). Le niveau d'oxygène désiré est obtenu par la consommation de l'oxygène par les bactéries aérobies du filtre et par la respiration des crevettes. Les bacs d'expérimentation sont fermés afin d'éliminer toute réoxygénation par diffusion de l'air ambiant. Le taux d'oxygène souhaité est atteint de façon progressive. Dès que le taux d'oxygène atteint la valeur de 0,09 ppm, un oxymètre dont la sonde est placée sur le circuit reliant le bac d'élevage au filtre biologique déclenche le fonctionnement d'une pompe à air assurant l'oxygénation du milieu. Ce fonctionnement est interrompu dès que le taux d'oxygène atteint 1,1 ppm.

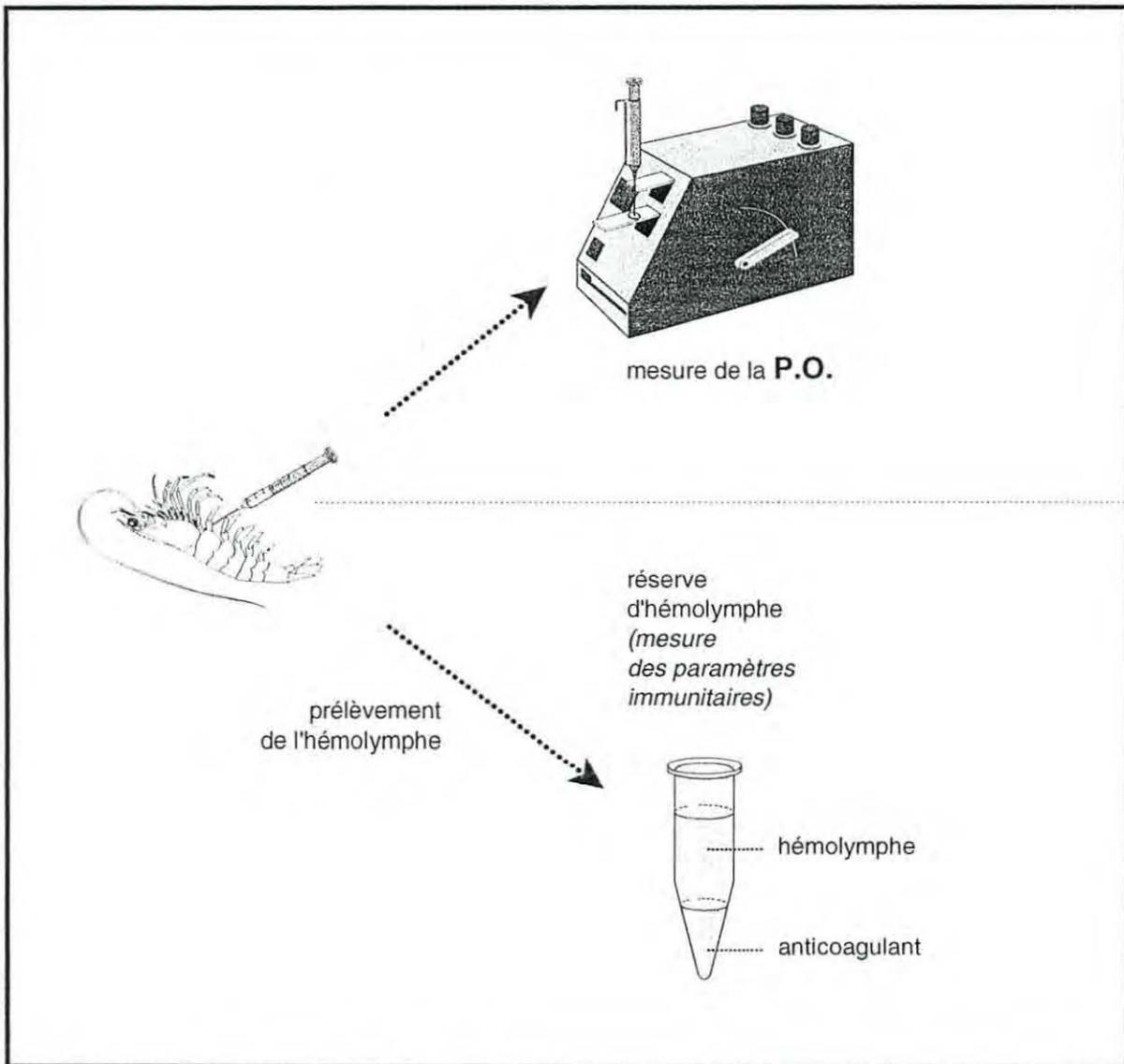
2.3. CONTRÔLE DE LA PRESSION OSMOTIQUE (*schéma page suivante*)

2.3.1. Les prélèvements d'hémolymphe

Les prélèvements des 200 μl d'hémolymphe ont été réalisés au niveau du sinus ventral de la crevette, à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml. Un volume de 10 μl était réservé à la mesure de la pression osmotique et 150 μl au comptage hémocytaire et au dosage de l'activité phénoloxydase. L'hémolymphe était déposée sur une surface propre de Parafilm[®] puis reprise à la pipette automatique.

2.3.2. Mesure de la pression osmotique

La pression osmotique de l'hémolymphe a été mesurée à l'aide d'un osmomètre: "Vapor Pressure Osmometer 5500" (marque WESCOR). La mesure est basée sur la détermination de l'abaissement de la tension de vapeur d'une solution par rapport à la tension de vapeur du solvant. Après une hausse de température permettant la vaporisation du liquide, la baisse de température permet sa condensation au point de rosée. L'appareil fournit directement la pression osmotique du liquide introduit dans l'osmomètre. Avant chaque utilisation de l'appareil, un étalonnage était réalisé à l'aide de deux échantillons standards à 290 mosmol/kg et 1000 mosmol/kg. La mesure se fait en plaçant 10 μl d'échantillon d'hémolymphe dans une chambre étanche de l'appareil dont le plafond est muni d'un thermocouple. L'appareil déclenche automatiquement un cycle de mesure. Certaines précautions doivent être prises car le thermocouple peut être facilement contaminé lors du dosage entraînant une erreur de mesure importante. Les échantillons doivent être déposés



Prélèvement d'hémolymphe et mesure de la pression osmotique

rapidement et proprement sur le disque en papier dans l'osmomètre afin d'éviter leur évaporation et la coagulation de l'hémolymphe. Enfin, il faut veiller à bien nettoyer l'appareil après chaque mesure (Fichet, 1993).

La capacité osmorégulatrice est mesurée par la valeur de la pression osmotique de l'hémolymphe car la PO du milieu ne varie pas. Toute augmentation de la pression osmotique correspond à une diminution de la capacité osmorégulatrice de l'animal.

Les prélèvements d'hémolymphe et les mesures de pression osmotique ont été réalisés dès la fin des 24 heures de stress (à l'ammoniaque comme à l'oxygène).

2.4. LA MESURE DES DEFENSES IMMUNITAIRES

2.4.1. Les comptages hématocytaires totaux et différentiels

Les cellules de l'hémolymphe ont été fixées pour subir une identification selon Cornick et Stewart (1978) : 150 µl d'hémolymphe étaient placés dans un tube eppendorf contenant 150 µl d'une solution anticoagulante (trisodium citrate 30mM, NaCl 338mM, EDTA 10mM, glucose 115mM). Deux variantes de solution anticoagulante (SA) ont été utilisées :

- SA à pH=4.6 (pH ajusté par de l'acide citrique 26 mM) avec 10% de formol pour le comptage hématocytaire différentiel ;

- SA à pH=7 (pH ajusté par une solution de NaOH 1N) pour le comptage hématocytaire total et pour le dosage de l'activité phénoloxydase.

Quelques microlitres du mélange hémolymphe+SA étaient placés sur des cellules de Malassez, recouverts d'une lamelle et observés au microscope au grossissement 400.

2.4.2. Dosage de l'activité phénoloxydase

L'activité phénoloxydase des hémocytes est mesurée par spectrophotométrie en enregistrant la formation de dopachrome de L.DOPA (L.dihydrophénylalanine). Le dosage de l'activité phénoloxydase est basé sur une réaction enzymatique entre l'enzyme phénoloxydase et la L.dopamine. Le produit de cette réaction est coloré, constitué par les quinones.

L'hémolymphe restant des comptages était mélangée à 200 µl de SA pH=7 et centrifugée à 700 g, pendant 5 min, à 5°C. Le surnageant était éliminé et le culot repris dans 200 µl de cacodylate tampon (sodium cacodylate 10 mM, CaCl₂ 100 mM, pH=7).

On prépare une solution de zymosan dans du cacodylate (1 mg de zymosan pour 1 ml de cacodylate). Ce zymosan est centrifugé à 2000 g, pendant 7 min. Le surnageant sera utilisé comme déclencheur de l'exocytose du système phénoloxydase.

Les suspensions cellulaires, obtenues précédemment, sont incubées dans un volume égal de zymosan, pendant 1 heure, à température ambiante.

Après incubation, le mélange est centrifugé à 700 g, pendant 2 min et 60 µl du surnageant sont placés dans les puits d'une plaque de microtitration.

25 µl de L.DOPA sont ajoutés (préparation extemporanée à 4 mg/ml dans un tampon cacodylate).

Après 10 minutes, 300 µl de cacodylate tampon sont de nouveau ajoutés. La mesure de densité optique se fait à 490 nm au lecteur de plaques de microtitration .

2.5. LES INFECTIONS BACTERIENNES EXPERIMENTALES

2.5.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des souches bactériennes est le milieu de Zobell. Ce milieu, sous forme liquide ou gélosé, est spécifique des bactéries marines halophiles.

Le milieu de Zobell est préparé comme suit:

Peser: 1 g de levure

4 g de peptone

1 l d'eau de Lewis (Lewis base : 234 g de NaCl, 15 g de KCl, 12 g de MgSO₄, 7H₂O, 1,5 g de CaCl₂ anhydre, QSP 1000 ml d'eau distillée que l'on dilue à 10 ‰ avec de l'eau distillée)

Le mélange est ensuite tamponné à pH 7.4.

La solution est répartie dans des tubes de 5 ml puis autoclavée à 120°C pendant 20 minutes.

Pour le milieu gélosé, 15 g d'agar sont ajoutés à un litre de milieu liquide avant la stérilisation à l'autoclave. Le milieu gélosé est ensuite coulé sur des boîtes de pétri, à raison de 15 ml par boîte.

Une colonie isolée de la souche AM 23 était prélevée d'une boîte de pétri contenant du milieu de Zobell solide et placée sur le milieu de Zobell liquide. Après obtention d'une première pousse, 1 ml de la culture obtenue précédemment était introduit dans un erlenmeyer contenant 200 ml de milieu de Zobell liquide stérile. La culture était maintenue en étuve à 25-27°C pendant 16 à 24 heures avant son utilisation.

2.5.2. Détermination de la dose bactérienne pour la balnéation

Pour la balnéation, la dose de suspension bactérienne voulue est directement versée dans des bailles contenant au préalable 10 l d'eau de mer.

La dose et la durée d'infection n'ont pas toujours été identiques lors de toutes nos expériences. Globalement, trois modèles ont été utilisés:

- dose 10⁵ cfu/ml pour une balnéation d'une heure,
- dose 10⁵ cfu/ml pour une balnéation de deux heures,
- dose 10⁴ cfu/ml pour une balnéation de deux heures.

2.5.3. La balnéation

Stress à l'ammoniaque: A la fin de la période de stress, les animaux étaient bagués (bagues de couleur fixées sur le pédoncule oculaire) et rapidement transportés dans les bailles de la salle d'infection de l'unité pathologie. Ils subissaient alors une balnéation de 2 heures pendant lesquels les bailles étaient oxygénées par bullage. Trois doses d'ammoniaque ont été testées en infection expérimentale, à savoir 0, 1,5 et 3 mg de N.NH₃/ml.

11 Bacs infectés par la bactérie AM 23:	11 Bacs non infectés par la bactérie AM 23:
5 crevettes non stressées	5 crevettes non stressées
5 crevettes stressées à 1.5 mg N.NH ₃ /l	5 crevettes stressées à 1.5 mg N.NH ₃ /l
5 crevettes stressées à 3 mg N.NH ₃ /l	5 crevettes stressées à 3 mg N.NH ₃ /l

Stress par hypoxie :Le protocole utilisé pour ce stress est différent de celui utilisé pour l'ammoniaque. Le stress a été réalisé sur 30 crevettes tandis qu'en parallèle 30 autres crevettes ont été mises en normoxie. Ce type de démarche a été choisi pour augmenter la puissance expérimentale de cette expérience. En effet, l'infection expérimentale n'a été réalisée qu'une fois pour le stress par hypoxie. Toutes les crevettes ont subi l'infection. Le manque de temps ne nous a pas permis de réaliser des bacs non infectés.

8 bacs infectés par la bactérie AM 23 :
4 bacs : 7-8 crevettes en normoxie (environ 6.5 ppm)
4 bacs : 7-8 crevettes en hypoxie (environ 1-1.5 ppm)

Après la balnéation, les animaux étaient transférés dans des bacs oxygénés. La mortalité a été suivie sur 5 jours pendant lesquels les animaux ont été de nouveau alimentés.

2.6. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

La taille des échantillons nécessaire pour obtenir des tests significatifs a été déterminée grâce au logiciel STATGRAPHICS.

Toutes les données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel STATVIEW 4.02. Une analyse de variance et un test a posteriori (test PLSD de Fisher) ont été effectués pour montrer l'existence ou non d'une différence significative entre les données.

Pour les tests à l'ammoniaque et à l'hypoxie, une ANOVA à un facteur a été réalisée sur la pression osmotique, les comptages hématocytaires totaux et différentiels et la proPO.

Pour les infections expérimentales concernant l'ammoniaque, une ANOVA à deux facteurs a été effectuée, les facteurs étant d'une part la dose d'ammoniaque et d'autre part l'infection.

Pour l'infection expérimentale concernant l'oxygène, un test χ^2 a été effectué dans la mesure où seulement deux traitements ont été testés.

Tous nos graphiques sont présentés avec des erreurs standards.

3. RESULTATS

3.1. EXPÉRIENCES RÉALISÉES SUR L'AMMONIAQUE

3.1.1. *Vérifications préliminaires*

3.1.1.1. Relation entre les concentrations théoriques et les concentrations réelles

Les manipulations, l'évaporation ont pu modifier significativement les concentrations en ammoniacque de l'eau. Il importait donc de vérifier les concentrations effectives dans les bacs expérimentaux.

La relation entre les valeurs théoriques et les valeurs effectivement mesurées au bout de 24 heures a été étudiée sur 29 dosages. Une régression simple donne un coefficient de corrélation R^2 de 0.9792. La pente de la droite de régression est de 1.0328. Ce résultat supérieur à 1 montre que les concentrations mesurées à $t=24$ étaient supérieures aux concentrations théoriques souhaitées. Cependant, l'analyse statistique montre que la pente ne diffère pas significativement de 1 (intervalle de confiance de la pente : [0,973-1,092]), nous pouvons donc considérer qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations théoriques et les concentrations réelles.

D'autre part, il est bon de noter que les concentrations des bacs témoins n'étaient pas nulles puisque la valeur de p pour le terme constant est significative (0,0041).

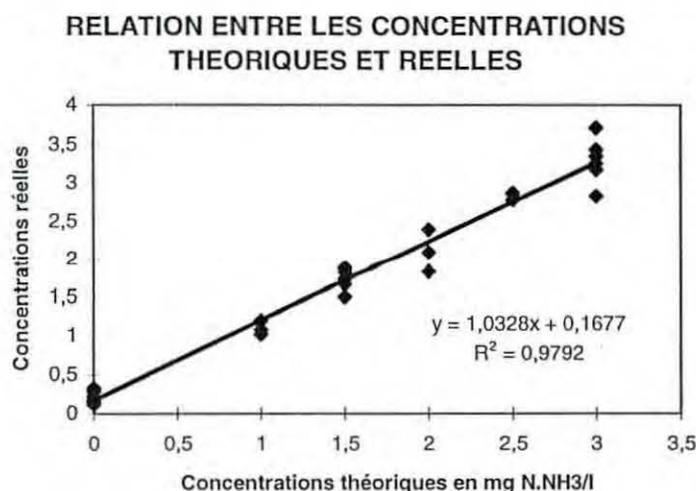


Figure 3 : Relation entre les concentrations en ammoniacque souhaitées et les concentrations réelles.

3.1.1.2. Relation entre les concentrations à $t=0$ et à $t=24$ heures

De la même façon, une régression linéaire simple a été réalisée sur des couples de concentrations (concentration à $t=0$, concentration à $t=24$), obtenus à partir de 23 dosages.

Nous avons obtenu un coefficient de corrélation R^2 de 0.9734 et une pente de régression de 0.9749. Ces résultats montrent que les concentrations ont évolué au cours du

stress, ceci pouvant s'expliquer par l'existence de mortalités dans certains bacs ainsi que par l'excrétion azotée des crevettes.

Cependant, la pente ne diffère pas significativement de 1, cette évolution n'est donc pas significative. Nous estimerons donc que les concentrations en ammoniac ne varient pas durant les 24 heures d'exposition.

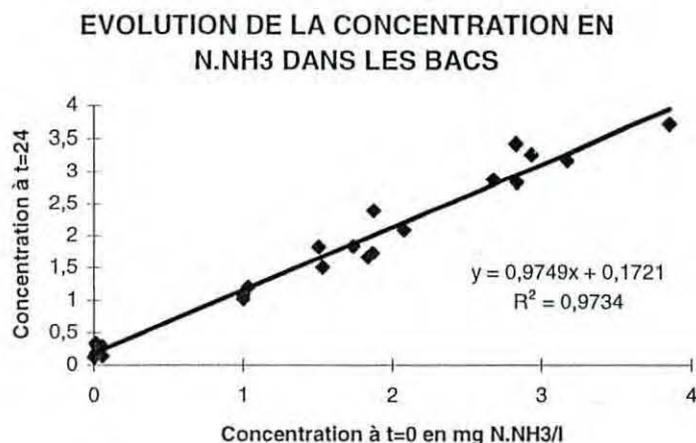


Figure 4 : Evolution de la concentration en ammoniac des bacs au cours des 24 heures

3.1.1.3. Echantillonnage

Chaque dose d'ammoniac a été appliquée sur des duplicats de dix crevettes. Cependant, il est à noter que le nombre de crevettes testées est inférieur au nombre de crevettes total. En effet, des mortalités par cannibalisme ont parfois été observées, dues au fait que les animaux n'étaient pas alimentés.

Dose d'ammoniac	PO	THC	ProPO
0 mg N.NH ₃ /l	19	19	19
1 mg N.NH ₃ /l	18	16	17
1.5 mg N.NH ₃ /l	19	18	14
2 mg N.NH ₃ /l	15	14	14
2.5 mg N.NH ₃ /l	16	16	15
3 mg N.NH ₃ /l	18	18	12

Tableau 2 : Nombre d'animaux testés par dose et par paramètre

3.1.2. Influence de l'ammoniac sur la pression osmotique

Les résultats statistiques (tableau 3) montrent une augmentation significative de la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes avec la dose d'ammoniac ($p < 0,0001$). Cette augmentation de la pression osmotique indique par conséquent que les crevettes étaient stressées par l'ammoniac.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	5	88643,444	17728,689	20,992	<,0001
Résidus	99	83611,890	844,565		

Tableau 3 : Résultat de l'analyse de variance de la pression osmotique des crevettes stressées par l'ammoniaque.

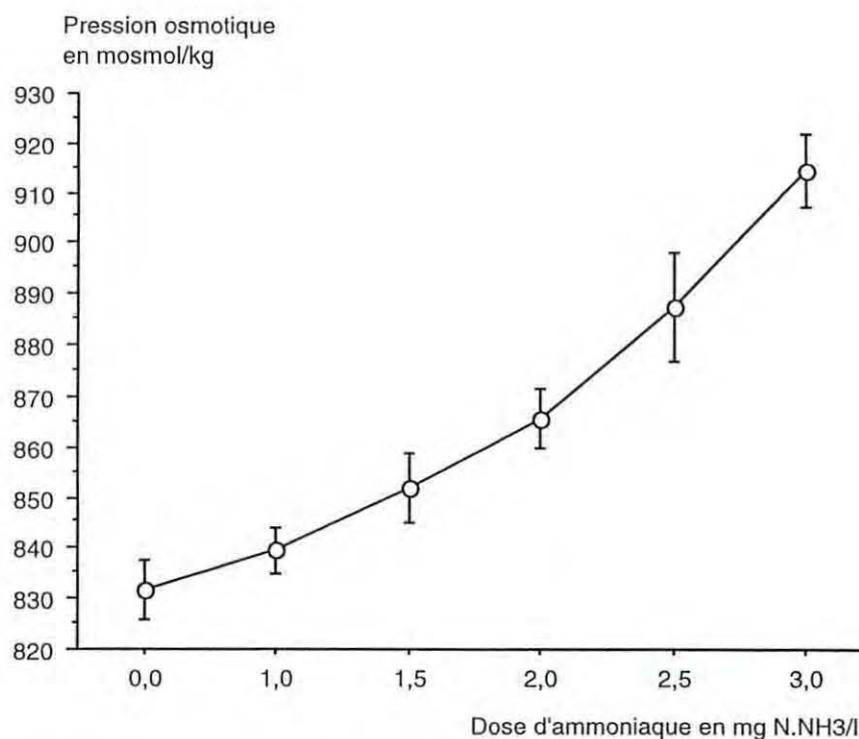


Figure 5 : Evolution de la pression osmotique en fonction de la dose d'ammoniaque

3.1.3. Influence de l'ammoniaque sur les hémocytes totaux

L'analyse de variance (tableau 4) met en évidence un effet significatif des traitements. Le test a posteriori (PLSD) (tableau 5) montre qu'à 3 mg N.NH₃/l le nombre d'hémocytes totaux est inférieur à tous les autres.

Le nombre d'hémocytes totaux des témoins est significativement inférieur à celui observé à 1 mg/l.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	5	51342,629	10268,526	7,646	<,0001
Résidus	95	127576,282	1342,908		

Tableau 4 : Résultat de l'analyse de variance pour les hémocytes totaux des crevettes stressées par l'ammoniaque

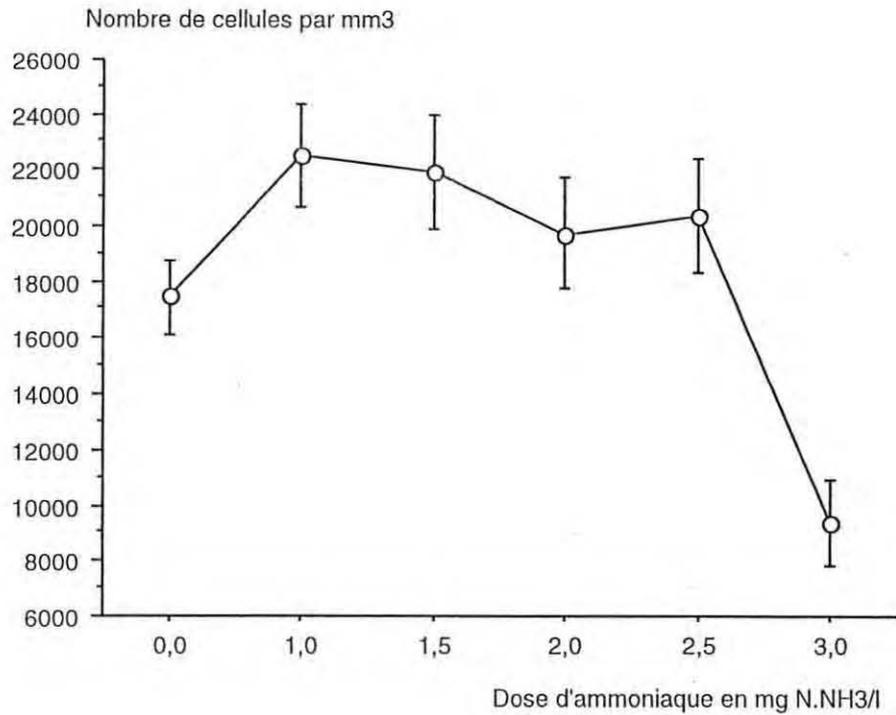


Figure 6 : Evolution du nombre d'hémocytes totaux en fonction de la dose d'ammoniaque

	Ecart moyen	Ecart critique	Valeur de p	
0,0, 1,0	-25,122	24,685	,0462	S
0,0, 1,5	-22,351	23,929	,0668	
0,0, 2,0	-11,470	25,624	,3764	
0,0, 2,5	-14,747	24,685	,2386	
0,0, 3,0	40,260	23,929	,0012	S
1,0, 1,5	2,771	24,997	,8263	
1,0, 2,0	13,652	26,624	,3113	
1,0, 2,5	10,375	25,721	,4253	
1,0, 3,0	65,382	24,997	<,0001	S
1,5, 2,0	10,881	25,925	,4068	
1,5, 2,5	7,604	24,997	,5473	
1,5, 3,0	62,611	24,250	<,0001	S
2,0, 2,5	-3,277	26,624	,8075	
2,0, 3,0	51,730	25,925	,0001	S
2,5, 3,0	55,007	24,997	<,0001	S

Tableau 5 : PLSD de Fisher pour les hémocytes totaux, niveau de signification 5%

3.1.4. Influence de l'ammoniaque sur l'activité de la phénoloxydase

Les analyses statistiques (tableau 6) ne montrent pas de variation significative de l'activité phénoloxydase en fonction de la dose d'ammoniaque.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	5	,043	8,544E-3	1,741	,1336
Résidus	87	,427	4,906E-3		

Tableau 6 : Résultat de l'ANOVA de l'activité de la phénoloxydase des crevettes stressées par l'ammoniaque

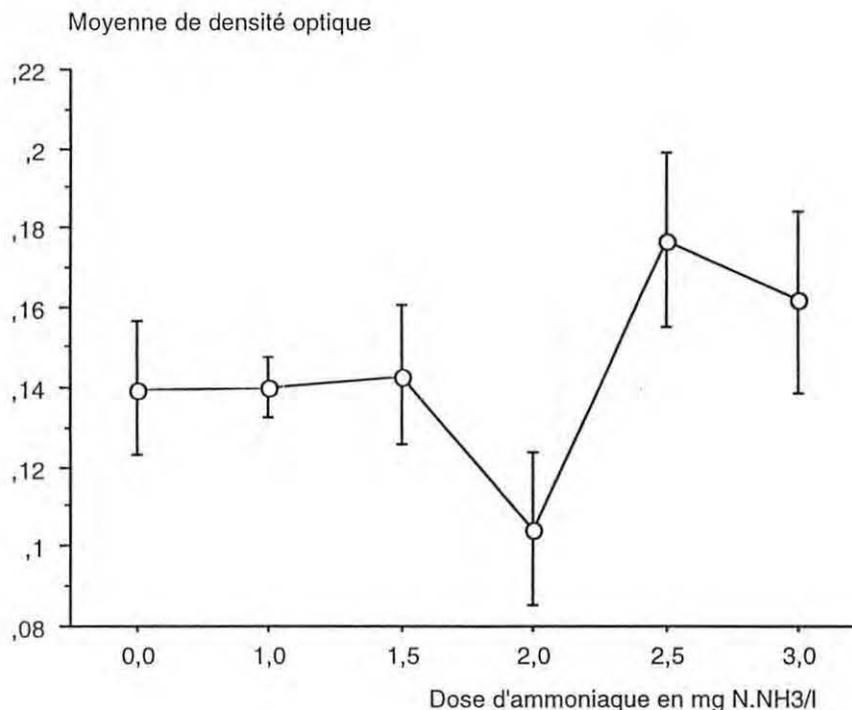


Figure 7 : Evolution de l'activité phénoloxydase en fonction de la dose d'ammoniaque

3.1.5. Influence de l'ammoniaque sur les différents types hémocytaires

L'absence de variation significative de l'activité de la phénoloxydase nous a conduit à réaliser une expérience de comptage différentiel. En effet, il semblait intéressant de voir si un type hémocytaire était plus particulièrement touché par un stress à l'ammoniaque.

Seules les doses 0, 1.5 et 3 mg N.NH₃/l ont été testées, chacune sur 10 crevettes.

Les résultats statistiques (tableau 7) confirment une diminution significative des hémocytes totaux. La différence est significative entre les doses (0-1.5) et (0-3), mais pas entre les doses (1.5-3).

Le comptage des différents types hémocytaires indique une baisse significative du nombre de cellules hyalines avec la dose d'ammoniaque. Par contre, si le nombre de LGC et SGC diminue, cette baisse n'est pas significative.

	Hémocytes totaux (THC)	Cellules à grands granules (LGC)	Cellules semi-granuleuses (SGC)	Cellules hyalines (HC)
Valeur du F	7,595	0,676	0,886	7,064
Valeur de p	0,0028 significatif	0,5179 non significatif	0,4255 non significatif	0,0039 significatif

Tableau 7 : Résultat de l'analyse statistique (ANOVA) pour chacun des types hémocytaires

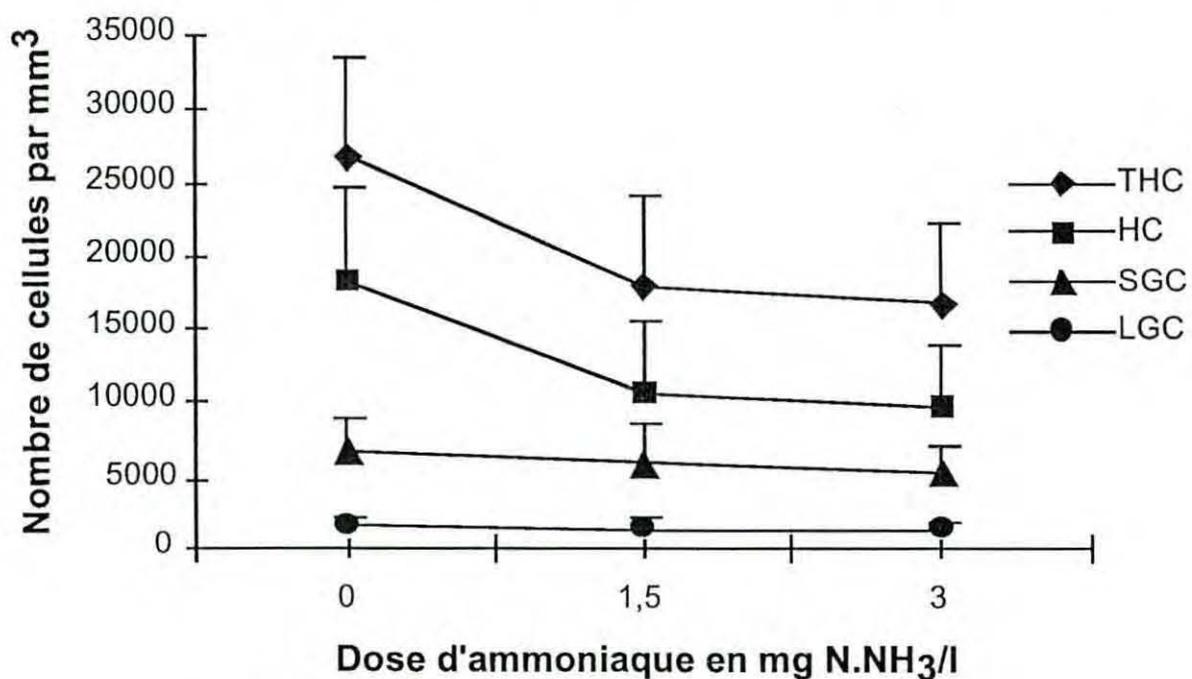


Figure 8 : Evolution des différents types hémocytaires en fonction de la dose d'ammoniaque

3.1.4. Stress à l'ammoniaque suivi d'une infection expérimentale

Deux expériences d'infection ont été réalisées, uniquement sur les doses 0, 1.5 et 3 mg N.NH₃/l.

Lors de la première expérience, l'infection a été effectuée par une baignade d'une heure à la dose de $2 \cdot 10^5$ cfu/ml.

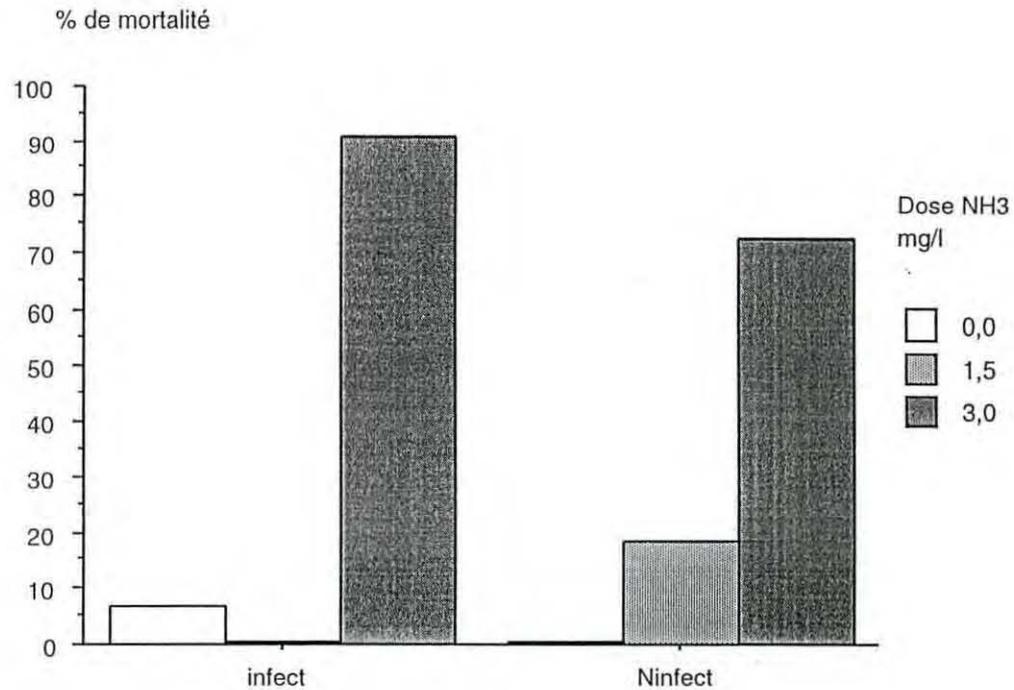


Figure 9 : % de mortalité au cinquième jour en fonction des deux facteurs dose d'ammoniaque et infection

Les résultats montrent des mortalités sensiblement équivalentes pour les bacs infectés comme pour les non infectés. Cette expérience a seulement permis d'enregistrer des mortalités dues au stress et non à l'infection. On observe alors un effet dose, à savoir une mortalité croissante avec la dose d'ammoniaque.

L'absence de résultats concernant l'infection peut s'expliquer par le caractère aléatoire de la virulence de la bactérie ou par un temps de contact trop faible entre les crevettes et la bactérie.

Pour cela, une autre expérience a été effectuée en deux temps avec une baignade de deux heures et toujours à la dose de 2.10^5 cfu/ml. Les résultats ont été cumulés.

Les résultats statistiques présentés dans le tableau 8 ont été obtenus à partir d'une ANOVA plan factoriel réalisée sur les pourcentages de mortalité transformés en valeur arcsinus. Cette transformation mathématique des proportions permet de linéariser la variance. Elle est nécessaire pour étendre la zone de validité des résultats. On passe ainsi d'une gamme de validité de [25%-75%] à [5%-95%].

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
DoseNH3	2	,087	,044	1,674	,2644
Infexp	1	1,857	1,857	71,316	,0002
DoseNH3 * Infexp	2	9,212E-3	4,606E-3	,177	,8421
Résidus	6	,156	,026		

Tableau 8 : ANOVA à deux facteurs pour la deuxième expérience d'infection

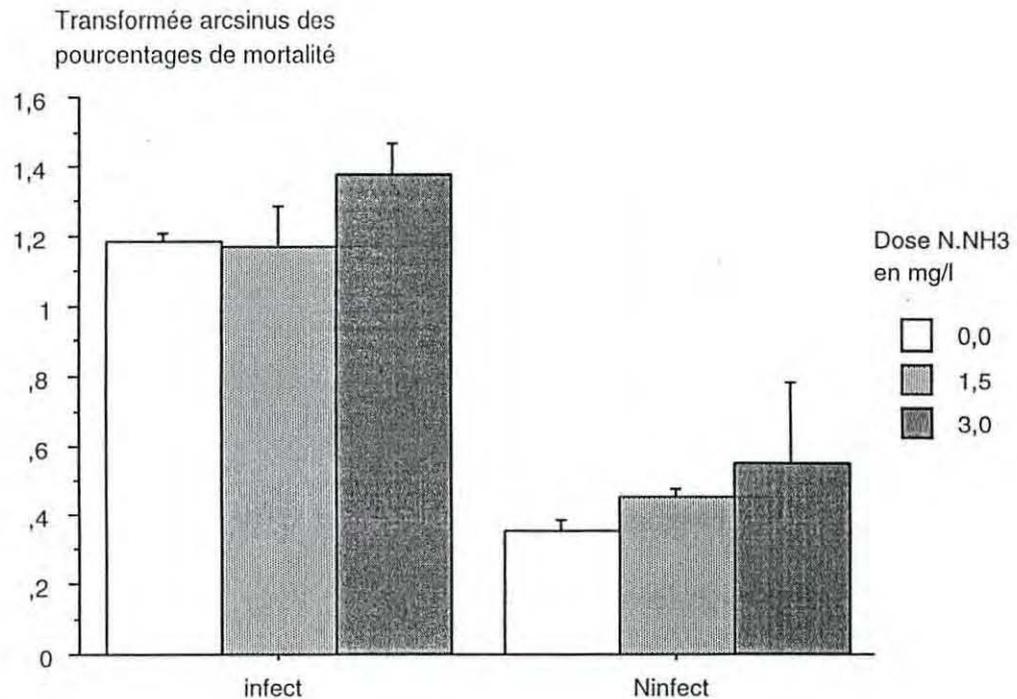


Figure 10 : Valeur arcsinus des % de mortalité au cinquième jour en tenant compte des deux facteurs

L'ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif de l'infection, mais aucun effet significatif de la dose d'ammoniaque comme de l'interaction stress-infection. Chez les crevettes non infectées, les résultats confirment ceux obtenus lors de la première balnéation, c'est-à-dire une mortalité croissante avec la dose d'ammoniaque (figure 10). Chez les crevettes infectées, on observe plus de 80% de mortalité au bout de 5 jours et ce pour toutes les doses. L'effet dose semble nettement moins marqué chez les infectées. On peut néanmoins constater une mortalité légèrement plus élevée chez les animaux stressés à la dose 3 mg. Les mortalités sont sensiblement équivalentes entre les doses 0 et 1.5 mg.

L'erreur standard est importante pour les résultats concernant les animaux non infectés et stressés à 3 mg/l. Ceci s'explique par l'obtention de pourcentages de mortalité très différents lors des deux parties de l'expérience : au cours de la première partie, on a obtenu 50 % de mortalité contre 9,9 % au cours de la deuxième partie.

3.2. EXPÉRIENCES RÉALISÉES SUR L'OXYGÈNE

3.2.1. Echantillonnage

Les expériences ont porté sur des triplicats de 10 crevettes, mais, là encore le nombre de crevettes testées est inférieur au nombre total de crevettes.

Traitement	PO	THC	proPO
hypoxie	28	22	22
normoxie	30	26	28

Tableau 9 : Nombre d'animaux testés par traitement et par paramètre

Les crevettes choisies pour cette expérience ont un poids moyen inférieur à celui utilisé pour l'intoxication à l'ammoniaque afin d'obtenir une meilleure réponse au stress.

3.2.2. Influence du taux d'oxygène sur la pression osmotique

Les analyses statistiques (tableau 10) montrent une augmentation très significative de la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes mises en hypoxie par rapport aux crevettes témoins. Celles-ci ont donc bien subi un stress.

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	1	47843,974	47843,974	42,128	<,0001
Résidus	56	63598,095	1135,680		

Tableau 10 : Résultat de l'ANOVA de la pression osmotique des crevettes en hypoxie

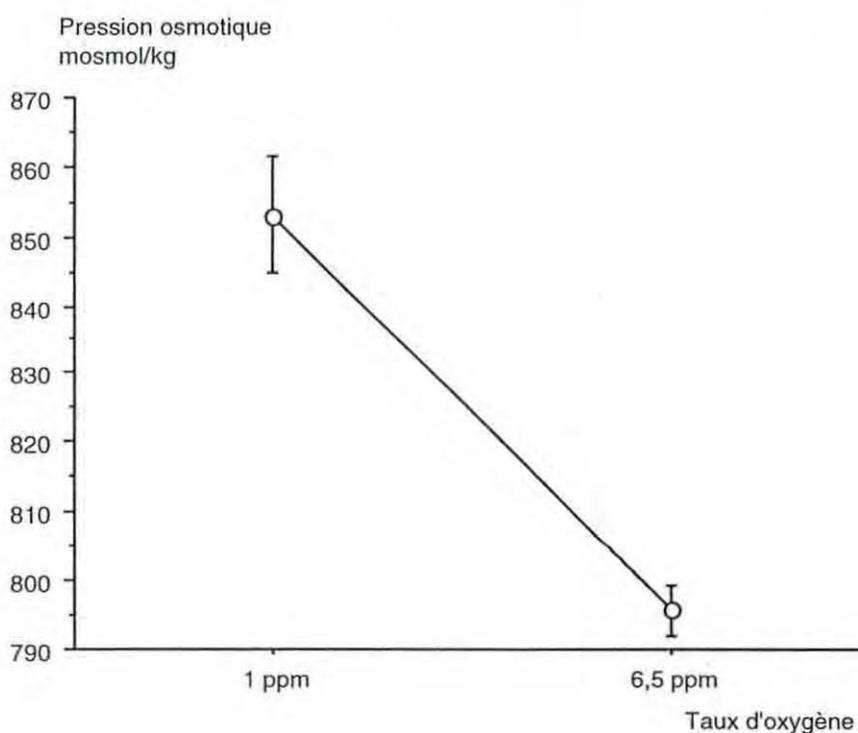


Figure 11 : Evolution de la pression osmotique en fonction du taux d'oxygène

3.2.3. Influence du taux d'oxygène sur les hémocytes totaux

On enregistre une diminution du nombre d'hémocytes des crevettes stressées par rapport aux témoins. Cette baisse n'apparaît pas significative lors de l'analyse statistique (valeur de p : 8.7%).

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	1	4254,548	4254,548	3,056	,0871
Résidus	46	64031,119	1391,981		

Tableau 11 : Résultat de l'ANOVA pour les hémocytes totaux des crevettes mises en hypoxie

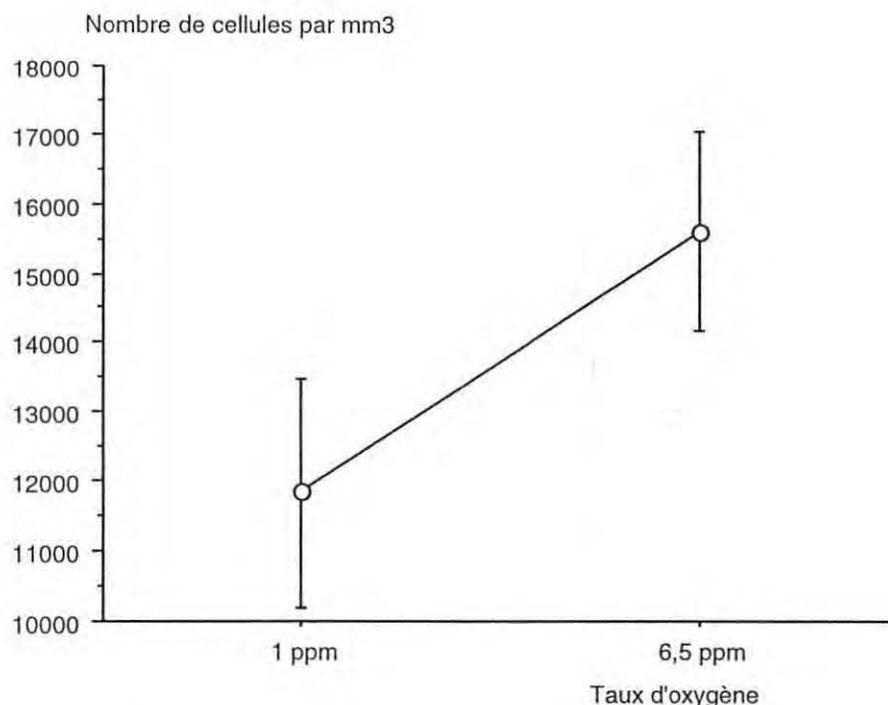


Figure 12 : Evolution du nombre d'hémocytes totaux en fonction du taux d'oxygène

De plus, on peut noter que le nombre d'animaux testés pour ce paramètre est très inférieur au nombre total d'animaux. Ceci s'explique, outre par quelques mortalités, par des difficultés de prélèvements de l'hémolymphe étant donné la petite taille des crevettes.

3.2.4. Influence du taux d'oxygène sur l'activité de la phénoloxydase

L'activité de la phénoloxydase est significativement diminuée chez les animaux en hypoxie (p : 1,36 %).

	DDL	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p
traitement	1	,038	,038	6,564	,0136
Résidus	48	,278	5,799E-3		

Tableau 12 : Résultat de l'ANOVA de l'activité phénoloxydase des crevettes en hypoxie

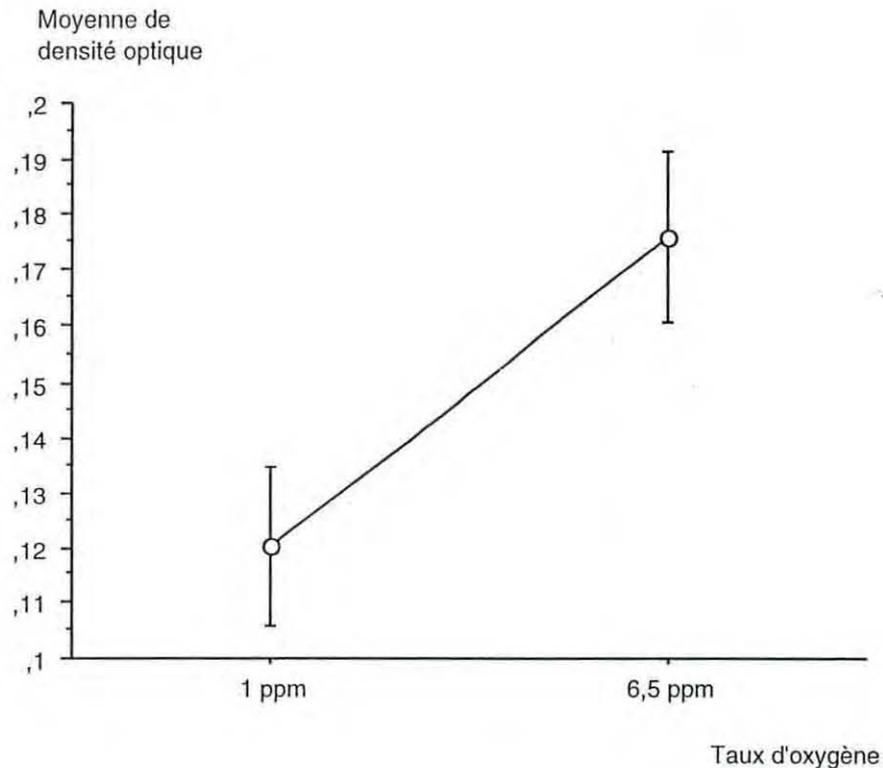


Figure 13 : Evolution de l'activité phénoloxydase en fonction du taux d'oxygène

3.2.5. Stress par hypoxie suivi d'une infection expérimentale

L'infection expérimentale par baignation a cette fois été réalisée à la dose de 10^4 cfu/ml pendant 2 heures.

Traitement	Nombre d'animaux testés	Nombre de mortes	% de mortalité
Normoxie	29	14	48
Hypoxie	30	18	60
	χ^2 observé : 0,83		
	χ^2 théorique : 3,84 1 ddl $\alpha = 0,05$	Test non significatif	

Tableau 13 : Résultats du test χ^2 pour le stress hypoxique suivi d'une infection expérimentale

Le résultat (tableau 13) montre que la DL50 (dose létale entraînant 50 % de mortalité) est approchée pour les animaux non stressés.

Cependant, un test χ^2 ne met pas en évidence une différence significative due au stress.

Il est donc impossible de conclure, compte-tenu du dispositif expérimental mis en place, à une augmentation de la mortalité lorsqu'il y a eu stress hypoxique.

4. DISCUSSION

Tout d'abord, nous noterons que nous avons pris en compte l'influence des stress dus aux différentes manipulations: pêche, tri des stades de mue, transfert dans les bacs d'expérimentation par la mise en place systématique de bacs témoins (dose 0 d'ammoniacale, taux d'oxygène en saturation). Ceci a permis de comparer les résultats obtenus sur des animaux stressés, à ceux obtenus sur des animaux non stressés mais ayant subi les mêmes conditions de manipulation.

INFLUENCE DE L'AZOTE AMMONIACAL ET DE L'OXYGÈNE SUR LA PRESSION OSMOTIQUE

L'objectif de la mesure de la pression osmotique était de vérifier qu'il y avait bien eu stress.

L'ensemble de nos résultats confirme ceux précédemment acquis au COP. En effet, l'augmentation significative de la pression osmotique de l'hémolymphe des crevettes avec la concentration en ammoniacale montre que *P. stylirostris* subit un stress lors d'une intoxication de 24 heures à l'ammoniacale. Il existe un effet dose, la pression osmotique augmentant corrélativement avec la concentration en azote ammoniacal. Plus la dose est importante, plus les désordres physiologiques subis par la crevette sont importants.

De même, un stress hypoxique provoque des modifications de la pression osmotique des crevettes. Un stress hypoxique de 24 heures engendre un mauvais état physiologique des animaux, ces résultats confirmant ceux obtenus par *AQUACOP et al.* (1992) et *Charmantier et al.* (1993).

INFLUENCE DE L'AZOTE AMMONIACAL ET DU TAUX D'OXYGÈNE SUR LES DÉFENSES IMMUNITAIRES

A notre connaissance, aucune étude n'avait été réalisée auparavant sur les conséquences des facteurs environnementaux, et notamment l'ammoniacale et l'oxygène, sur les défenses immunitaires des crevettes. Nous ne disposons donc d'aucun résultat nous permettant de comparer ceux que nous avons acquis.

* Influence de l'azote ammoniacal et du taux d'oxygène sur les hémocytes totaux :

Un premier résultat montre une augmentation significative du nombre d'hémocytes totaux alors que les crevettes ne sont stressées qu'à 1 mg N.NH₃/l. Ceci pourrait indiquer un effet stimulant de l'ammoniacale sur la production d'hémocytes par les tissus hématopoïétiques.

Les résultats montrent une diminution très significative de la résistance des crevettes au-delà de 2.5 mg N.NH₃/l (proche des doses létales) (*Cochard et al.*, 1996).

Un stress hypoxique induit une baisse du nombre d'hémocytes totaux mais cette diminution n'étant pas significative, on ne peut pas conclure à une altération de ce niveau de défense.

* Influence de l'azote ammoniacal et du taux d'oxygène sur le système phénoloxydase et les différents types hémocytaires :

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure à une affection de l'activité de l'enzyme phénoloxydase lors d'un stress ammoniacal. Une intoxication à l'ammoniaque ne semble pas altérer ce niveau de défense.

A l'issue du comptage différentiel, on observe une chute significative du nombre de cellules hyalines par rapport aux cellules à grands granules et semi-granuleuses.

On peut donc accepter l'hypothèse selon laquelle les cellules hyalines sont plus particulièrement touchées par une intoxication à l'ammoniaque.

Deux conclusions peuvent être tirées de cette première expérience:

- un effet stimulant de l'ammoniaque sur les cellules hyalines lorsqu'il est présent dans le milieu à de faibles doses (conclusion restant cependant à vérifier).

- un effet toxique de l'ammoniaque sur ces mêmes cellules lorsqu'il atteint de fortes concentrations. En effet, les cellules hyalines disparaissent. Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer cette disparition: soit leur turn-over est ralenti voire stoppé, soit ces cellules sont mobilisées dans des organes de type branchies, coeur, glande digestive (*Smith and Ratcliffe, 1980*). Chez *Sicyonia ingentis*, les cellules hyalines sont les cellules ayant la plus faible activité mitotique parmi les différents types cellulaires recensés chez ce crustacé (*Hose et al., 1992*). En revanche, chez cette même espèce, l'activité mitotique des cellules granuleuses est plus élevée. On peut donc penser que les crevettes, en compensant leur faible nombre de granulocytes par un index mitotique plus élevé, privilégient les défenses liées à ces cellules par rapport à la coagulation des cellules hyalines, dans le cas d'une intoxication à l'ammoniaque.

L'activité de l'enzyme phénoloxydase est affectée par un stress hypoxique. Dans ce cas, les cellules à grands granules et les cellules semi-granuleuses pourraient être les hémocytes touchés en priorité par ce type de stress. Or les LGC et les SGC sont moins nombreuses en proportion par rapport aux cellules hyalines. Ceci pourrait expliquer la baisse non significative des hémocytes totaux. La diminution du nombre d'hémocytes totaux pourrait n'être due qu'à une diminution du nombre de LGC et de SGC.

Cette hypothèse reste à vérifier par un comptage hémocytaire différentiel.

EFFETS CONJUGUÉS D'UN STRESS ET D'UNE INFECTION EXPÉRIMENTALE SUR LA MORTALITÉ

Au cours de ces expériences, nous avons rencontré plusieurs problèmes concernant le modèle d'infection. En effet, si la balnéation constitue le modèle d'infection le plus approprié pour les expériences menées au COP, il reste encore beaucoup d'incertitudes. Notamment, aucune durée de balnéation, ni dose de suspension bactérienne optimales à appliquer n'ont encore pu être déterminées de façon définitive. Le vibrio AM 23 a une croissance variable et les comptages bactériens restent relativement imprécis. Dans ces conditions, il a souvent été impossible de répéter les expériences dans les mêmes circonstances.

A l'issue de toutes les expériences que nous avons réalisées, il semble que le meilleur modèle soit atteint à la dose de 10^4 cfu/ml pour une durée de balnéation de deux heures. De cette façon, on obtient un effet certain de l'infection et une mortalité qui n'est pas trop rapide.

L'objectif de ces expériences était de tester l'interaction entre un facteur environnemental (dans notre cas l'ammoniaque et l'oxygène) et l'infection, et d'observer si des animaux stressés survivaient moins bien à une infection que des animaux non stressés.

Compte-tenu du dispositif expérimental mis à notre disposition, il nous a été impossible de déceler une interaction significative entre le stress (qu'il soit à l'ammoniaque comme à l'oxygène) et l'infection. Actuellement, il nous est donc impossible d'affirmer qu'un stress, dû à un de ces facteurs environnementaux, favorise une aggravation de l'état de l'animal en présence d'une infection bactérienne.

Cependant, il est possible d'augmenter la puissance expérimentale (augmentation du nombre de réplicats) afin d'atteindre la significativité. A partir des résultats obtenus lors de la deuxième expérience (expérience en deux parties) de balnéation ammoniacque, nous avons calculé le nombre de réplicats (un réplicat correspond à un bac) nécessaires pour mettre en évidence une différence de 10 % des pourcentages de mortalité (*cf. annexe : Calcul du nombre de réplicats*).

Sur la base de l'écart-type moyen rencontré au cours de ces expériences, il serait nécessaire de réaliser 19 réplicats pour mettre en évidence une augmentation de 10 % de la mortalité consécutive aux balnéations des animaux stressés (*cf. annexe*).

Cette valeur est assez élevée mais le protocole est toutefois possible à mettre en oeuvre. Si on prend les valeurs extrêmes des écart-types relevés lors de l'expérience à savoir 0,089 et 0,218, il faudrait respectivement 7 et 42 réplicats par traitement. Il est totalement impossible de mettre en place une expérience avec 42 réplicats.

Les expériences de stress+infection pourraient donc aboutir si l'on augmente de façon conséquente le nombre de réplicats. Il est également possible d'augmenter le nombre d'animaux par réplicat. Cependant, tant qu'un modèle de balnéation stable n'aura pas été défini, il semble illusoire d'espérer obtenir des résultats fiables sur les taux de mortalité.

CONCLUSION

Nous avons montré au cours de cette étude que les capacités de défense de la crevette *Penaeus stylirostris* sont modifiées à l'issue d'un stress environnemental. Les paramètres immunitaires mesurés chez *P. stylirostris* diminuent lors d'une intoxication de 24 heures à l'ammoniacque ou d'un stress hypoxique de 24 heures.

Dans le cas d'un stress ammoniacal, la capacité osmorégulatrice diminue, montrant que l'animal a des difficultés à s'adapter à son environnement. Un comptage hémocytaire a ensuite montré que le niveau de défense altéré était les cellules hyalines.

De la même façon, nous avons montré, toujours par la mesure de la pression osmotique de l'hémolymphe, qu'un stress hypoxique entraîne une dégradation de l'état physiologique de l'animal. Contrairement à l'ammoniacque, l'hypoxie affecte particulièrement le fonctionnement du système prophénoloxydase.

Il sera intéressant de tester les effets de ces mêmes stress sur d'autres niveaux de défense tels que la capacité de phagocytose, mesurée par le niveau du métabolisme oxydatif intracellulaire, ou encore l'activité antibactérienne de l'hémolymphe (défense humorale).

Un des objectifs principaux de ce travail était également de modéliser en enceinte confinée l'effet conjugué de chacun des deux stress cités et d'une infection expérimentale par le vibrio AM 23; ces deux faits étant observés ensemble durant les épisodes de mortalité chez les crevettes en Nouvelle-Calédonie. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune corrélation significative entre ces deux facteurs (ammoniacque comme oxygène) à l'aide de nos dispositifs expérimentaux.

Il conviendra de déterminer définitivement (autant que cela puisse être possible compte-tenu du caractère aléatoire de la virulence du vibrio) les paramètres de la balnéation, afin d'obtenir une infection bactérienne expérimentale reproductible. Il faudra ensuite renouveler les expériences à partir des propositions émises au cours de la discussion.

ANNEXE

Détermination du nombre de réplicats nécessaires pour mettre en évidence une différence de 10 % de la mortalité consécutive à l'infection d'animaux stressés.

Expérimentation	% de mortalité moyens	Valeur arcsinus des % de mortalité	Valeur arcsinus de l'écart-type	Ecart-type moyen
1ère partie, infectés	84,43	1,178	0,12	
2ème partie, non infectés	91,8	1,305	0,157	0,146
1ère partie, infectés	27,5	0,535	0,218	
2ème partie, non infectés	13,5	0,373	0,089	

Détermination de l'écart-type moyen

	% de mortalité	Valeur arcsinus
Hypothèse nulle	50	0,79
Hypothèse alternative	60	0,89
α (risque de 1ère espèce)	0,05	
β (risque de 2ème espèce)	0,1	
	Ecart-type en arcsinus	Nombre de réplicats
Minimum observé	0,089	7
Moyenne	0,146	19
Maximum observé	0,218	42

Détermination du nombre de réplicats par STATGRAPH

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS A. (1991) Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio sp.*. *Fish and Shellfish Immunology*, 1 : 59-70.

AMINOT A., CHAUSSEPIED M. (1983) Manuel d'analyses chimiques en milieu marin. *Centre National pour l'exploitation des Océans*, 107-117.

BOUARICHA N. (1990) Ontogénèse de l'osmorégulation chez la crevette *Penaeus Japonicus*. *Thèse Doctorat, Université de Montpellier II* : 1-77.

CERENIUS L., HENTONEN P., LINDQVIST D.V. and SODERHALL K. (1991) The crayfish pathogen *Sporospermium haeckeli* activates the prophenoloxylase activating enzyme system of freshwater crayfish *in vitro*, *Aquaculture*. 99:225-233.

CHARMANTIER G. (1991) Evaluation de l'état physiologique des crevettes pénéides en élevage, *Rapport de Mission de Recherche au Centre Océanologique du Pacifique*.

CHARMANTIER G., BOUARICHA N., CHARMANTIER-DAURES M., THUET P., TRILLES J.P. (1989) Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicator of physiological state of penaeid shrimps, *Europ. Aquat. Soc. Spec. Publ.* 10 : 65-66.

CHARMANTIER G., SOYEZ C., AQUACOP (1993) Evaluation de l'état physiologique des crevettes pénéides en élevage, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Soumise*.

CHEN J.C., KOU Y.Z. (1992) Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia, *Aquaculture* 109 : 177-185.

CHEN J.C., LIN C.Y. (1993) Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels, *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 102C (2)* : 287-291.

CORNICK and STEWART (1978) Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes : classification, differential counts, and associated agglutinin activity *J. Invert. Pathol.*, 31, 194-203.

DRACH P. and TCHERNIGOVITZEFF C. (1967) Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés, *Vie milieu*, 18 A : 595-610.

EVANS E.E., PAINTER B., EVANS M.L., WEINHEIMER P. and ACTON R.L. (1968) An induced bactericidin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128 : 384-388.

FICHET D. (1993) Comportement hypo et hyper-osmorégulateur de *Penaeus stylirostris* après un stress hypoxique subi en milieu isotonique. *Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Française du Pacifique* : 1-34.

HOSE J.E., MARTIN G.G., TIU S. and MCKRELL N. (1992) Patterns of haemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*, *Bio. Bull.* 183 : 185-199.

JOHANSSON M.W. and SODERHALL K. (1989) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system, *Parasitology Today*, vol.5, n°6.

KOROLEFF F. (1969) Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue, *ICES, C.M. 1969/C* : 9 hydr Comm.

LLORCA A. (1994) Influence de l'azote ammoniacal sur la survie et la capacité osmorégulatrice chez deux espèces de crevettes péneïdes (*P. stylirostris*, *P. vannamei*), Mémoire de fin d'études.

MANTEL L.H, FARMER L.L. (1983) Osmotic and ionic regulation. In : *The biology of crustacea*. D.E.BLISS, ed., in chief, vol 5 : *Internal anatomy and physiological regulation*, MANTEL L.H. : 53-161.

MARTIN G.G., POOLE D., POOLE C., HOSE J.E., ARIAS M., REYNOLDS L., MCKRELL N. and WHANG A. (1993) Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J of Invertebrate Pathology*, 62 : 308-315.

MARTIN J.L. (1995) Grandeur et vicissitudes de la crevette d'élevage. *Recherches marines* n°10, Janvier 1995.

MONGODIN M.E. (1995) Conséquences physiologiques d'infections bactériennes expérimentales chez *Penaeus stylirostris*, *Rapport de stage*.

NEWMAN M.C. and FENG S.Y. (1982) Susceptibility and resistance of the rock crab, *Cancer irroratus*, to natural and experimental bacterial infection. *J of Invertebrate Pathology*; 40 : 75-88.

PEQUEUX A., GILLES R., MARSHALL W.S. (1988) Na⁺Cl⁻ transport in gills and related structures. In : *Advances in comparative and environmental physiology*. GREGER R., ed., Springer, Berlin : 1-73.

PERSSON M., CERENIUS L. and SODERHALL K. (1987) The influence of haemocyte number on resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *J. Fish. Diseases*. 10 : 471-477.

RODRIGUEZ-LEON J. (1994) Contribution à l'étude du système immunitaire de la crevette péneïde *Penaeus Japonicus*. Thèse de l'Université d'Auvergne.

SAGRISTA E. and DUFORT M. (1990) Ultrastructural study of hemocytes and phagocytes associated with haemolymphatic vessels in the hepatopancreas of *Palaemonetes zariquiyri* (Crustacea, Decapoda). *J of Morphology*, 206 : 173-180.

SMITH V.J. and RATCLIFFE N.A. (1980) Cellular defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*, in vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria. *J of Invertebrate Pathology*, 35 : 65-74.

SMITH V.J. and RATCLIFFE N.A. (1980) Host defense reaction of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) : Clearance and distribution of injected test particles. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 60 : 89-102.

TSING A., ARCIER J.M. and BRÉHÉLIN M. (1989) Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps : morphology, cytochemistry and hemograms. *J. of Invertebrate Pathology*, 53 : 64-77.