



COMPTE RENDU D'ACTIVITE
DU
LABORATOIRE D'AQUACULTURE TROPICALE

--00000--

PERIODE : JANVIER A DECEMBRE 1995



Centre Océanologique du Pacifique

B.P. 7004 TARAFAO - TAHITI - Polynésie Française
Tél. 57.12.74 - Télécopie : (689) 57.24.77

COMPTE RENDU D'ACTIVITE
DU
LABORATOIRE D'AQUACULTURE TROPICALE

--00000--

PERIODE : JANVIER A DECEMBRE 1995

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

Adresse : IFREMER
BP7004
TARAVAO
Tahiti-Polynésie Française

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES	
DEPARTEMENT	RESSOURCES
AQUACOLES	
STATION/LABORATOIRE	TAHITI

AUTEUR (S): AQUACOP	CODE: <u>DRV/AQ/TAH/96.19</u>
TITRE : Compte-rendu d'activité du laboratoire d'Aquaculture Tropicale - Janvier à Décembre 1995.	date : Mars 1996 Tirage :
	Nb pages : Nb figures : Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° :	DIFFUSION : Libre : Restreinte : confidentielle :

RESUME

Bilan de l'activité des différents programmes du laboratoire Aquaculture Tropicale du Centre Océanologique du Pacifique :

- Crevettes pénéides : Ecophysiologie, Pathologie, Nutrition, Génétique, Cryoconservation, Physiologie du développement
- Huître perlière

ABSTRACT

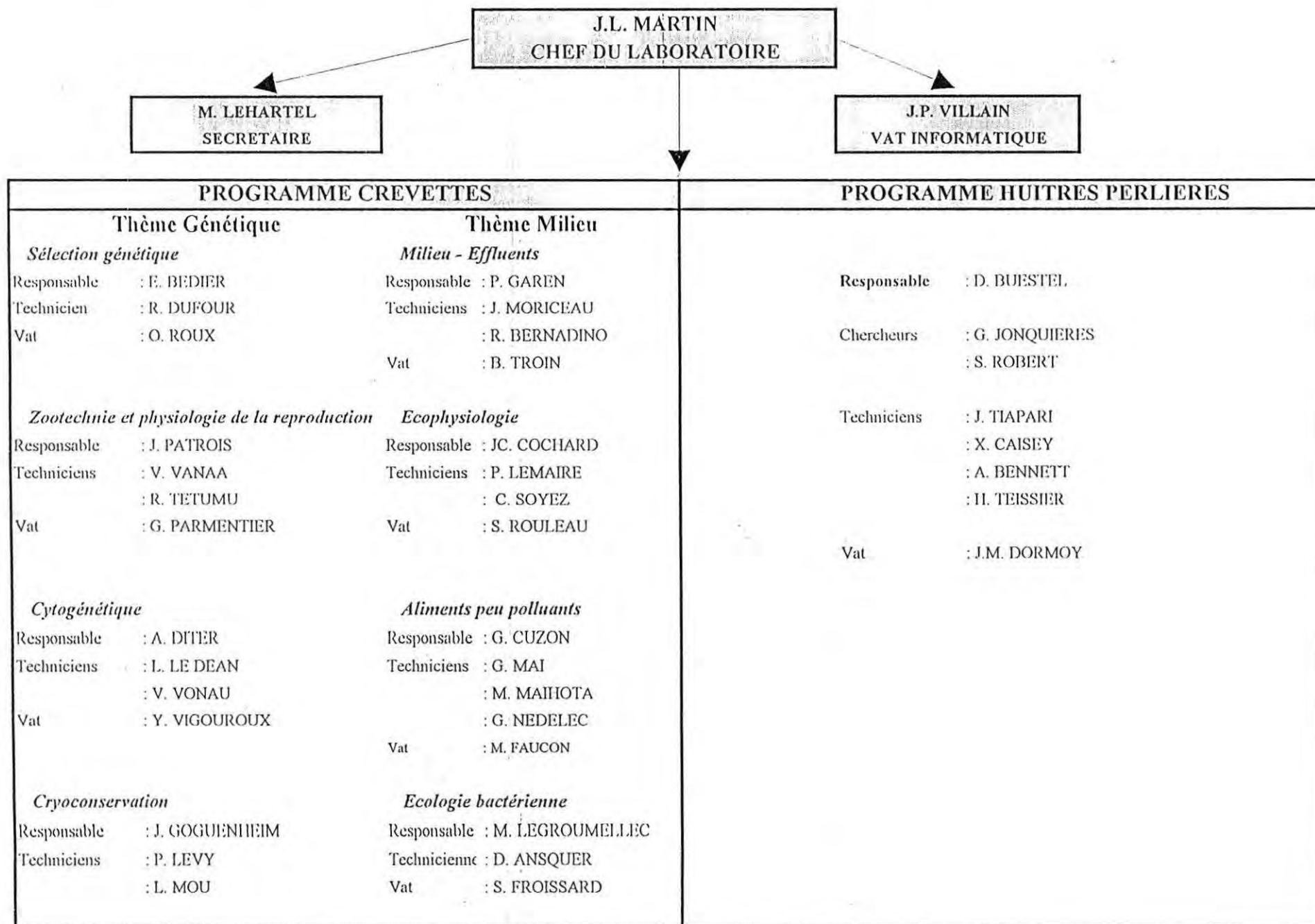
Progress report of the different laboratories of the "Centre Océanologique du Pacifique" (January to December 1995) :

- Peneid shrimp : Ecophysiology, Pathology, Nutrition, Genetics, Cryopreservation, Development physiology
- Pearl oyster : Ecophysiology, Nutrition

mots clés : Aquaculture tropicale, pénéides, huîtres perlières, Polynésie Française

key words: Tropical aquaculture, peneid shrimp, pearl oyster, French Polynesia

ORGANIGRAMME DU LABORATOIRE AQUACULTURE TROPICALE DU C.O.P. AU 1/01/96



1 - PERSONNELS AFFECTES AU LABORATOIRE

1.1. Personnels statutaires affectés au laboratoire aquaculture tropicale du C.O.P. (1995)

Nom et Prénom	Catégorie	Taux d'activité	Affectation par projet (nomenclature analytique)
<u>Cadres</u>			
BEDIER Edouard	C2	100 %	140442-140504
BUESTEL Dominique	C2	100 %	140720
COCHARD Jean-Claude	C2	100 %	140422-140410-140720-140504
CUZON Gérard	C2	100 %	140452-140504
DITER Alain	C1	100 %	140442-140504
GAREN Pierre	C2	100 %	140802-140504
GOGUENHEIM Jean	C1	100 %	140504-140434
JONQUIERES Gérard	C1	100 %	140720
LE MOULLAC Gilles	C1	100 %	140462-140422-140504
MARTIN Jean-Louis	C3	100 %	140000
PATROIS Jacques	C2	100 %	140432-140504
ROBERT Stéphane	C1	100 %	140720
<u>T.A.</u>			
ANSQUER Dominique	G4	100 %	140462-140504
BENNETT Auguste	G4	100 %	140720
BERNARDINO René	G4	100 %	140802-140504
CAISEY Xavier	G4	100 %	140720
DUFOUR Robert	G4	100 %	140442-140504
LE DEAN Loïc	G5	100 %	140442-140504
LEHARTEL Mathilde	G3	80 %	140000
LEMAIRE Pierrette	G4	80 %	140422-140410-140720-140504
LEVY Péva	G3	100 %	140504-140434-140462
MAI Gérald	G4	100 %	140452-140504
MAIHOTA Mayaline	G4	100 %	140452-140504
MORICEAU Jacques	G5	100 %	140802-140504
MOU Louise	G4	100 %	140504-140434-140462
NEDELEC Georges	G5	100 %	140452-140504
SOYEZ Claude	G4	100 %	140422-140410-140720-140504
TEISSIER Hinano	G3	100 %	140720
TETUMU Roger	G2	100 %	140432-140504
TIAPARI Jérôme	G4	100 %	140720
VANAA Vincent	G4	100 %	140432-140504
VONAU Vincent	G4	100 %	140442-140504

Nom et Prénom	Catégorie	Taux d'activité	Affectation par projet (nomenclature analytique)
<u>VAT</u>			
DORMOY Jean-Marc		100 %	140720
FAUCON Mizaël		100 %	140452-140504
FROISSARD Sébastien		100 %	140462-140504
VIGOUROUX Yves		100 %	140442-140504
MICHEL Emmanuelle		100 %	140452-140504
PARMENTIER Georges		100 %	140432-140504
ROULEAU Stanislas		100 %	140422-140410-140720-140504
ROUX Olivier		100 %	140442-140504
TOMASINO Gilles		100 %	140000-520050
TROIN Bernard		100 %	140802-140504
VILLAIN Jean-Patrick		100 %	140000-520050

Nom et Prénom	Catégorie	Durée	Affectation
<u>C.D.D.</u>			
CARRE Christophe	G4	1/04/95 au 30/04/95	140442-140504
LE GROUMELLE Marc	C1	2/01/95 au 31/12/95	140462
PECRESSE Sylvain	G4	1/04/95 au 17/06/95	140442-140504

1.2. Mouvements de personnel

Arrivées

- D. ANSQUER (R.A)
- G. LE MOULLAC (R.A)
- S. PECRESSE (CDD R.A)
- C. CARRE (CDD R.A)

Départs

- S. PECRESSE (CDD R.A)
- C. CARRE (CDD R.A)

V.A.T.

- S. FROISSARD (R.A)
- O. ROUX (R.A)
- J.M. DORMOY (R.A)
- Y. VIGOUROUX (R.A)
- G. PARMENTIER (R.A)
- S. ROULEAU (R.A)
- B. TROIN (R.A)
- J.P. VILLAIN (R.A)
- M. FAUCON (R.A)

- S. PECRESSE
- J.H. LIGNOT
- C. GOARANT
- C. CARRE
- S. POUVREAU
- G. TOMASINO
- C. JAMONEAU
- E. MICHEL

1.3. Stages

Stages étudiants

- HEYVANG Isabelle (USLBVE de Mont St Aignan) : 8/05 au 8/09/95
- MALANSKA Anne (IUT- Toulon) : 1/03 au 30/06/95
- MONGODIN Marie-Eve (IUT - Brest) : 17/04 au 18/08/95
- JABAUD Angélique (CNAM - Intechmer) : 17/04 au 27/08/95
- PECRESSE Sylvain (U.F.P.) : 18/06 au 15/08/95
- LORET Pascale (U.F.P.) : 6/02 au 1/07/95
- CHUNG Bélinda (U.F.P.) : 6/02 au 1/07/95
- FOLCO Sidonie (U.F.P.) : 6/02 au 1/07/95

Autres stagiaires

- 13 professeurs (Dir. Ens. Sec. - E.N.S.) : 12 et 13/10/95

Thésards

- MORELLI Myriam (U.F.P.) : jusqu'au 17/10/95
- PEETERS Luc (U.F.P.) : jusqu'au 31/12/95

2 - CREDITS AFFECTES AU LABORATOIRE

2.1. Fonctionnement (en FF)

	Hors 625	625	Total
Notification EPRD	1.159.000	267.000	1.426.000
Réservation	737.000	190.000	927.000
DM1	211.560	2.240	213.800
DM2	80.000	40.000	120.000
Crédits affectés	1.028.560	232.240	1.260.800

2.2. Investissement (en KFF)

	Infrastructure	Equipement	Incitation	Total
EPRD	50	310	100	460

3 - EQUIPEMENTS DU LABORATOIRE > 10 KF ACQUIS EN 1995

Programme	Nature des équipements	Coûts (FF)
140432	Balance	12.100
140434	Cuve azote liquide	27.000
140442	Compresseur	13.200
	Binoculaire Leica	35.200
140452	Micro-calorimètre	44.500
140462	Electrophorèse	26.300
	Agitateur	15.000
140504	Aérateurs	15.700
140720	Micro portable	20.000
	Micro bureau	13.000
	Micro-ordinateur	33.700
	Broyeur à bille	18.200

4 - AVIS A L'ADMINISTRATION

NEANT

5 - ASSISTANCE TECHNIQUE ET TRANSFERTS

5.1. F.A/COFREPECHE

Une mission d'expertise et d'ingénierie a été réalisée pour le compte de COFREPECHE/FRANCE AQUACULTURE au Mexique, sur le projet AQUANOVA, du 22 au 30 janvier 1995. Elle a porté sur la révision du dossier d'ingénierie détaillée de la ferme de grossissement de crevettes (500 ha) devant être réalisée en 1995, et faisait suite à la mission conduite en novembre 1994 sur l'ingénierie globale.

L'ensemble du génie civil a donc été revu pour la première phase de la ferme, c'est-à-dire pour 51 bassins de 10 hectares. Compte-tenu d'éléments nouveaux dans la topographie détaillée de certaines zones, la forme et la topographie des fonds de bassin, l'emplacement et les structures exactes des moines d'entrée et de sortie, l'implantation du canal général d'évacuation, en particulier ont dû être examinés de nouveau, de manière à réduire le coût des mouvements de terre nécessaires tout en préservant les options optimales de gestion de la ferme.

5.2. STD3 : Aquaculture-Environnement

Une mission (P. Garen) a été réalisée en Nouvelle-Calédonie du 7 au 14 Février 1995 : participation au suivi de terrain réalisé sur les fermes par J.L. Martin et O. Guélorget, dans le cadre de la coordination du programme Environnement Crevettes.

Une mission a été réalisée en France (P. Garen) du 14 au 30 Novembre 95, essentiellement au CREMA L'Houmeau, avec J.L. Martin, dans le but de faire le point sur les données acquises au cours des séries expérimentales de 1995, d'avancer leur traitement et de réviser le programme des expérimentations prévues en 1996. Une réunion de coordination du programme STD3 avait été également prévue avec les participants IFREMER à ce programme.

5.3. ENS-URM n°9

L'année 95 est la troisième année de l'URM n°9. Les objectifs de cette collaboration avec le laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés de l'Université Montpellier II sont l'évaluation de l'état physiologique des crevettes pénéides par l'analyse de la capacité osmorégulatrice. Le détail des travaux effectués dans ce cadre est développé dans le paragraphe « Ecophysiologie ».

5.4. Nouvelle-Calédonie : Syndrome 93

- Influence d'une vibriose sur la capacité osmorégulatrice (cf Ecophysiologie).
- Toxicité des boues de fond de bassin (cf Ecophysiologie).
- Diagnostic syndrome 93 (cf Ecologie bactérienne) :
 - Identification des nouvelles souches bactériennes isolées en Nouvelle Calédonie (souches NC95).
 - Virulence des souches NC95 par injection intramusculaire chez *Penaeus stylirostris*.
 - Suivi d'un pic de mortalité en collaboration avec la Station de St Vincent.
 - Comparaison de *Vibrio spp.* Nouméa avec une espèce pathogène identifiée : *Vibrio penaeicida*.
- Etude du *vibrio spp* (cf Ecologie bactérienne)

5.5. Aliments

- Production d'aliments par l'atelier nutrition du C.O.P. (voir tableau suivant)
 - aliment larvaire
 - aliment prégrossissement
 - aliment reproducteur
 - aliment maturation

Tableau des principales productions de l'atelier nutrition C.O.P. (1995)

Aliments		
Désignation	Affectation	Quantité (kg)
Fides	Poissons (géniteurs)	146
J1	Démarrage crevettes	100
PGN	Prégéniteurs crevettes	100
A2P	Croissance, peu polluant	3488
Prégéniteurs <i>P. stylirostris</i>	Bassins de géniteurs 30m3	300
<i>P. stylirostris</i>	Programme Génétique	350
MOCAL	Démarrage crevettes	700
ACAL	Larves crevettes, chevrettes	12
Pâton	Géniteurs Génétique	165
FUC	Croissance crevettes	1760
PGN Huilerie	Prégéniteurs crevettes	5536

5.6. Partenariat local avec l'Huilerie de Tahiti

Ce partenariat est très utile à l'extension des résultats de la recherche, notamment celles portant sur les aliments peu polluants. Les études de digestibilité mentionnées ci-dessus ont permis de sélectionner une nouvelle farine de poissons disponible sur le marché chilien et d'assurer ainsi des performances optimales aux crevettes des fermes du Territoire. Le critère retenu a été la haute digestibilité et celle-ci semble aller de pair avec une usine de bonne technicité notamment au niveau du séchage de la farine.

L'Huilerie de Tahiti représente un excellent banc d'essais en vraie grandeur pour des formules dont certaines applications pourront être faites en Nouvelle-Calédonie par exemple. Mais c'est aussi une opportunité pour des industriels français de tester de nouveaux produits, ainsi des protéagineux semblent apporter à la fois une valeur nutritive et des propriétés liantes non négligeables et des vérifications à l'échelon semi-industriels peuvent permettre ensuite d'aborder plus facilement les marchés asiatiques très porteurs.

Enfin, il est essentiel de maintenir une vigilance sur la préparation des aliments qui vont aux fermes du Territoire dont les rendements sont encore à la limite de la rentabilité et dont les survies notamment ne sont pas ce qu'elles devraient être. Il est par conséquent nécessaire de pouvoir apporter des améliorations chaque fois que cela est possible et fournir des opportunités chaque fois qu'elles se présentent pour tenir des survies meilleures ; l'une de ces opportunités est l'incorporation de substances immunostimulantes tout en gardant un prix de revient de l'aliment suffisamment bon marché (entre 115 et 125 FCP le Kg).

En ce qui concerne les actions sur les poissons marins (loup tropical), celles-ci, comme indiqué précédemment, ont stoppé dès la décision d'arrêt du programme en Polynésie et par conséquent, il ne reste que quelques opérations ponctuelles comme celles qui garantissent la fabrication d'un aliment de qualité pour les géniteurs en cage dans le lagon près du Centre et

pour les juvéniles de la ferme d'Aquapac ; maintien d'une veille sur la question (aspects nutritionnels et technologiques principalement).

6 - ACTIVITES DIVERSES

6.1. Enseignements dispensés

- Cours d'amélioration génétique à l'Université Française du Pacifique dans le cadre du DEA "Connaissance et Gestion des Milieux Coralliens et Lagonaires" (E. BEDIER).

- Cours de trois heures en D.E.A. CGMICLO à l'Université Française du Pacifique ayant pour thème l'utilisation des cultures cellulaires en microbiologie (M.LEGROUMELLE).

- Deux étudiants du DEA CGMICLO en stage

- Huit étudiants métropolitains en stage.

6.2. Visites de travail reçues

- Février 95 : J.M. AMOUROUX (CNRS Banyuls) : modélisation de l'ingestion chez la crevette.

- Avril 95 : J. PROU (CREMA L'HOUMEAU) : PGRN.

- Mai 95 : Y. NACIRI (IFREMER La Tremblade) : discussions sur le programme génétique (sélection).

6.3. Formation des personnels

- J. GOGUENHEIM : Cryobiologie (Maisons-Alfort)

- P. LEMAIRE : Radio protection à l'attention des « personnes compétentes » (Grenoble)

- C. SOYEZ : Physiologie respiratoire des crustacés (Arcachon)

- R. TETUMU : Géniteurs - Prégrossissement crevette (Nouvelle-Calédonie)

- J. TIAPARI : Analyses biochimiques (La Tremblade)

- M. LEHARTEL : Documentaliste (ORSTOM-Papeete)
- D. ANSQUER : Coupe et interprétation de lames histologiques de crevette (U.F.P.-Papeete)
- L. MOU et P. LEVY : Bactériologie (ITRMLM-Papeete)
- Groupe : Conduite de réunion (COP)
- Groupe : Expression orale (COP)
- Groupe : Access (FPS-Papeete)
- Groupe : Excel 5 (FPS-Papeete)
- Groupe : Recyclage plongeurs 2ème session (COP)

6.4. Missions en France, DOM-TOM et Etranger

Janvier

- G. CUZON et J. PATROIS : Participation au Congrès de la WAS à San Diego.

Février

- P. GAREN : Coordination du programme crevette-environnement entre CREMA L'HOUMEAU, S.A.S.V. et le C.O.P. en Nouvelle-Calédonie.
- C. GOARANT : Prise de contacts avec C. GALINIE et F. BERTH en vue de sa prochaine affectation en Nouvelle-Calédonie.
- J. PATROIS : Visite des installations d'Aquanova - Discussions sur suivi des géniteurs SPR43 et échanges de données.

Mars

- M. LE GROUMELLEC : Participation au Workshop de Brest.

Avril

- G. CUZON : Participation à la réunion du Groupe de Travail International sur la nutrition des crustacés à Kagoshima.
- J.L. MARTIN : Participation à la réunion des chefs de laboratoires du Département R.A et préparation du plan stratégique et des mandats de laboratoire à Nantes.

Juin

- J.L. MARTIN : Participation aux Comités de Programme et Direction R.A. à Nantes.

Juillet

- J.C. COCHARD : Participation à un jury de thèse dans le cadre de l'URM n°9 à Montpellier.

Novembre

- J.C. COCHARD : Mission de liaison de l'URM n°9 à Montpellier.
- J.C. COCHARD : Etude des effets de boues de fond de bassin sur l'osmorégulation de la crevette en Nouvelle-Calédonie.
- G. CUZON : Réunion projet STD au Créma l'Houmeau et réunion avec INVE à Lille.
- G. CUZON : Participation au jury de thèse de M. COUSIN à l'INA/PG et contacts avec l'Unité mixte IFREMER/INRA à Brest.
- P. GAREN : Coordination, état d'avancement du programme Aquaculture-Environnement des crevettes et programme STD3 à Nantes.

6.5. Visites diverses

Janvier

- M. JOSSE, journaliste au « Le Marin ».
- M. BARTHELEMY, journaliste de la « Tribune ».

Février

- Société CGEE, réseau de télésurveillance.
- Madame LEVINSON de Dimel Holdings Pty Ltd.

Mars

- MM FINIM et MARAGOS de l'IOS Center of Hawaii.
- M. Quito BRAUN ORTEGA, investisseur en Nouvelle-Calédonie.

Mai

- Elèves de l'école primaire de Raiatea.

Août

- M. D. CRAIG, entomologiste et le Professeur J. CONN, biologiste de l'Université Edmonton au Canada.

Novembre

- M. BOCCAS, Directeur de l'ORSTOM à Papeete.

Décembre

- M. BARAER du CIRAD et M. NOTTEGHEM, visiteur.

7 - PROGRAMMES SCIENTIFIQUES DE RECHERCHE

Rappel des objectifs du laboratoire

L'objectif du laboratoire est la constitution d'un pôle français de connaissances et de recherche finalisée en aquaculture tropicale afin de contribuer au développement de l'aquaculture dans les TOM et principalement pour la perliculture en Polynésie Française et la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie.

Au niveau international, le laboratoire contribue à la politique de coopération française et européenne en R/D pour les PED de la zone tropicale et intertropicale. Pour atteindre ces objectifs, le laboratoire poursuit ses travaux sur deux filières : huîtres perlières et crevettes.

Les études sur l'huître perlière ont essentiellement pour objet d'améliorer les connaissances sur la biologie de l'espèce afin de contribuer à une meilleure gestion des lagons producteurs de perles.

Les études sur la crevette ont été orientées selon deux thèmes :

- le thème Milieu vise à une meilleure connaissance du fonctionnement de l'écosystème bassin et des relations entre ses différentes composantes : hydrobiologie, état physiologique de la crevette, nutrition, pathologie.

- Le thème Génétique vise d'une part, à la production de souches transformées par manipulation sur l'oeuf et, d'autre part, à l'amélioration des souches par sélection.

Principaux faits marquants

L'année 1995 a vu s'achever la première phase du Programme Général de Recherche sur la Nacre en collaboration avec l'EVAAM, l'UFP, l'ORSTOM, l'EPHE.

La fin de l'année a été consacrée à la rédaction des rapports d'étude et à la préparation des programmes de recherche à mettre en oeuvre pour la deuxième phase (1996-1998) du P.G.R.N.

Pour les crevettes, l'année 1995 a encore été essentiellement marquée par les travaux sur le syndrome 93 (mortalités dans les élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie) en coopération avec le GIE/RA Nouvelle-Calédonie, le LTDV, l'Institut Pasteur, l'URPIG.

Les résultats des travaux de l'année 1995 sont présentés par programme, thème et action de recherche. Les résultats scientifiques présentés n'ont pu être obtenus que grâce à un travail zootechnique important, support indispensable à la poursuite des programmes.

PROGRAMME CREVETTES

THEME MILIEU

- MILIEU - EFFLUENTS**
- ECOPHYSIOLOGIE**
- ALIMENTS PEU POLLUANTS**
- ECOLOGIE BACTERIENNE**

Rappel des objectifs

L'objectif général du Programme Milieu Effluents Crevettes est de connaître et de comprendre le fonctionnement de l'écosystème bassin en élevage intensif. Il est fondé sur les actions suivantes :

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

Seules les deux premières actions devaient être abordées en 1995.

Travaux réalisés et Principaux résultats

Recherche de paramètres limite

L'analyse des données obtenues précédemment a été poursuivie. Les concentrations d'ammoniaque total (<4 à 5 ppm) restent durant tout l'élevage bien en dessous des seuils toxiques connus, quelque soit la charge instantanée. Si ces concentrations durent par contre fréquemment jusqu'à 20 à 40 jours, il est difficile de les mettre en relation avec des épisodes critiques de l'élevage (mortalité ou arrêts de croissance par exemple).

En revanche des pics de concentration de MES (seston total), jusqu'à 2000 mg.litre⁻¹ alors qu'elles sont <500 mg.litre⁻¹ pendant le reste de l'élevage, étaient jusqu'à présent systématiquement rencontrés durant la période des 30 à 60 premiers jours d'élevage.

Cette période est critique, car le contrôle des animaux est difficile, les morts ne se voient pas, le milieu est instable et la biomasse augmente rapidement. Ces pics sont directement liés à la quantité d'aliment entrant dans le système par rapport au volume d'eau renouvelé. Or, si ces pics se produisent tard dans l'élevage, s'ils se maintiennent plusieurs jours ou s'ils se renouvellent durant cette période critique, la survie globale des élevages est anormalement faible, que des épisodes de mortalité aient été constatés ou non. Il existe peut être donc un seuil « toxique » de MES, mais il n'y a pour le moment pas d'indication pour en déterminer la valeur.

Sur le plan pratique, les standards de renouvellement d'eau en fonction de la charge en élevage ont été corrigés.

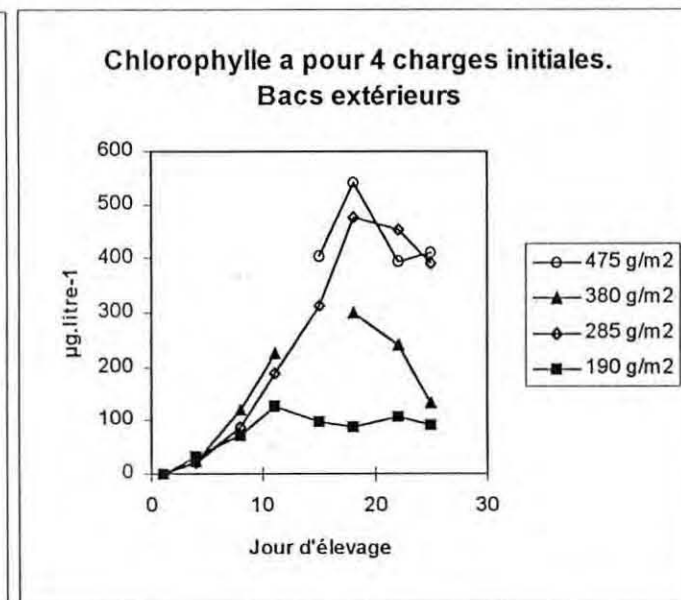
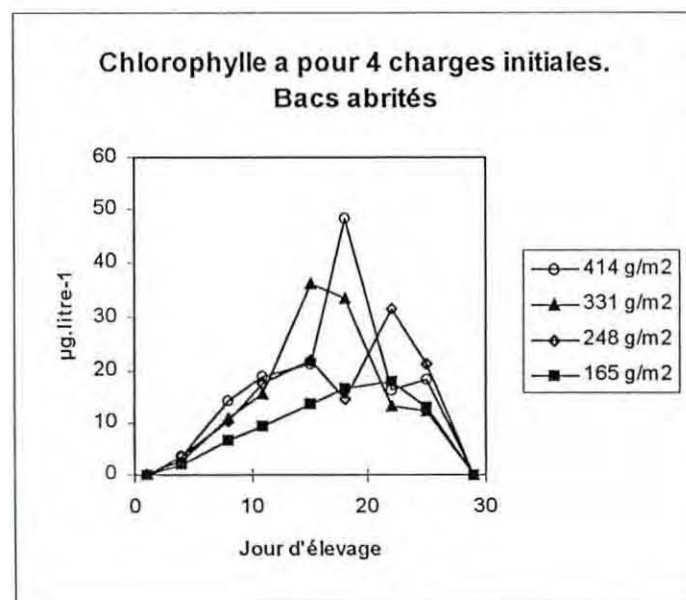
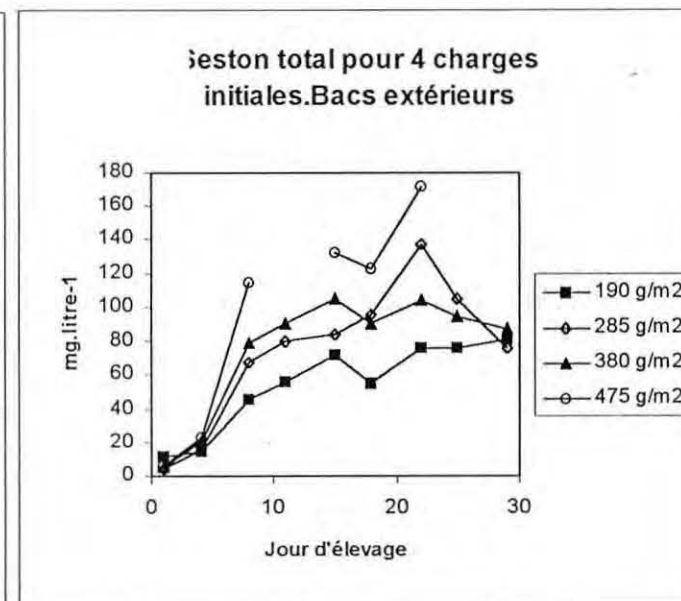
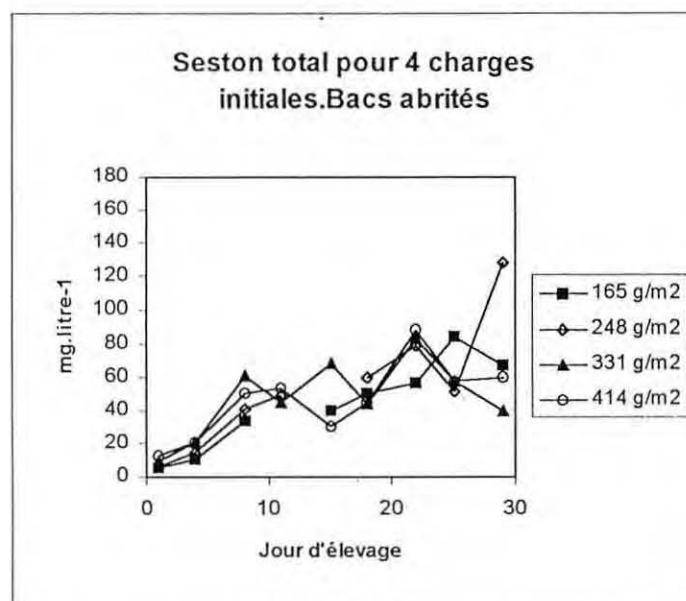
Effets de la charge en élevage et du développement phytoplanctonique

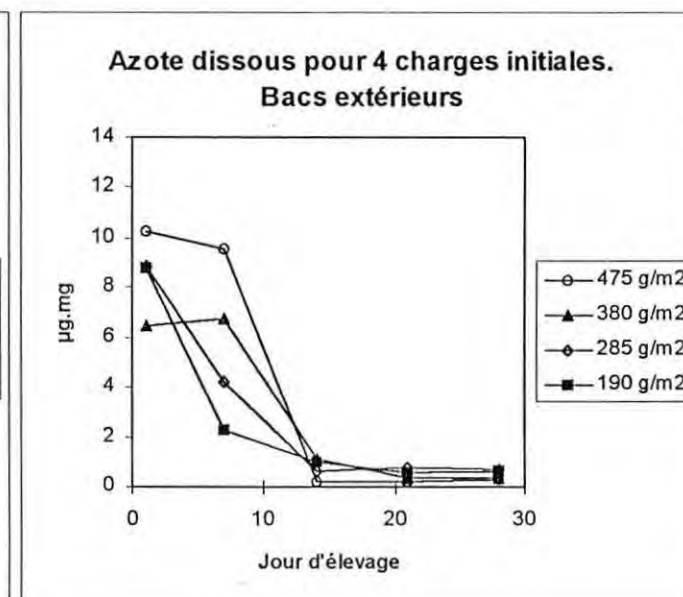
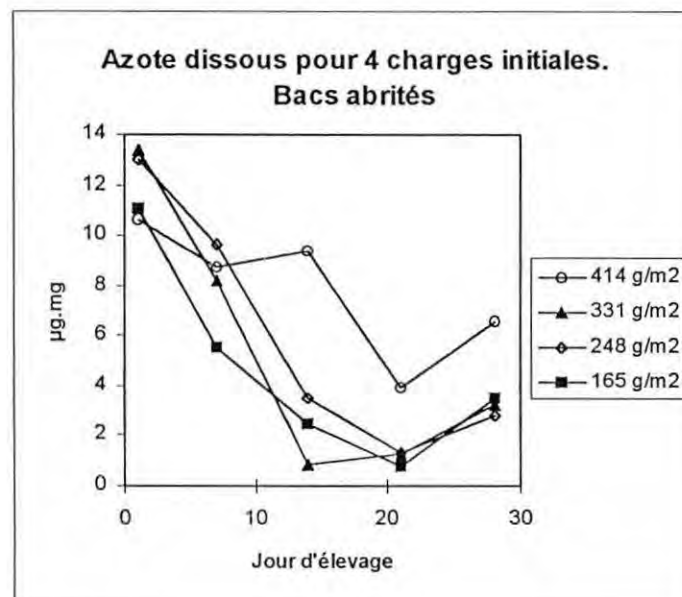
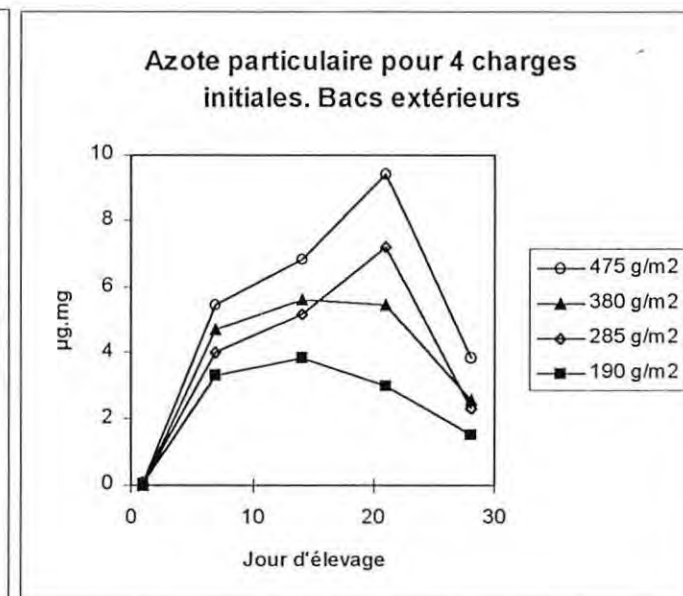
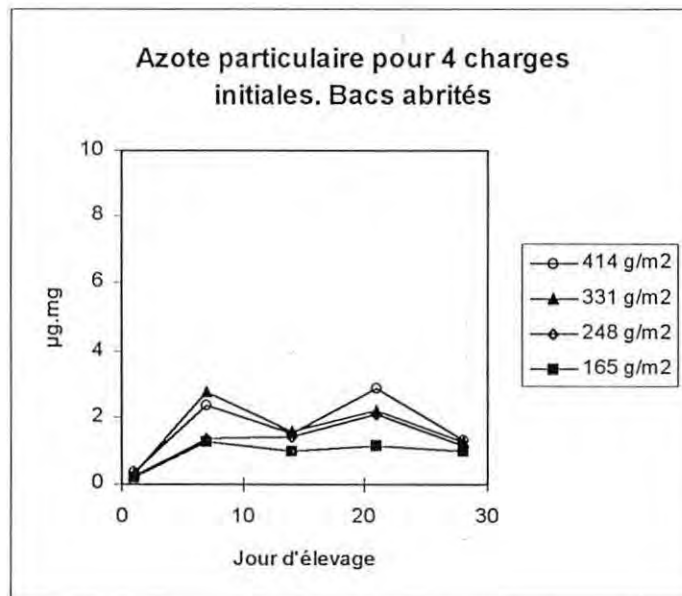
La quantité de matière transformable entrant dans le système (aliment essentiellement) dépend directement de la charge initiale, c'est à dire de l'intensification de l'élevage. Le phytoplancton est une des voies de transformation de cette matière entrante.

Huit élevages ont été réalisés en bacs de béton de 10 et 13 m³ avec des crevettes de 3.7 à 3.9 g de poids moyen et nourries sur un aliment commercial à 45% de protéines (FUC, Huilerie de Tahiti). Le renouvellement d'eau quotidien était de 25 à 35% sur tous les bacs et l'aération/ brassage assurée par 2 airlifts.

Tous les paramètres de l'eau étudiés présentent durant tout l'élevage des valeurs d'autant plus élevées que la charge initiale est forte, sauf exception due à un problème de renouvellement d'eau. Ces variations doivent être logiquement liées à la quantité d'aliment entrant dans le système, et apportant matière en suspension, carbone et azote. Elles se présentent de la même façon que le développement de phytoplancton soit limité (4 bacs abrités sous toiture) ou non (4 bacs extérieurs).

La différence entre les deux systèmes se trouve dans les concentrations mesurées de seston et de chlorophylle a qui sont plus faibles en bacs abrités, et dans la répartition entre azote particulaire et azote dissous.





Si le phytoplancton est limité, la quantité d'azote dissous utilisé est plus faible et la proportion azote dissous à azote particulaire est plus forte que dans les élevages où la limitation du phytoplancton n'est due qu'à l'apport d'azote. Le pourcentage d'organique dans le seston total est également plus faible en bacs abrités (moy. = 60,25 - s = 4,11), essentiellement dû au granulé peu dégradé; qu'en bacs extérieurs (moy. = 71,25 - s = 2,5) essentiellement dû au phytoplancton.

Croissance et survie ont été plus élevées en bacs extérieurs qu'en bacs abrités (0.189 à 0.224 et 0.094 à 0.113 g.j-1; 78 à 83% et 54 à 70% respectivement). La différence de croissance est-elle due uniquement à la différence de température observée (27.1 à 31.1 °C en extérieur et 25.7 à 27.5 °C en abrité) ou également à un complément nutritionnel (zooplancton, vitamines) rendu disponible par la production primaire. Des élevages seront menés début 96 pour tenter de répondre à cette question. La différence de mortalité est, quant à elle, difficile à expliquer, les valeurs d'azote ammoniacal mesurées étant en dessous des seuils de toxicité connus. Le pas d'échantillonnage n'a peut être pas permis de déceler certaines valeurs élevées.

En ce qui concerne les déchets produits, les résultats des élevages menés à terme avec une production significative de crevettes (c'est à dire des performances zootechniques, croissance, survie et indice de conversion, aux standards de la technique intensive) sont repris dans le tableau ci-dessous.

Table 1 : Quantité totale de déchets produits en fonction de la charge initiale
(Données 1994 et 1995)

Charge initiale g.m-2 (pds hum.)	Aliment total g.m-2	Taux conversion aliment (pds sec)	Crevettes produites g.m-2 (pds sec)	Déchets totaux g.m-2	Déchets totaux % aliment	dont exporté par eau %	dont exporté par boues %
<i>extérieur</i>							
190	302	1.5	66	236	78	47	53
285	475	1.7	94	381	80	65	35
380	628	1.9	107	521	83	74	26
475	734	2.1	118	616	84	63	37
<i>abrité</i>							
311	371	1.9	59	311	84	69	31
519	675	2.1	96	579	86	80	20
735	1113	1.7	205	908	82	90	10
1007	1423	2.1	191	1232	87	88	12

La production de déchets augmente bien avec l'intensification de l'élevage (charge plus élevée, quantité d'aliment plus grande) et reste quasiment constante en proportion à la quantité d'aliment introduite. La transformation de l'aliment en crevettes semble donc garder la même faible efficacité quelle que soit la charge. La répartition des déchets entre boues et eau d'évacuation ne semble pas varier en fonction de la charge, mais plutôt en fonction du système phytoplanctonique, l'exportation par l'eau étant beaucoup plus importante si le développement phytoplanctonique est limité.

Effets de la taille (poids) des crevette

Six élevages ont été réalisés avec des crevettes de 21.3 g de poids moyen et des charges initiales de 235 à 1065 g/m². Les résultats obtenus ne sont que fragmentaires, les conditions de température au moment de la conduite des élevages (refroidissement exceptionnel) faisant que la production de crevettes a été nulle. Aucun bilan n'est donc réalisable. Cependant le seston et l'azote dans l'eau ne semblent pas varier de manière différente - à charges égales - avec la taille des crevettes en élevage.

Effet de la qualité de l'aliment

Un essai d'aliment moins polluant a été réalisé, la digestibilité des protéines incorporées étant améliorée par rapport à l'aliment commercial. Cet aliment a été fabriqué par l'atelier de nutrition du COP.

Le bilan zootechnique permet de constater effectivement une production plus élevée de crevettes pour la même quantité d'aliment distribuée, donc une baisse de la quantité de déchets produits. Les bilans azotés, de seston et de chlorophylle n'ont pas encore été examinés. Cependant cette expérimentation a été faussée par le fait que l'aliment testé présentait un autre caractère différent : sa taille, 1,8 mm de diamètre au lieu des 3 mm de l'aliment commercial de comparaison. L'essai n'a pas été annulé, et l'expérimentation sera reprise en 1996 en tenant compte du facteur taille du granulé.

Toxicité des boues de fond de bassin

Cf. la partie Ecophysiologie Crustacés pour ce chapitre.

La minéralisation des boues permettrait effectivement de diminuer leur toxicité, mais il reste à déterminer quel(s) facteur(s) de ces boues peu(ven)t être toxique(s) et probablement éliminé par une minéralisation.. Il serait intéressant de vérifier si cette « toxicité » ne serait pas lié à leur caractère particulière (cf. supra, les fortes concentrations de MES dans un élevage).

Coopérations nationales et internationales

Deuxième année de la participation au programme STD Aquaculture Environnement avec le CRÉMA, la SASV, l'USTL, le BADC (Indonésie) et l'ION (Vietnam). La partie qui doit être traitée au COP concerne la caractérisation des effluents en élevage intensif de crevettes en fonction de la gestion des élevages (densité, aération, renouvellement d'eau), et s'inscrit donc parfaitement dans l'ensemble du programme Milieu et Effluents.

Problèmes rencontrés

La sonde multiparamètres (YSI 3800) acquise en novembre 1993, n'a toujours pas fonctionné correctement, après son retour de réparation. L'électrode ammonium d'une part, n'a jamais pu être utilisée, puis à partir du mois de mai, l'électrode oxygène a commencé à donner des valeurs aberrantes.

Rappel des objectifs

L'objectif général de l'unité d'écophysiologie est la mise au point d'une méthode d'évaluation de l'état physiologique des crevettes pénéides en élevage. Ce travail est mené en collaboration avec le Laboratoire d'Écophysiologie des Invertébrés (LEI) de l'Université Montpellier II dans le cadre de l'URM N°9, il est basé sur :

- l'étude de la capacité osmoréglatrice des crevettes pénéides, en particulier des mécanismes biochimiques, métaboliques et physiologiques concerné par son établissement et ses variations éventuelles ;

- la définition des conditions précises d'utilisation du test de la capacité osmoréglatrice comme outil d'évaluation de l'état physiologique des animaux en élevage, comportant une estimation du degré de généralisation possible tant au niveau de la diversité des espèces que des facteurs de stress.

Les effets des stress ou des polluants qui ont été étudiés sur *Penaeus stylirostris* et/ou *P. vannamei* au Laboratoire d'Aquaculture Tropicale sont l'hypoxie, l'ammonium, le fénitrothion, les manipulations. À ces derniers s'ajoutent le cadmium, le cuivre, le TBT, la turbidité, les toxines de *Fusarium oxysporum*, étudiés sur *P. japonicus* au LEI. Les travaux des trois précédentes années concernaient principalement l'identification de facteurs de l'environnement provoquant une modification significative de la capacité osmoréglatrice des crevettes. Nous avons ainsi pu constater que :

- la plupart des facteurs étudiés provoquaient une dépression de la capacité osmoréglatrice avant que les niveaux létaux soient atteints;
- de manière générale, la dépression est dose dépendante et réversible.

Nous avons en outre constaté que cette dépression peut, au moins dans le cas de l'hypoxie et d'une pollution ammoniacale, être détectée très rapidement (3 à 4 heures) sur des échantillons de moins de 10 individus. Ce test permettait donc de mesurer très rapidement les conséquences d'une perturbation de l'environnement, à la condition qu'un témoin soit disponible ou que les variations normales de la capacité osmoréglatrice soient connues et/ou maîtrisées.

Malgré l'abondance de résultats expérimentaux montrant que la capacité osmoréglatrice est significativement déprimée par un grand nombre de facteurs du milieu, l'intérêt de cette technique pour l'évaluation de l'état physiologique des crevettes en élevage paraissait limité par les variations nycthémerales de la CO. Les travaux engagés en 1994 sur ces variations ont été poursuivis en 1995.

Travaux réalisés - Principaux résultats

Variations normales de la capacité osmorégulatrice

Un des développements possibles des travaux réalisés sur l'hypoxie est une amélioration de la gestion de l'oxygène dans les bassins d'élevage. Cela suppose une réponse à plusieurs questions :

- La capacité osmorégulatrice des crevettes dans un bassin varie-t-elle de façon significative au cours du cycle journalier ?
- Dans l'affirmative ces variations sont-elles corrélées aux facteurs de l'environnement, notamment au taux d'oxygène dissous ?
- Ces informations pourront-elles être utilisées pour l'évaluation de l'état physiologique des crevettes dans des élevages commerciaux suite à une hypoxie ?

En 1994, les travaux réalisés ont permis de constater que la capacité osmorégulatrice varie significativement au cours du cycle journalier. Deux périodes de dépression ont été mises en évidence qui correspondent aux périodes de distribution de la nourriture. Leur durée est comparable à ce qui est connu des phénomènes de digestion chez les crevettes.

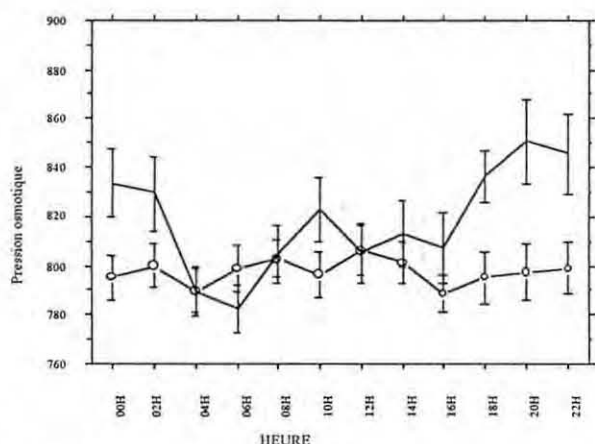


Figure 1 - Variations comparées de la pression osmotique de l'hémolymphe de crevettes maintenues à jeun (o) ou nourries. Données cumulées sur 48 et 72 heures, respectivement. La PO ne varie pas significativement ($p=0,234$) lorsque les crevettes sont maintenues à jeun

En eau dessalée, l'alimentation se traduit aussi par une augmentation de la pression osmotique de l'hémolymphe. En termes de capacité osmorégulatrice, il s'agit ici d'une augmentation de la CO au lieu d'une dépression. Il est donc très vraisemblable que les nutriments apportés dans l'hémolymphe jouent un rôle majeur dans ces variations.

Chez les animaux maintenus à jeun la capacité osmorégulatrice est constante lorsque les paramètres de l'environnement sont normaux. En cas de stress hypoxique, la balance de l'ensemble des ions est modifiée, l'augmentation de la pression osmotique est due à l'augmentation de la concentration du sodium et du chlore. Il est possible de conclure que, dans le cas de l'alimentation des crevettes, les produits de la digestion (estimés par la mesure de la

glycémie) sont responsables des variations de la CO.

Les travaux sur le terrain ont été poursuivis et développés. Ils démontrent que lorsque les crevettes sont maintenues à jeun la pression osmotique de leur hémolymphe reste statistiquement constante (Figure 1).

Les données acquises au cours de ces deux dernières années permettent de conclure que, sous réserve que les mesures soient effectuées au début de la journée, l'évaluation de la capacité osmorégulatrice varie de façon prévisible en fonction de la salinité du bassin, du stade de mue et de la taille des individus. Un écart à la normale dénote une perturbation physiologique. Les connaissances acquises permettent de réduire considérablement la variance

du phénomène étudié et donc augmenteront dans les mêmes proportions la puissance de ce test. Elles devraient, à terme, permettre son utilisation pratique dans les fermes de production.

Fénitrothion

L'étude de l'incidence du fénitrothion sur la physiologie de *P. vannamei* et *P. stylirostris* a été réalisée par J.H.Lignot pendant son séjour à Tahiti comme V.A.T.. Deux aspects principaux ont été étudiés : la toxicité aiguë du fénitrothion et ses effets sur la CO. Ce dernier point a été analysé en relation avec l'inhibition de l'acétylcholine estérase, l'enzyme spécifiquement inhibée par les insecticide organophosphorés.

Toxicité aiguë sur *P. stylirostris*

L'étude de la toxicité aiguë sur les stades larvaires a montré chez les deux espèces une diminution de la résistance au cours du développement jusqu'au stade Mysis3, *P. vannamei* apparaît bien plus résistante que *P. stylirostris*.

La tendance des CL50 des juvéniles de 8,6 à 20 grammes apparaît être une augmentation de la CL50 avec la taille des animaux (voir tableaux 1 et 2. La tendance vers l'augmentation de la résistance des animaux avec la taille et l'âge est réellement sensible par exemple entre les lots d'animaux de poids éloignés (8,6 et 20 grammes par exemple).

Milieux expérimentaux	Poids moyen (g)	LC50 24h (en µg/l)	Intervalle de confiance (95%)	LC50 48h (en µg/l)	Intervalle de confiance (95%)
Eau de mer	8,6	11,16	7,82-15,43	10,52	7,33-14,58
	15	17,65	12,72-24,85	16,34	11,07-25,62
	20	18,95	13,01-28,38	---	---
550 mosmol/kg	15g	14,75	8,8-26,46	---	---
300 mosmol/kg	10g	19,23	12,46-30,77	14,59	9,2-23,63

Tableau 1 : CL50 à 24 et 48 heures et intervalles de confiance à 95% en fonction des poids moyens des animaux et des salinités des milieux.

Temps d'exposition (h)	Poids moyen (g)	
	8,6	15
CL50 24h	11,16	18,95
Intervalle de conf. (95%)	7,82-15,43	12,72-24,85
CL50 48h	10,52	16,34
Intervalle de conf. (95%)	7,33-14,58	11,07-25,62
CL50 72h	10,56	12,73
Intervalle de conf. (95%)	7,37-14,92	8,69-18,93
CL50 96h	8,92	10,99
Intervalle de conf. (95%)	5,99-13,15	7,54-15,81

Tableau 2 : CL50 à 24, 48, 72 et 96 heures en fonction du poids moyen de *P. stylirostris*.

La faible différence entre les CL50 à 24 et 48h démontre le rapide effet toxique du fénitrothion. Les animaux meurent dès les premières heures d'exposition au produit. Des CL50 établies au-delà des 48 heures (72 heures et 96 heures) (voir tableau 2) démontrent que cette tendance n'est pas fonction d'une éventuelle "disparition" du fénitrothion par évaporation ou imprégnation au niveau des parois plastiques par exemple. En effet, les mortalités n'ont pas augmenté massivement après les changements de milieu à 48h.

L'augmentation de la toxicité du fénitrothion (ou la baisse de résistance des animaux) en fonction de l'âge déjà observée chez *P. japonicus* à partir des post-larves PL 7 avec les CL50 à 96h (Lignot, données non publiées) est donc similaire chez *P. stylirostris* au moins chez les juvéniles.

Toxicité aiguë sur *P. vannamei*

Les valeurs obtenues pour les juvéniles sont résumés dans le tableau 3. Contrairement à ce qui avait été constaté chez *P. stylirostris* les CL50 24 et 48 heures apparaissent élevées et tendent à augmenter au cours de la croissance des juvéniles. Une diminution de la toxicité du fénitrothion apparaît ainsi au cours de la croissance des animaux juvéniles de cette espèce.

Poids moyen (g)	CL50 24h (µg/l)	Intervalle de confiance 95%	CL50 48h (µg/l)	Intervalle de confiance 95%
7	19,45	13,8-27,43	19,22	12,68-30,19
9	19,21	10,35-33,29	-	-
12,4	30,09	20,3-45,97	28,69	20,16-42,03
14,4	28,54	18,32-45,67	-	-
18	41,5	23,36-76,64	-	-

Tableau 3 : CL50 24 et 48h et intervalles de confiance chez *P. vannamei*

Les valeurs des CL50 des *P. vannamei* juvéniles apparaissent bien plus élevées que celles déterminées pour *P. stylirostris*. Le fénitrothion semble donc affecter de façon plus prononcée *P. stylirostris* plutôt que *P. vannamei*.

Effet du fénitrothion sur la Capacité osmoréglatrice

L'ensemble des variations de la CO des deux espèces étudiées en fonction de la dose de fénitrothion se trouve résumé dans la figure 2.

P. stylirostris montre une décroissance linéaire de la CO avec la dose. La chute est de 23% aux premières doses comprises dans l'intervalle de confiance de la CL50 24h. La dépression est statistiquement significative par rapport aux CO des témoins dès 6µg/l.

Pour *P. vannamei*, aucune chute n'apparaît aux doses sublétales. La CO des lots contaminés reste équivalente à celles des témoins. La chute de la CO n'apparaît qu'à la dose létale : 25 µg/l. A cette concentration, la baisse est de 28% par rapport aux témoins.

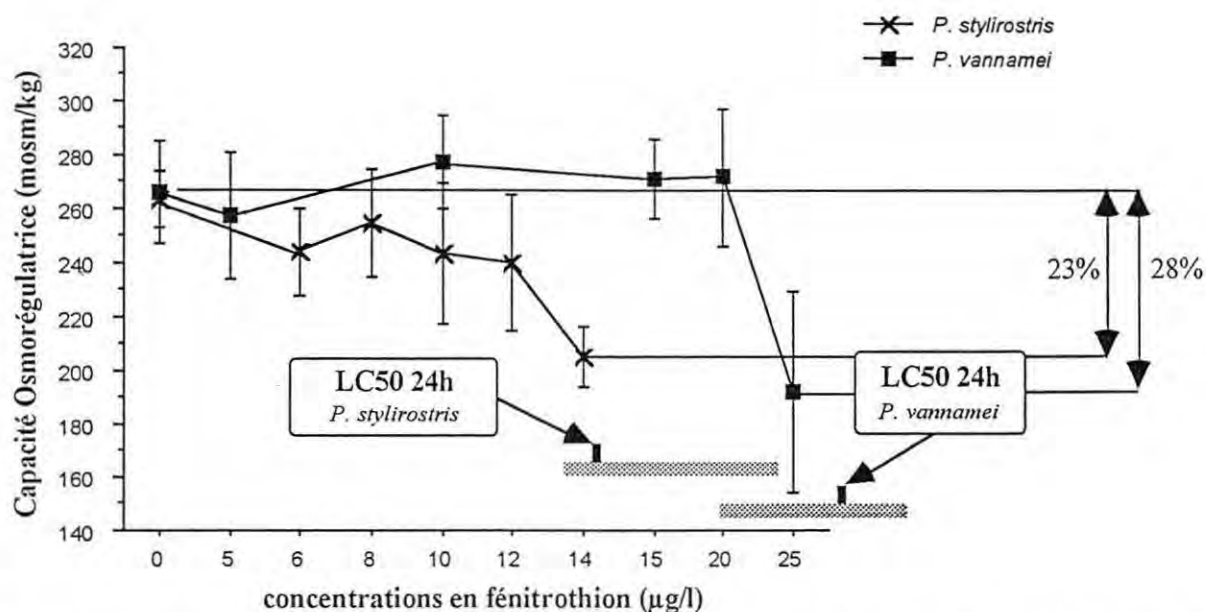


Figure 2 - *P. stylirostris* et *P. vannamei*: Effet du fénitrothion après 24 heures d'intoxication. Barre verticale: CL50. Bande grisée horizontale: intervalle de confiance à 95% de la CL50. Pourcentages: chutes maximales des CO entre les lots témoins et les lots contaminés.

P. stylirostris apparaît moins résistante que *P. vannamei* au fénitrothion, ceci est confirmé par l'analyse de la CO qui est très affectée chez cette espèce à des doses faibles. Une expérience conduite avec les deux espèces mélangées confirme cette conclusion (Figure 3).

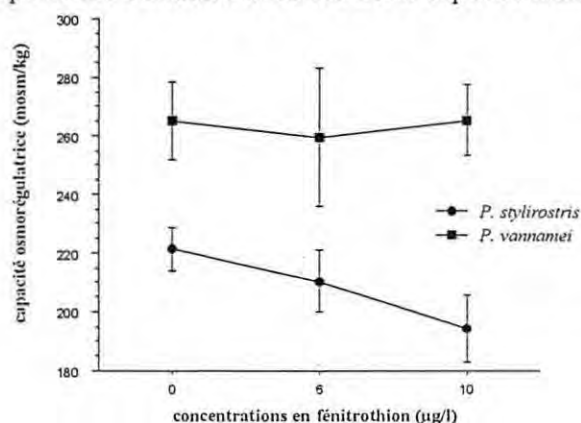


Figure 3 - *P. stylirostris* et *P. vannamei* : Effet du fénitrothion sur la CO après 24 heures d'intoxication à des doses létales et sublétales.

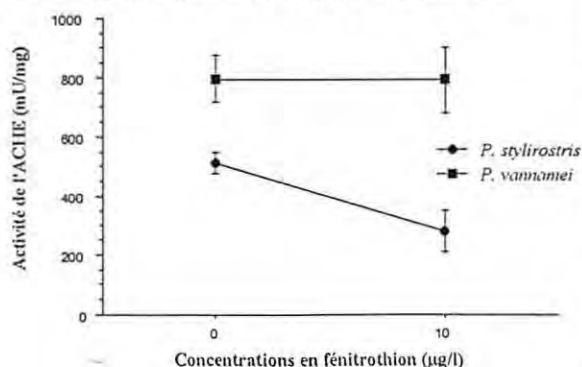


Figure 4 - Activité de l'ACHE après 24 heures d'intoxication chez *P. vannamei* et *P. stylirostris*.

Les mêmes observations ont été faites sur l'acétylcholine estérase : dans les mêmes conditions les individus de *P. stylirostris* présentent une forte diminution de leur AChE qui n'est pas observée chez *P. vannamei*.

L'ensemble des résultats présentés montre qu'à une concentration donnée en fénitrothion, *P. stylirostris* et *P. vannamei* réagissent différemment quant à leur résistance (taux de mortalité), leur capacité osmorégulatrice et leur activité cholinestérasique (taux d'activité enzymatique). Ces résultats indiquent donc que toutes les pénéides ne répondent pas de façon uniforme face à une intoxication due à un insecticide organophosphoré. Il a été démontré chez *P. japonicus* que l'effet toxique du fénitrothion est dû à l'oxydation du fénitrothion en fénitro-oxon; le fénitro-oxon est la forme toxique du produit (Kobayashi et al, 1991). Cette oxydation (S-oxydation) est l'oxydation due à la phase I du mécanisme de détoxication. Le fait que *P. vannamei* ne réagisse qu'à des

concentrations élevées en fénitrothion par rapport à *P.stylirostris* et *P. japonicus*, peut être dû à une mise en oeuvre tardive ou différente des mécanismes de détoxication.

Ces résultats confirment enfin l'intérêt de la mesure de la CO comme indicateur de stress, la CO varie significativement aux doses sublétales chez les espèces sensibles mais elle reste stable chez l'animal dont la physiologie n'est pas affectée puisque l'acétylcholine estérase n'est pas inhibée.

Influence des boues de fond de bassin sur la capacité osmoréglatrice

La capacité osmoréglatrice d'animaux soumis à l'accumulation des déchets en élevages intensif et semi-intensif, l'accumulation des vases organiques paraît être directement responsable de mortalités dans les élevages, aucun mécanisme d'intoxication n'a à ce jour été décrit. L'étude expérimentale visant à évaluer la toxicité de ces boues a été engagée suivant deux approches complémentaires : l'approche écotoxicologique classique et une évaluation des modifications de la capacité osmoréglatrice visant à détecter un état de stress provoqué par les boues.

L'approche écotoxicologique a permis de mettre en évidence l'importance considérable de l'oxydation de ces boues qui permet d'en réduire la toxicité. L'étude des effets produits sur la CO a nécessité la mise au point d'un protocole expérimental permettant le maintien des crevettes à proximité immédiate des sédiments et d'analyser leur réaction physiologique. À cet effet les crevettes ont été placées dans des cages grillagées à différents endroits de bacs expérimentaux ou de bassins d'élevage.

Le confinement des crevettes pendant 24 à 48 heures s'est révélé sans conséquences significatives sur l'état physiologique des animaux lorsque les cages étaient placées à distance du fond mais dans des conditions d'éclairement non stressantes. La pression osmotique de l'hémolymphe de ces animaux ne différait pas de celle des animaux pouvant évoluer librement dans le bassin expérimental.

Lorsque les cages étaient placées en présence de boues provenant d'un bassin d'élevage intensif une baisse de la capacité osmoréglatrice des crevettes a été observée. Des mesures de l'oxygène dissous et de l'azote ammoniacal ont été réalisées afin de vérifier que ces facteurs n'étaient pas stressants par eux mêmes.

Des expériences menées in-situ dans des bassins en terre ont été effectuées afin de déterminer si la localisation des crevettes dans un bassin avait une influence sur leur état physiologique. Les résultats obtenus démontrent l'influence de ces boues sur la physiologie des crevettes. Cette influence peut d'abord se faire sentir verticalement dans le bassin. Les crevettes qui sont maintenues à l'interface eau-boue, présentent une dépression significative de la CO par rapport à celles situées à mi-hauteur ou à la surface du bassin.

Des différences ont également été observées sur le plan horizontal. Des différences significatives ont été mises en évidence selon l'emplacement des cages dans le bassin. Les crevettes qui se trouvaient à proximité de l'évacuation, présentaient des signes de stress plus intenses que les autres crevettes. C'est dans cette zone que s'accumulent des déchets organiques au point le plus bas du bassin. Ces vases apparaissent réduites contrairement à celles qui se trouvent plus près des bords du bassin. Les crevettes placées au fond remettent en

suspension cette boue en libérant les substances réduites labiles. Il peut être admis que ce sont ces dernières qui provoquent un stress chez les crevettes.

La technique développée au cours de cette étude permet de caractériser les variations locales de qualité du fond. L'analyse des modifications de la CO pourrait donc permettre de caractériser et de suivre l'évolution qualitative du fond au cours du développement et prévenir ainsi le déclenchement des mortalités directes par intoxication ou indirectes par affaiblissement des animaux.

Influence d'une vibriose sur la capacité osmoréglatrice

Ces travaux ont été menés dans le cadre des recherches effectuées sur les mortalités qui se produisent depuis 1993 dans les élevages de Nouvelle Calédonie. Celles-ci apparaissent de façon chronique ou sous forme de pics souvent associés aux mues ou à des variations de facteurs environnementaux, notamment les variations de salinité et de température. En particulier pour la température, il est apparu que les mortalités survenaient le plus souvent suite à une baisse brutale de température pendant la saison froide. Il semblait donc, si les agents pathogènes isolés jouent un rôle important dans le syndrome, que leur virulence soit influencée par ces facteurs environnementaux (déplacement dans l'équilibre hôte-pathogène en faveur de ce dernier).

D'autre part, l'analyse histologique et bactériologique des pics de mortalité a montré une corrélation entre la baisse de température et l'apparition d'une septicémie à vibrions. Sur cette constatation, deux hypothèses ont été :

- la baisse de température déclenche un stress physiologique chez l'animal, affaiblissant ses mécanismes de défense et permettant, de ce fait, aux bactéries opportunistes de se développer.
- la baisse de température accentue la virulence des vibrions ce qui provoque les mortalités.

L'étude des variations de la capacité osmoréglatrice (CO) a été engagée dans le cadre d'infections expérimentales afin de déterminer si cet outil permet de mettre en évidence un état de stress consécutif à une baisse brutale de la température. Aucune modification significative de la CO n'a été provoquée chez des animaux sains par la seule baisse de température, en revanche chez les animaux infectés un effondrement de la capacité osmoréglatrice a été observé dans les heures précédant l'apparition des mortalités.

La figure 5 illustre l'évolution de la pression osmotique de crevettes infectées par une dose létale de la souche AM23 : 12 heures après l'injection la pression osmotique a augmenté significativement, cette augmentation se poursuit jusqu'à l'apparition des premières mortalités, à ce moment certains individus sont pratiquement isotoniques au milieu.

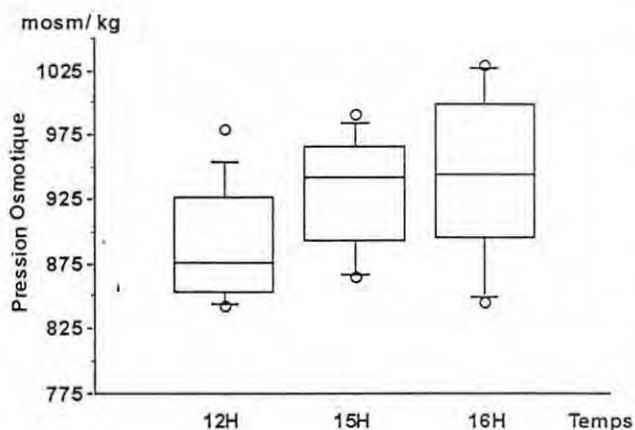


Figure 5 - Évolution de la pression osmotique d'un lot de crevettes infectées par injection de la souche AM23. Les mortalités se sont produites 21h après l'injection.

La comparaison de l'effet de différentes souches bactériennes injectées à la même dose est présentée dans la figure 6. Seule l'AM23 provoque une augmentation significative de la pression osmotique des crevettes. Cette variation passe par un maximum à 18 heures, l'échantillon de 22 heures est biaisé par l'apparition des mortalités. L'évolution des crevettes infectées à dose sub létale par la souche Z1 isolée des élevages de Nouvelle Calédonie ne diffère pas des témoins qui ont reçu une dose de milieu de culture stérile, il en va de même pour la souche non pathogène W11. La baisse des pressions osmotiques constatée dans ces trois lots correspond à la récupération du stress de la manipulation.

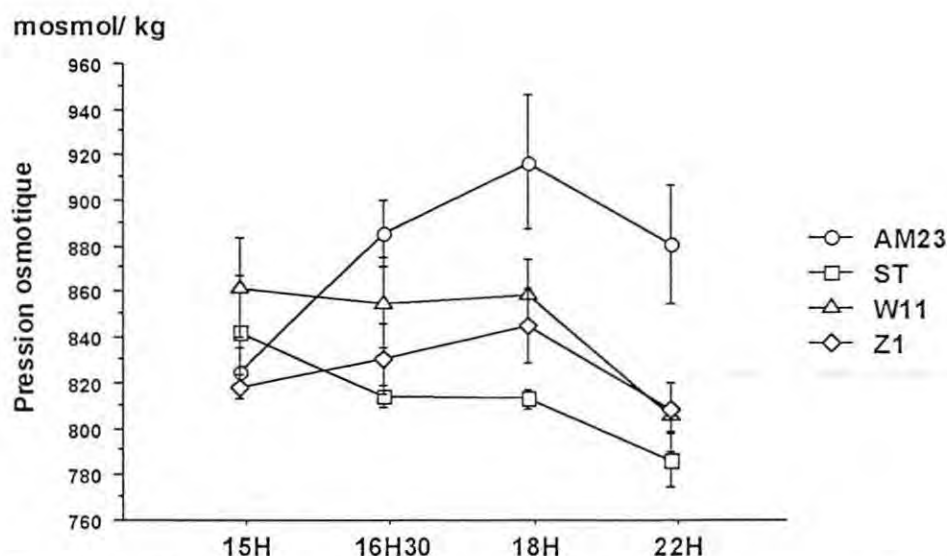
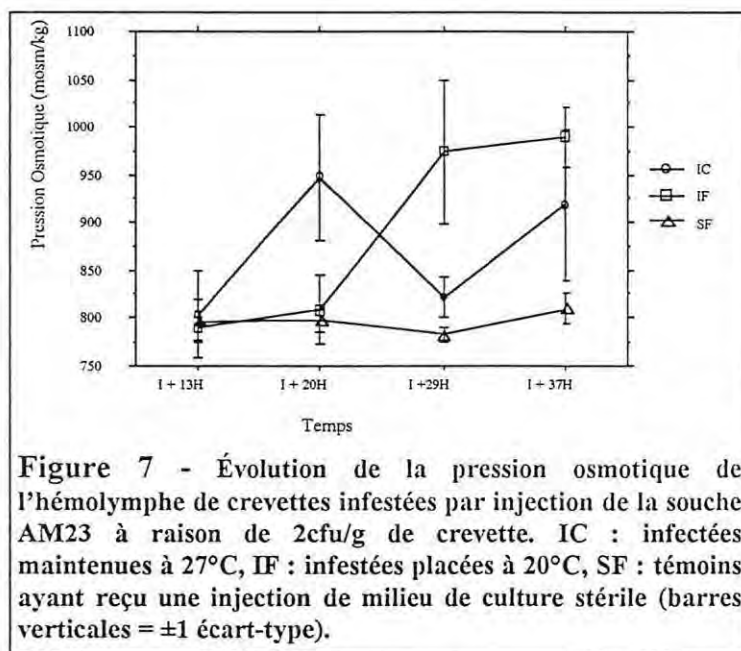


Figure 6 - Évolution de la pression osmotique au cours du temps après l'injection à 0H de différentes souches bactériennes, AM23 souche virulente, Z1 souche opportuniste, W11 non pathogène, ST témoins ayant reçu une injection de milieu de culture stérile (barres verticale = ± 1 écart-type).

L'effet conjugué d'un choc thermique et d'une injection à faible dose (2cfu/g de crevette) avait pour objectif de vérifier l'hypothèse du rôle majeur d'une baisse des températures dans le déclenchement des mortalités de Nouvelle Calédonie. Il est apparu que loin d'augmenter la virulence apparente de la souche AM23, la baisse des températures retarde l'apparition des mortalités, l'évolution des pressions osmotique permet de suivre le développement de l'infection (Figure 7). Dans les lots maintenus à 27°C la capacité osmorégulatrice s'effondre près de 10 heures avant les lots placés à 20°C. La pression osmotique de leur hémolymphe était maximale en moyenne 20 heures après l'injection alors que se produisaient les premières mortalités, la population présentait à ce moment deux modes le premier était composé de crevettes ayant une PO normale, le second d'animaux ayant une PO proche de celle du milieu. La pression osmotique paraît revenir à la normale à 27 heures, cette amélioration apparente vient du fait que seuls les individus encore vivants ont été prélevés. Au dernier prélèvement seuls trois individus survivaient. Le schéma d'évolution des animaux placés à 20°C est similaire mais se produit avec un retard de plusieurs heures.



La capacité osmorégulatrice permet donc de détecter et d'analyser l'évolution de la maladie chez les crevettes artificiellement infectée et de distinguer les individus restant apparemment en bonne santé.

Génétique

Au cours de cette année une réflexion a été engagée avec l'équipe de génétique sur l'identification de critères physiologiques de sélection des crevettes. Une première série d'expériences préliminaires a été engagée sur la réaction à l'hypoxie et aux manipulations. La Capacité Osmorégulatrice a été choisie comme critère discriminant. Quatre populations ont été comparées : des crevettes issues de parents élevés à Tahiti, des crevettes issues de parents provenant de Nouvelle Calédonie, des crevettes issues des deux croisements possibles.

Des différences significatives ont été constatées entre les capacités osmorégulatrices des différentes populations de crevettes soumises pendant 24h à une concentration d'oxygène de 2mg/l. Sous réserve que ces résultats préliminaires soient confirmés et qu'un lien soit établi entre les caractéristiques de la dépression de la capacité osmorégulatrice (durée et/ou intensité) et des différences de résistance au stress subi, ces résultats permettent de penser que la CO pourrait être utilisée comme critère de sélection dans le cadre du programme d'amélioration génétique des crevettes d'élevage.

Application en Nouvelle Calédonie

Les travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de la Station d'Aquaculture de Saint Vincent au cours d'une mission de deux semaines effectuée en Novembre. Les objectifs initiaux de cette mission étaient l'utilisation de la capacité osmorégulatrice comme moyen d'évaluation de la dégradation des fonds de bassins au cours de l'élevage.

Une première expérience a été mise en oeuvre, calquée sur les protocoles utilisés au COP pour l'évaluation in situ de la toxicité des boues. Elle avait pour objectifs de qualifier le matériel utilisé (poches ostréicoles préformées) et de mesurer la variabilité spatiale des effets des boues sur la capacité osmorégulatrice de lots de 20 crevettes maintenues en cage en 10 points différents d'un bassin. Le stress occasionné par la mise en place trop brutale des cages contenant les crevettes a été responsable de mortalités allant jusqu'à 80 % des individus. Les mesures effectuées 20 heures après la manipulation ont révélé chez les moribonds un effondrement de la capacité osmorégulatrice similaire à celui qui avait été observé lors des infections expérimentales par la souche AM23. Une souche présentant les mêmes caractéristiques biochimiques était présente en très grande concentration dans l'hémolymphe des 4 crevettes moribondes sur lesquelles un prélèvement a été réalisé. Le stress de la mise en place de l'expérience paraît avoir provoqué le déclenchement de la maladie dite "Syndrome 93", celui-ci ne semble cependant pas s'être propagé à l'ensemble du bassin.

La seconde expérience, réalisée en prenant des précautions plus importantes pour limiter le stress initial a permis de confirmer que la zone où les boues s'accumulent provoque une dépression de la CO plus importante que la zone où le fond reste oxydé. Ce critère paraît donc pouvoir être utilisé pour évaluer l'état des fonds de bassin d'élevage et permettre ainsi à l'éleveur de limiter par des mesures zootechniques appropriées le stress provoqué par la dégradation de l'environnement.

Rappel des objectifs

Ce rapport prend un reflet particulier car il clôture un plan à 4 ans : 1992 à 1995, dans lequel certaines options avaient été envisagées et des engagements pris. C'est donc l'occasion dans le même temps de faire un bilan rapide de cette période en indiquant les réalisations majeures (démarrage du programme sur les aliments peu polluants) et en indiquant pourquoi certains projets n'ont pu être menés à terme (par exemple les travaux d'extension des aliments pour le loup tropical, thèse et appui aux projets Martinique et PVD, propositions de contrats divers).

Ce rapport comportera les points forts suivants :

- 1) étude de la consommation d'O₂ mesure de la production de chaleur.
- 2) étude sur aliments peu polluants, rapport protéines-énergie (thèse de Marc Cousin).
- 3) étude de l'ingestion à l'aide de marqueurs, coopération CNRS/Banyuls (J.M. Amouroux).
- 4) étude de digestibilité, farines poissons et glucides, coopération STD Mexique et IFOMA.
- 5) étude des premiers aliments peu polluants semi-industriels. Coopération Huilerie de Tahiti.

Travaux réalisés - Principaux résultats

Etude de la consommation d'oxygène, excrétion azotée

Toute l'énergie qui entre dans un organisme par ingestion doit en fin de compte être utilisée dans des processus métaboliques, perdue en déchets par l'excrétion et les fèces ou synthétisée dans de nouveaux tissus (gain énergétique).

La nourriture consommée C est utilisée de la façon suivante :

$$C = (Mr + Ma + SDA) + (F + U) + (Gs + Gr)$$

 métabolisme déchets croissance

Dans l'étude de la partition de l'énergie, on considère l'énergie ingérée (IE) qui se décline en un certain nombre de termes comme la production de chaleur (HE). Celle-ci sera mesurée par calorimétrie indirecte avec la détermination de la production de CO₂ et la consommation d'oxygène en utilisant l'équivalent thermique de l'oxygène basé sur le quotient respiratoire (RQ) et des considérations théoriques.

Le métabolisme de base est atteint assez rapidement chez la crevette puisque des animaux placés à jeun pendant 24 heures ont atteint le seuil correspondant à ce métabolisme de base avec une consommation d'oxygène réduite à 0.2 ml O₂ /g poids frais/heure. A ce stade, le quotient respiratoire devient équivalent au catabolisme des lipides qui est proche de 0.7.

Extra-chaleur (HIE ou SDA) : c'est la chaleur produite à la suite d'une prise de nourriture. Elle correspond aux dépenses énergétiques des processus de la digestion et à l'anabolisme. On la mesure assez aisément chez la crevette grâce à un dispositif de mesure en continu de la consommation d'oxygène sur une période de 24 heures et dans un respiromètre où sont maintenues 5 à 6 crevettes. Cette étude a fait l'objet d'un DEA de l'Université Française du Pacifique avec Mlle B.Chung (Juin, 1995).

Les aliments bien équilibrés produisent un minimum de perte de chaleur, tandis que les régimes mal équilibrés, en particulier ceux déficients ou contenant un large excès de protéines, induisent un gachis d'énergie en perte de chaleur. Cette perte de chaleur qui intervient après l'ingestion de l'aliment est connue comme étant l'effet dynamique spécifique de la nourriture (SDA ou EDS ou HIE).

La base de la bioénergétique définie par les deux lois de la thermodynamique et appliquée à l'animal entier est établie en termes suivants :

$$IE = FE + GE + UE + ZE + SE + HE + RE \quad (1)$$

Cette simple identité (1) répartit l'énergie consommée :

par une crevette en composants majeurs associés à l'énergétique de l'animal. Toutes les techniques (calorimétrie, mesure du N-NH₃, production de CO₂,...) et les systèmes utilisés pour décrire la relation entre le besoin énergétique de l'animal et la capacité d'un ingrédient de fournir cette énergie sont reliés par cette identité. L'intervalle de base de chaque terme est de 24 heures.

Actuellement les termes de l'identité commencent à être connus, en particulier, la mesure de l'énergie digestible, la détermination de la consommation d'oxygène pour avoir accès à l'extra-chaleur et la mesure de l'excrétion azotée (terme UE + ZE). L'analyse des carcasses commence à être effectuée systématiquement afin de préciser le terme RE. Pour le terme IE, un certain nombre de mesures sur les ingrédients et les aliments grâce au semi-micro calorimètre PARR conduiront à établir l'égalité ci-dessus en considérant l'énergétique de l'animal (1).

L'établissement de cette identité est le préliminaire à la construction d'abaques. Ces abaques devront réaliser l'adéquation entre les besoins d'une part, et le modèle prédictif de croissance/survie d'autre part, plutôt que de prédire la croissance à partir des données de rationnement (cours CSAAD/96). C'est un peu le but ultime de la démarche sur le thème des aliments dits polluants.

Les études menées en petits bacs de 70 litres sont indicatrices des besoins dans des conditions de métabolisme (R) où l'activité est réduite (on a donc $R = R_r + a + SDA$). Le métabolisme dépendant de l'activité ($R_r + a$) est réduit à sa plus simple expression. Il en va tout autrement en conditions de bassins où l'expression $R_r + a$ prend une importance plus grande. Les crevettes se déplacent en bancs en suivant les bords du bassin, en fin d'après-midi ou bien lorsque l'apport alimentaire est insuffisant. Il conviendra donc de modifier les termes de l'équation :

$$C = R + F + U + dB/Bdt$$

Le terme R est plus important du fait de l'activité (non mesurée d'un point de vue énergétique pour le moment) et il augmente le besoin quotidien en énergie métabolisable. Cette énergie devra être calculée pour une crevette qu'on assimile à un animal maigre en raison de la composition corporelle qui fait apparaître 16-17% de protéines pour 3% de lipides. Le coût énergétique pour les synthèses (accrétion de protéines et de lipides) par analogie avec les poissons et sur la base d'un calcul théorique serait de 2,4 kcal. Ces approches devront être vérifiées expérimentalement.

Rapport de thèse 95 sur les aliments peu polluants

Le thème majeur de l'unité a fait l'objet d'une thèse IFREMER/INRA et les points suivants ont été abordés :

- étude de la digestibilité des amidons de différentes origines, cuits ou crus ;
- étude de la glycémie postprandiale ;
- étude du rapport protéines/énergie et ses conséquences sur la croissance avec essai de modélisation.

Il en ressort les conclusions suivantes :

* les amidons natifs sont bien digérés et utilisés de façon comparable à celle des amidons pré-gélatinisés. L'accès des enzymes digestives à l'amidon selon sa structure physique est probable. L'amylase attaque l'amylopectine plus directement que l'amylose en raison de l'accès aux liaisons alpha 1-4.

* l'hyperglycémie postprandiale est surprenante et la quantité de glucose dans l'hémolymphe (jusqu'à 1,5g/l) interpelle le biochimiste et conduit à s'interroger sur le rôle de certaines enzymes du métabolisme intermédiaire tels que l'hexokinase bien que possédant un Km faible ou la glucokinase avec un Km bien supérieur et donc susceptible de réagir plus rapidement à une quantité de substrat. De telles investigations seront entreprises dans le cadre de l'URM 14 avec A. Van Wormhoudt.

* **les crevettes pénéides doivent pouvoir être élevées avec moins de protéines alimentaires** dans la mesure où les amidons jouent un rôle d'épargne, ce rôle d'épargne est caractérisé dans une plage de 25 à 38 % de protéines digestibles ; il reste cependant à explorer, notamment avec l'espèce *P. vannamei* comment les amidons natifs peuvent permettre de réduire plus encore l'apport protéique tout en maintenant la couverture en acides aminés essentiels, le corollaire étant bien évidemment une réduction des rejets azotés sous forme d'ammoniaque.

* **l'ingéré** comme dans toute étude de ce type reste le point faible et une source d'erreur en raison du comportement des animaux vers la nourriture mais ce thème fait l'objet d'une approche particulière dans le cadre du programme et en collaboration avec le CNRS.

Coopérations nationales

Etude de l'ingestion à l'aide de marqueurs radio-actifs

L'année 1995 aura été l'occasion d'une nouvelle campagne de tests avec la mission de JM Amouroux et la collaboration du LESE de Mahina avec M. Trésinzi.

Une démarche expérimentale a consisté à cultiver des algues unicellulaires avec du CO₂ radioactif et à faire filtrer ces algues par des moules. La chair de moules lyophilisée a servi de base à l'élaboration d'un régime de base pour les études d'ingestion et de production de CO₂ marqué. Une énorme amélioration par rapport à la campagne 94 aura été l'absence de lessivage du carbone marqué une fois le granulé plongé dans l'eau. La précision de l'expérience en a été considérablement renforcée. Les temps d'ingestion ont pu être calculés avec précision, et avec un granulé extrudé qui reprend une texture souple très rapidement, l'ingestion peut se faire en quelques secondes (entre quelques secondes et quelques minutes) et dans la plupart des cas on assiste à une ingestion totale d'un granulé prépesé, ce qui donne accès à l'ingéré d'un point de vue quantitatif (environ 8mg en un repas).

Pour les temps de transit de la nourriture marquée, là encore des données intéressantes sont obtenues avec des vitesses d'apparition de fèces de l'ordre de 30 à 45 minutes. Comme chez les poissons, la vitesse d'évacuation gastrique semble suivre une loi exponentielle et cela explique la possibilité d'alimenter cette espèce quasiment en continu (jusqu'à 24 distributions par jour en mode d'élevage intensif (Aquacop, 1988). Enfin, la cinétique de production du CO₂ donne une indication sur le catabolisme des protéines de la chair de moules et la radioactivité retrouvée dans la carcasse indique la quantité assimilée (plus de 90%). On pourrait déduire des valeurs de turn-over des protéines digestibles, mais la méthodologie mise en oeuvre ouvre surtout des perspectives vers la détermination quantitative du besoin en acides aminés essentiels (Nato project). En outre, les coefficients de transfert entre la crevette, le dissous, le CO₂ et les fèces permettent, à l'aide du calculateur analogique STELLA I Think, de modéliser ces transferts et d'approcher ainsi les relations entre l'animal et son milieu. Toutes les mesures ont été effectuées à une température sous-optimale, de l'ordre de 22 degrés alors qu'en conditions d'élevage les crevettes sont maintenues entre 27-30 degrés C. Il reste donc à préciser le modèle. Cette étude devrait faire l'objet d'une publication dans le Journal of Marine Biology.

Coopérations internationales

Etude de la digestibilité et de l'influence de la rancidité sur la qualité des farines de poissons. Définition de critères de qualité

C'est la poursuite du programme STD/Mexique avec, en point de mire, deux publications : l'une sur la digestibilité des farines de poissons afin de sélectionner les meilleures qualités dans la perspective de l'élaboration d'aliments peu polluants ; l'autre sur l'état des lipides de la farine au travers de test de rancidité (travaux de la partie mexicaine). La rancidité est à prendre en compte lors des formulations d'aliments car il y a réduction de l'énergie digestible de la farine dont il faut tenir compte. En outre sur l'aspect protéines, I. Pike, l'autre partenaire du projet, a déjà effectué un travail considérable sur les aminés biogènes, résultat de la dégradation bactérienne des protéines avant la transformation du poisson en farine.

Au COP, la progression des travaux sur la digestibilité a été significative grâce d'une part, au système de collecte mis en place mais, d'autre part, à la sélection de matériel (semi-micro calorimètre PARR) permettant de limiter la quantité de fèces nécessaire aux analyses.

Le bilan des travaux sera fait en 96 lors d'une réunion prévue dans le cadre du projet à Arlington (Texas) avec étude des possibilités d'extension du projet sur deux années supplémentaires en associant de nouveaux partenaires.

L'année 1995 aura, enfin, été marquée par un certain nombre de propositions de contrat d'étude à des industriels en relation avec les programmes développés. Si les propositions ont été bien perçues dans l'ensemble, que ce soit auprès de Tetrawerk, Rovithai, Lesaffre, Solvay-Duphar, Eurotec, Microfeast ou INVE, aucune concrétisation n'a pu être obtenue. Dans quelques cas, il s'agissait avant tout d'un montant des prestations trop élevé, en comparaison avec ce que proposent les philippins par exemple. C'est une réflexion qui doit être menée en 96 pour améliorer la pertinence scientifique et surtout financière de nos études. En matière d'aliments peu polluants, il est fondé de bons espoirs avec la société belge INVE avec laquelle des contacts ont pu être noués à l'occasion d'une mission en Métropole.

Il se dégage, au-delà du rapport annuel 95, un ensemble cohérent d'actions et une densité de résultats qui n'ont pu être obtenus que grâce à une équipe soudée et des coopérations multiples ainsi que de nombreux échanges au travers des missions développées dans le cadre de programmes internationaux. Cette période marque enfin le recentrage du programme nutrition qui devient plus orienté vers la mise au point des aliments dits peu polluants et vers l'approfondissement de la physiologie nutritionnelle de la crevette.

Rappel des objectifs

L'Unité Pathologie assure deux fonctions distinctes au Centre Océanologique du Pacifique. La première est une activité de soutien (diagnostic et contrôle sanitaire) et la seconde est une activité de recherche. Les objectifs de l'année 1995 sont rappelés pour ces deux fonctions.

ACTION SOUTIEN

Aide au diagnostic du Syndrome 93

- Identification des nouvelles souches bactériennes isolées en Nouvelle Calédonie (souches NC95).
- Virulence des souches NC95 par injection intramusculaire chez *Penaeus stylirostris*.
- Suivi d'un pic de mortalité en collaboration avec la Station de St Vincent.
- Comparaison de *Vibrio spp.* Nouméa avec une espèce pathogène identifiée : *Vibrio penaeicida*.

Etat sanitaire des géniteurs du COP et de l'Ecloserie Territoriale

- Dépistage du virus IHHN avec des sondes nucléiques utilisées en Dot Blot.
- Examen histologique.

ACTION RECHERCHE

Etude du *Vibrio spp* Nouméa

- Courbe de croissance.
- Préférences thermiques.
- Résistance des bactéries dans l'eau de mer.
- Facteurs d'adhésion.

Mise au point des infections expérimentales

- Mise en fonctionnement de la salle d'infection expérimentale.
- Infection expérimentale par voie intramusculaire : recherche d'une dose létale 50.
- Infection expérimentale par cannibalisme.
- Infection expérimentale par voie anale.

Etude des mécanismes de défense et de résistance de *Penaeus stylirostris*

- Mise au point des premiers outils marqueurs de l'état immunitaire.
- Variation de la capacité de défense en fonction du cycle d'intermue.
- Stimulation des défenses cellulaires.

Travaux réalisés et principaux résultats de l'action Soutien

Aide au diagnostic du Syndrôme 93

1) Identification des nouvelles souches bactériennes isolées en Nouvelle Calédonie en 1995

Au mois de juin, le COP a reçu du LTDV, 14 souches présélectionnées et identifiées selon le code "1042" sur galerie API 10E et isolées dans cinq fermes calédoniennes (Sodacal : SO, Seafarm : SF, FAO : F, Aquamon : AQ, Aquamer : AM). Trois souches (SO27, AM100 et SO65) n'ont pas poussé lors des repiquages. Les profils biochimiques sont homogènes et identiques à celui de la souche AM23. L'appartenance de ces souches à une même espèce est confirmée par les biotypage et ribotypage effectués à l'IPP. Le ribotypage montre, parmi les isoléments NC95, un sous-groupe de quatre souches qui se distingue du groupe AM23. Trois de ces souches sont précisément celles qui n'ont pas repoussé au COP. Les souches isolées en mai 1995 sont de la famille des Vibrionacées mais l'espèce reste non identifiée. En attendant son rapprochement par hybridation ADN/ADN avec une espèce connue et, pour plus de clarté, ces souches ont été provisoirement nommées *Vibrio spp.*Nouméa. La présence systématique de ce vibrio dans les bassins de Nouvelle-Calédonie au cours de pics de mortalité renforce la piste bactériologique.

2) Virulence des souches NC95 par injection intramusculaire chez *Penaeus stylirostris*

La virulence des bactéries a été évaluée par injection intramusculaire. Quatre souches de *Vibrio spp.*Nouméa ont été sélectionnées parmi les onze disponibles au COP. Les souches ont été choisies en fonction de leur provenance, quatre fermes aquacoles ont été représentées : Seafarm (SF143), Aquamer (AM101), FAO (F1), Aquamon (AQ112). Les souches de la ferme Sodacal n'étaient pas disponibles, leur pouvoir pathogène n'a pas été testé. Toutes les souches testées ont montré un pouvoir pathogène élevé pour *Penaeus stylirostris*. L'homogénéité des souches, mise en évidence par les techniques d'identification, est confirmée par ce résultat. Les signes cliniques observés au cours de l'infection expérimentale ont été identiques à ceux décrits dans les fermes calédoniennes. L'histologie a révélé la présence importante de vibrios dans l'hémolymphe de toutes les crevettes mourantes. Encapsulation hémocytaire et phagocytose sont des réactions communes aux animaux infectés naturellement et expérimentalement. La phagocytose des vibrios a parfois donné des images proches des corpuscules basophiles cités dans les lésions du Syndrôme 93. Mais, la nécrose importante des organes a gêné la mise en évidence de ces lésions. Les lésions expérimentales sont issues d'un processus infectieux aigu (observation sur 36h). Les corpuscules basophiles pourraient être le résultat d'une réaction inflammatoire plus lente avec condensation des vésicules de phagocytose. Ces résultats ont permis de considérer *Vibrio spp.*Nouméa comme un des agents étiologiques du Syndrome 93.

La reconnaissance de *Vibrio spp.*Nouméa comme agent étiologique du Syndrome 93 n'exclut pas l'existence d'autres agents infectieux et de facteurs environnementaux favorisant l'expression du pouvoir pathogène de cette bactérie. Cependant, les pertes économiques que subissent les producteurs rappellent la nécessité de proposer dans un délai raisonnable, des solutions efficaces au Syndrome 93. Au regard de ces résultats et malgré les incertitudes qui peuvent subsister sur la multiplicité des agents étiologiques, l'Unité pathologie a annoncé sa volonté d'orienter les recherches vers la pathogénie du *Vibrio spp.*Nouméa et les méthodes de lutte à partir du dernier trimestre 95.

3) Suivi d'un pic de mortalité en collaboration avec la Station de St Vincent

Un suivi bactériologique et histologique, des crevettes du bassin 10 de la Station de St Vincent était prévu pendant la saison froide 1995 (de mai à octobre). L'objectif de cette expérimentation était de mettre en lumière, l'évolution de la bactériémie et des lésions histologiques chez les crevettes, avant, pendant et après un pic de mortalité. Le bassin a étéensemencé avec retard et aucun épisode de mortalité n'a été observé pendant ce suivi.

Suivi bactériologique

Sur les 600 souches reçues, un tiers n'a pas repoussé et les deux tiers restants ont été congelés à -80°C. Les souches dont la densité était supérieure à 50 cfu/goutte d'hémolymph ont été identifiées (23 caractères biochimiques répartis sur deux microplaques). Sur 150 souches identifiées, le profil de *Vibrio spp.* Nouméa n'a pas été retrouvé. Ce résultat confirme la spécificité de la méthode d'identification et montre l'absence de *Vibrio spp.* Nouméa dans l'hémolymph des crevettes en dehors des pics de mortalité. Parmi les caractères biochimiques discriminants, il faut noter les tests ADH-LDC-ODC négatifs, le lactose positif à 48h et une croissance faible dans un milieu à 6% de NaCl. Les résultats sont enregistrés dans le programme informatique *Bactus*.

Deux souches, isolées de crevettes moribondes et ayant un profil biochimique proche de *Vibrio spp.* Nouméa, ont fait l'objet d'une infection expérimentale par injection intramusculaire. La dose testée, 100 bactéries par crevette, n'a provoqué aucune mortalité.

Suivi histologique

Environ 300 échantillons histologiques ont été coulés en bloc de paraffine mais compte tenu de l'absence de mortalité importante dans le bassin, le montage sur lame microscopique et la coloration ont été différés.

4) Comparaison de *Vibrio spp.* Nouméa avec une espèce pathogène identifiée : *Vibrio penaeicida*

Le profil biochimique particulier et la virulence élevée de *Vibrio spp.* Nouméa ont facilité la recherche bibliographique d'une espèce proche. Depuis 1982, plusieurs équipes de chercheurs japonais ont montré la prévalence élevée d'un vibrio chez *Penaeus japonicus*. Le profil biochimique et la virulence de ce vibrio sont comparables aux résultats obtenus avec les souches calédoniennes (cf tableau N°1). Ce vibrio, provisoirement nommé *Vibrio spp.* PJ a récemment été identifié comme une espèce nouvelle : *Vibrio penaeicida* sp. nov (Ishimaru et al., 1995). Les souches de référence KH-1 et KA-13 ainsi qu'un échantillon d'anticorps anti KA-13 ont été obtenus auprès du Dr Muroga (Université d'Hiroshima). Les tests d'agglutination sur lame se sont révélés négatifs. De même, les tests d'amplification par PCR développés au COP (Y. Vigouroux, 11/95) n'ont pas permis de confirmer l'existence d'un lien de parenté entre *Vibrio spp.* Nouméa et *Vibrio penaeicida*. Des hybridations ADN/ADN seront nécessaires avant de poser une conclusion. Ce travail a été programmé début 1996, en collaboration avec l'Unité des Entérobactéries de l'IPP.

	<i>Vibrio sp.</i> Takahashi et al. (1985)	<i>Vibrio sp.</i> PJ de la PEÑA et al. (1993)	<i>Vibrio sp.</i> Nouméa cop data (1995)	<i>Vibrio penaeicida</i> Ishimaru et al. (1995)	Srain KH-1 ^T Ishimaru et al. (1995)
Gram stain	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+
Swarming	-	-	-	-	-
Oxydase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Hugh Leifson's	fermentative	fermentative	fermentative	fermentative	fermentative
Gas from glucose	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+ ~ 50%	-
Citrate	+	+ ~ 52%	±	-	-
ONPG	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Gelatinase	+	+	+	+	+
Sensitivity to O/129	+	+	+	-	-
Growth with					
0% NaCl	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	±	+
6% NaCl	-	-	±	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-
Acid from (n days)			2 days	7 days	7 days
Arabinose	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Lactose	+	- ~ 61%	+	+ ~ 50%	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	-	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+
Melibiose	±	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Utilization as a sole carbon source (n days)			4 days (Pasteur data)	7 days	7 days
γ aminobutyrate	-	-	-	+ ~ 33%	-
D-cellobiose	-	-	+	+	+
Citrate	-	-	+ ~ 28%	+ ~ 67%	+
D-gluconate	+	-	+	+ ~ 83%	+
D-glucuronate	-	-	-	-	-
DL-malate	+	-	+	+	+
D-mannitol	+	-	+	+ ~ 83%	+
Propionate	-	-	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-
Lactate	+	-	+	-	-
Succinate	+	-	+	-	-
Malonate	-	-	+	-	-

Tableau N°1 : Comparaison du profil biochimique de *Vibrio spp.* Nouméa avec une espèce identifiée et reconnue pathogène pour *Penaeus japonicus* : *Vibrio penaeicida* sp. nov. (Ishimaru et al., 1995).

Etat sanitaire des géniteurs du COP

1) Dépistage du virus IHHN avec des sondes nucléiques utilisées en Dot Blot

La détection systématique de l'IHHNV à l'aide du Dot Blot Kit confirme chez les crevettes du COP originaires de Nouvelle-Calédonie (introduction récente) une prévalence de plus de 90 %, ce qui est conforme aux résultats obtenus par le LTDV sur place. Cette prévalence semble être plus faible voire nulle dans certains autres lots de *Penaeus stylirostris* présents sur le COP. L'implication de ce portage viral, ainsi que la présence du Taura syndrome sur les mortalités observées en Nouvelle-Calédonie reste encore à déterminer.

2) Examen histologique

Une analyse histologique a précédé et accompagné l'introduction de *Penaeus indicus* et de la SPR 43 de Tahiti vers la Nouvelle Calédonie. Sur les lots ayant servi à produire les larves envoyées, aucune pathologie clairement identifiée n'a pu être mise en évidence, et notamment le tableau clinique et lésionnel complet du Syndrome 93 semble à ce jour absent des lots de pénéidés présent sur le COP. Cependant, quelques lésions de type "spheroids" sont observables dans l'organe lymphoïde de quelques géniteurs de *P. stylirostris*, sans toutefois être comparables à l'importance des lésions observées sur les crevettes néo-calédoniennes.

Travaux réalisés et principaux résultats de l'action Recherche

Etude du *Vibrio* spp. Nouméa

1) Courbe de croissance

Deux cultures de la souche AM23, maintenues à 23°C et 30°C en bouillon Zobell ont été suivies pendant 32h. Les nombres d'unité formant une colonie (CFU/ml) ont été déterminés avec un pas de deux heures jusqu'à 16h. La densité maximale de la culture est de 2.10^8 cfu/ml (cf figure N°1). La phase de plateau est atteinte en 8h et 12h pour les températures respectives de 30°C et 23°C. La fréquence de génération maximale ($2.5h^{-1}$) est observée entre 4 et 8h. Aucune phase de déclin n'a été observée jusqu'à 32h.

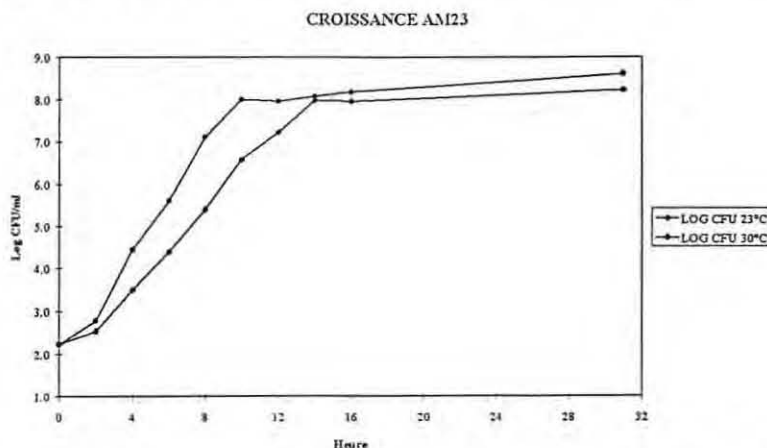


Figure N°1 : Courbe de croissance de *Vibrio* spp. Nouméa, souche AM23 à 23°C et 30°C

2) Préférences thermiques

La souche AM101 a été mise en culture dans 8 erlenmeyers contenant 100ml de bouillon Zobell. Les cultures menées en dupliquats ont été placées à 20°C, 25°C, 30°C et

35°C. La croissance des bactéries a été déterminée en fonction du nombre de CFU/ml à 6, 12, 24 et 48h. A 35°C, la croissance est nulle. Pour les autres températures, les résultats sont en accord avec la courbe de croissance établie avec la souche AM23. Le plateau est atteint à une densité proche de 10^8 CFU/ml quelque soit la température (*cf figure N°2*). Les températures optimales de croissance sont comprises entre 25 et 30°C. Cependant, à ces températures, la phase de déclin est observée à 48h. L'intensité de cette phase est proportionnelle à la température. Pour les infections expérimentales, la température optimale de la culture de l'inoculum a été fixée à 25°C. L'inoculum est utilisé lorsque la culture entre dans la phase de plateau soit une culture âgée de 12 à 14h. Cette méthode permet d'obtenir une culture de qualité et de densité constantes.

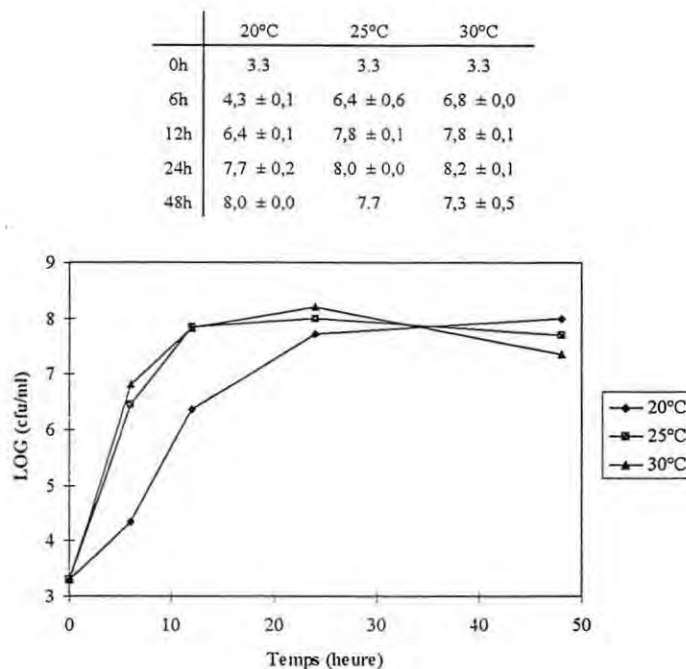


Figure N°2 : Croissance de *Vibrio spp.* Nouméa souche AM101 en fonction de la température

3) Résistance de la souche AM101 en eau de mer

Le culot de centrifugation d'une culture de *Vibrio spp.* Nouméa souche AM101 a été remis en suspension dans de l'eau de Lewis stérile. La densité initiale était de 2.10^8 CFU/ml. La suspension est conservée à 22°C et un contrôle de la densité est effectué chaque mois. La forme et la mobilité des vibrions sont modifiées dès le premier mois. Pendant la phase de croissance, *Vibrio spp.* Nouméa présente les caractères classiques des vibrions (bâtonnet incurvé, extrémités arrondies, mobilité élevée). Dans la phase de plateau et en suspension dans l'eau de mer, les bactéries deviennent sphériques et peu mobile. La forme coccoïde est aussi appelée sphérobaste. Elle correspond sans doute à une forme de résistance qui apparaît dans des conditions peu favorables à la croissance. La courbe montre une baisse de la densité de un logarithme le premier mois, puis un logarithme pour les deux mois suivants et une tendance à la stabilisation entre le troisième et le quatrième mois (*cf figure N°3*). La survie de *Vibrio spp.* Nouméa en eau de mer est donc très bonne. Les conséquences épidémiologiques de cette observation sur la transmission horizontale indirecte ne seront pas négligeables. Pour l'usage du laboratoire, la mise en suspension dans l'eau de mer devient une technique de conservation plus intéressante que la conservation sur gélose Zobell à 4°C.

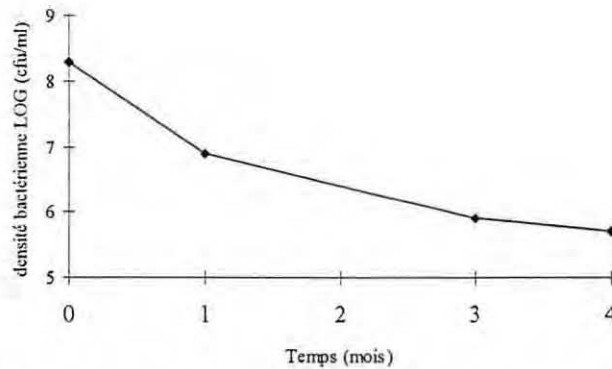


Figure N°3 : Survie de *Vibrio spp.* Nouméa souche AM101 en eau de mer à 22°C

4) Facteurs de virulence de *Vibrio spp.* Nouméa

En collaboration avec l'équipe de Biologie Moléculaire de l'UFP, des expérimentations ont été menées sur les facteurs d'adhésion de *Vibrio spp.* Nouméa. Les résultats montrent une adhésion spécifique de ce vibrio sur les cultures cellulaires de crevettes pénéides.

Infections expérimentales avec *Vibrio spp.* Nouméa chez *Penaeus stylirostris*

1) Salle d'infection expérimentale

La salle d'infection expérimentale a été mise en fonctionnement en septembre 1995. Vingt bacs de 300 litres sont disponibles pour le développement de vibrioses expérimentales. Toutes les conditions de sécurité ont été clairement définies. Le protocole d'utilisation paraîtra dans un rapport technique en 1996.

2) Recherche d'une dose létale 50 par injection intramusculaire

La détermination d'une DL50 est indispensable pour mesurer les effets d'un traitement face à une vibriose. Deux duplicats de 10 crevettes (poids moyen 12.5g) ont été infectés par injection intramusculaire d'une suspension de la souche AM101 avec respectivement 1 et 80 cfu/g. Les témoins ont reçu une injection d'eau de mer stérile. Les animaux ont été maintenus en salle d'infection expérimentale à 22°C pendant 3 jours. Les résultats montrent la virulence très élevée de *Vibrio spp.* Nouméa par la voie intramusculaire : une dizaine de bactéries par crevette suffit à tuer 100% des animaux en trois jours (*cf figure N°4*). La précision d'une dose inférieure à 10 cfu/crevette est illusoire. Les infections par voie intramusculaire ne permettront pas de définir une DL50 avec *Vibrio spp.* Nouméa. Les infections par baignade sont moins traumatisantes et correspondent à une voie d'entrée naturelle. Elles seront étudiées en 1996.

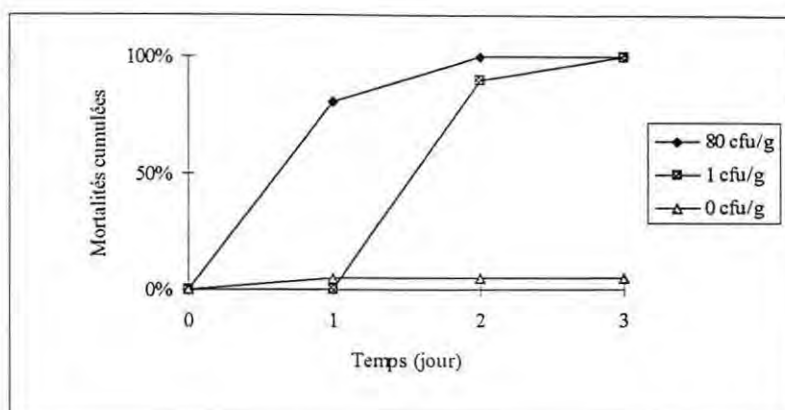


Figure N°4 : Moyennes des mortalités cumulées (n=10, deux répliquats) suite à une injection intramusculaire de *Vibrio spp.* Nouméa souche AM101 chez *Penaeus stylirostris*.

3) Infection par *Vibrio spp.* Nouméa associée au phénomène de cannibalisme chez *Penaeus stylirostris*.

L'objectif de la reproduction expérimentale d'une vibriose par cannibalisme était de montrer une voie de transmission naturelle de l'agent pathogène *Vibrio spp.* Nouméa. L'invasion progressive des différents organes devait permettre de retrouver des lésions histologiques plus spécifiques du Syndrome 93. Les mortalités cumulées dans les lots nourris avec des crevettes infectées ont été différentes de celles des lots témoins à partir du quatrième jour. Le taux de mortalité moyen s'est stabilisé à partir du huitième jour. Il était alors pour la souche AM101, de 40% (cf figure N°5). Mais, la faible reproductibilité des résultats n'a pas permis d'évaluer le pouvoir infectieux du vibrio par ce mode d'infection. Les hémocultures ont montré la présence d'une ou deux souches bactériennes par crevette. L'aspect des colonies et l'identification biochimique ont confirmé le réisolement de *Vibrio spp.* Nouméa. Les images histologiques ont révélé une septicémie associée à un envahissement modéré du myocarde et du tissu interstitiel de l'hépatopancréas par les vibrios. Des corpuscules basophiles intracytoplasmiques de taille variable ont été observés dans l'organe lymphoïde, le myocarde, le tissu hématopoïétique et dans une moindre mesure, dans les branchies, le tissu interstitiel de l'hépatopancréas, la paroi stomacale et le tissu conjonctif de la glande génitale. Ces corpuscules sont situés dans le cytoplasme des hémocytes fixés, ils ont été assimilés à des vésicules contenant un lysat de vibrios phagocytés. Le noyau des hémocytes apparaît souvent picnotique. Ces lésions ont été décrites chez les animaux prélevés dans les différentes fermes de Nouvelle Calédonie en 1995. Leur importance dans le tableau anatomopathologique du Syndrome 93 a été soulignée en 1994, sans précision sur leur nature exacte et leur origine virale ou bactérienne. L'observation en microscopie électronique des animaux naturellement infectés apparaît incontournable pour confirmer une origine virale des lésions.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
TEMOIN	0	10 ± 3	10 ± 3	10 ± 3	10 ± 3	10 ± 3	10 ± 3	10 ± 3
AM101	0	7 ± 7	13 ± 7	30 ± 10	37 ± 10	37 ± 10	40 ± 13	40 ± 13

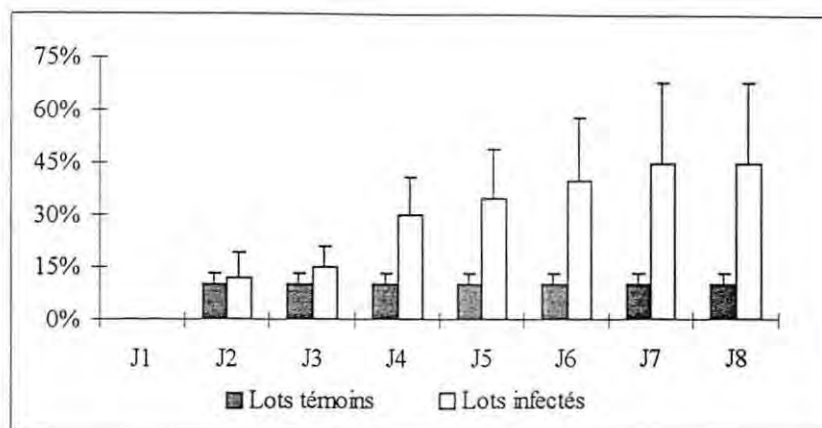


Figure N°5 : Moyennes des mortalités cumulées (n=15, deux répliquats) chez *Penaeus stylirostris* lors d'une ingestion quotidienne de crevettes infectées par *Vibrio spp.*Nouméa souche AM101.

Les résultats ont montré l'existence d'un mode de transmission horizontale directe. Ce dernier explique en partie, la circulation du vibrio dans un bassin. Il n'est pas exclusif. Pour expliquer la contamination entre les bassins et entre les fermes, des transmissions horizontales indirectes (milieu → juvénile) et/ou verticales (larves infectées et existence de porteurs sains) devront être mises en évidence. Au sein du mode de transmission par cannibalisme, la voie d'entrée de l'agent infectieux n'a pas été précisée. Les vibrios ont pu envahir les crevettes par voie per-cuticulaire au niveau de la bouche et des appendices buccaux à la faveur de micro-lésions provoquées par la trituration de l'aliment. La pénétration du vibrio dans les organes systémiques a pu intervenir après l'ingestion, au niveau de l'estomac ou de l'intestin. La trituration de l'aliment infecté provoque un "nuage bactérien" dans le milieu. Les vibrios qui ont abouti dans la chambre branchiale peuvent également être à l'origine de la septicémie. Les réponses à ces hypothèses sont du domaine de la pathogénie des vibrioses.

4) Virulence de *Vibrio spp.*Nouméa par injection anale

La transmission de *Vibrio spp.*Nouméa associée au cannibalisme a montré l'existence d'une voie de transmission naturelle. Cependant, le site d'entrée n'est pas nécessairement le tractus digestif. La virulence de la souche AM101 a été évaluée par voie anale pour préciser une voie d'entrée de *Vibrio spp.*Nouméa mais également dans l'espoir de définir un nouveau modèle d'infection expérimentale permettant d'obtenir une DL50. La voie anale a été préférée à la voie orale pour sa facilité de mise en oeuvre. Les injections ont été effectuées sur des lots de 10 crevettes à jeun depuis 24h (*Penaeus stylirostris*, poids moyen 24g). Des essais préliminaires avec des solutions colorées, ont permis de vérifier la distribution du liquide au cours de l'injection. Un inoculum de 100µl remplit le caecum postérieur, l'intestin moyen, l'estomac et le caecum antérieur. Les résultats montrent une faible virulence de la souche AM101 par cette voie et l'absence d'effet-dose (cf tableau N°2). Les mortalités provoquées par l'injection d'une culture pure (2.4×10^7 cfu/crevette) sont identiques à celles provoquées par l'injection d'une culture diluée au 1000^e. Par cette voie d'infection, le stade de mue pourrait avoir une grande importance. En 1996, la virulence de la souche AM101 par voie anale sera étudiée plus en détail. Il est probable que le *Vibrio spp.*Nouméa ne puisse pénétrer dans la crevette et provoquer une septicémie mortelle que si la cuticule a déjà subi des dommages. Malgré sa virulence élevée par voie intramusculaire, *Vibrio spp.*Nouméa conserverait le caractère pathogène opportuniste attribué aux vibrios.

	J1	J2	J3	J4
10 ⁶ cfu/g	0	10	30	30
10 ⁵ cfu/g	0	0	0	0
10 ⁴ cfu/g	0	30	30	40
10 ³ cfu/g	20	30	30	30

Tableau N°2 : Pourcentage de mortalités dans des lots de *Penaeus stylirostris* (n=10) après injection anale de *Vibrio* spp. Nouméa.

Etude des mécanismes de défense et de résistance de *Penaeus stylirostris*

Ce programme s'attache à l'étude des mécanismes de défense et de résistance des crevettes en élevage soumis à une vibriose. Le modèle utilisé est une bactérie du genre *Vibrio* (AM23) isolée en Nouvelle Calédonie au cours des pics de mortalités des crevettes *Penaeus stylirostris* en élevage. Ce programme est élaboré dans une double perspective, dans un premier temps c'est la mise en évidence des facteurs favorisant la vibriose qui retient l'attention et dans un second temps, ce sont les solutions à apporter permettant de stimuler les défenses et/ou de mettre en élevage des animaux plus résistants à l'infection.

Pour comprendre la relation entre l'hôte et le pathogène, il est nécessaire d'acquérir les outils d'évaluation des capacités de défenses et de résistances des crevettes, de mesurer le potentiel de résistance face à une agression bactérienne et de distinguer une crevette saine d'une crevette malade.

1) Mise au point des outils marqueurs de l'état immunitaire

La capacité osmorégulatrice en tant que critère de l'état physiologique des crevettes en élevage peut révéler une infection. En effet il apparaît que les crevettes infectées expérimentalement par cette bactérie ont une faible capacité osmorégulatrice. Cependant ce seul paramètre n'est pas spécifique d'une infection bactérienne, il est donc nécessaire de prendre en compte des critères rendant mieux compte de l'état immunitaire des crevettes.

1.1 - Numération hémoctaire

Les hémocytes sont un des principaux systèmes de défense des crustacés. Ils ont plusieurs fonctions comme la coagulation, la phagocytose, l'encapsulation et la production de mélanine. Ces fonctions sont déclenchées lors d'une blessure en présence de corps étrangers dans l'hémolymphe au contact des hémocytes. En présence de bactéries, les hémocytes sont mobilisés afin de les éliminer, leur nombre baisse jusqu'à la clarification complète de l'hémolymphe pour revenir à la normale après quelques heures. La numération hémoctaire est faite à partir de l'hémolymphe prélevée à volume égale de la solution anticoagulante (solution d'Alsever additionnée de formol à raison de 10% du volume) avec une seringue stérile. Le comptage est réalisé avec une cellule de Malassez.

1.2 - Identification des types cellulaires

Les différents types cellulaires dans l'hémolymphe chez *P. stylirostris* ont été identifiés après fixation au formol dans la solution anticoagulante en microscopie optique selon leur morphologie et à partir d'éléments bibliographiques. Les trois types cellulaires ci-dessous sont déjà décrits chez d'autres crustacés.

Cellules à grands granules : elles sont parfaitement identifiées à l'état frais entre lame et lamelle en microscopie optique en contraste de phase. Le contenu cytoplasmique granuleux est abondant et une coloration au Giemsa révèle des granules éosinophiles.

Cellules à petits granules : elles sont de forme allongée avec un cytoplasme moins éosinophile dont le contenu granuleux est moins abondant; ces granules sont de petite taille.

Cellules de la coagulation (hyalinocytes) : elles sont les plus petites, non granuleuses. La coloration de Giemsa révèle un noyau de grande taille et un contenu cytoplasmique très réduit.

1.3 - Activité de la prophénoloxydase

La présence de bactéries dans l'hémolymphe déclenche la dégranulation du système prophénoloxydase présent dans les cellules granuleuses. Cette activité est déclenchée en cas d'infection bactérienne ou fongique. L'hémolymphe (200 μ l) est prélevée dans la solution anticoagulante d'Alsever (200 μ l) puis centrifugée à 700 g pendant 5 minutes à 4°C. Le plasma surnageant est jeté et le culot est lavé dans du tampon cacodylate 100 mM, pH 7 additionné de CaCl_2 10 mM. L'activité de la phénoloxydase est mesurée dans les hémocytes en présence de zymosan par la transformation du substrat L-DOPA en Dopachrome. Cette technique est désormais développée en microplaque.

1.4 - Relation entre la capacité osmorégulatrice et la numération hémocytaire lors d'une vibriose expérimentale

La capacité osmorégulatrice de l'hémolymphe chez des crevettes infectées est plus faible que chez des animaux sains. Cette baisse de la CO s'accompagne d'une baisse du nombre d'hémocytes circulant dans l'hémolymphe. L'évolution de ces 2 paramètres est conjointe au cours du développement de l'infection. Cette corrélation (fig. 6) reste à expliquer: ces deux paramètres peuvent évoluer mais sans lien physiologique directe. La baisse du nombre d'hémocyte peut s'expliquer par la mobilisation de ceux-ci pour l'élimination des bactéries dans l'hémolymphe. Ce phénomène est parfaitement connu chez les crustacés (Smith and Ratcliff, 1980a, 1980b, Martin *et al*, 1993). Dans le cas de AM 23, la crevette n'arrive pas à éliminer la totalité des bactéries de l'hémolymphe. La crevette meurt d'une septicémie. La baisse de la capacité osmorégulatrice est liée au stress résultant de l'infection, la crevette n'ayant plus la capacité de réguler son milieu intérieur.

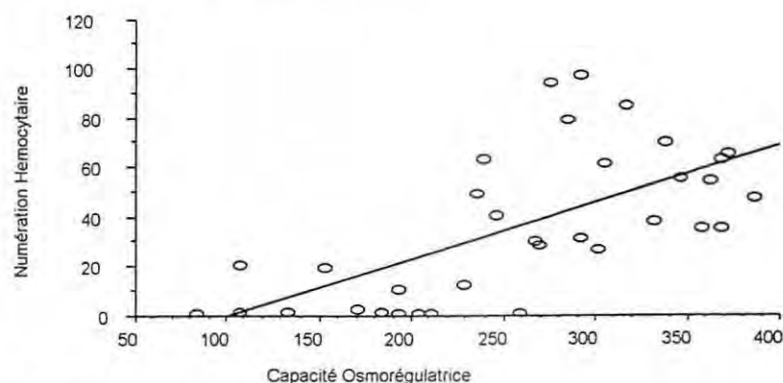


Figure N°6 : relation entre la capacité osmorégulatrice et la numération hémocytaire ($\times 500/\text{mm}^3$) chez des crevettes *P. stylirostris* infectée par AM 23 en injection intramusculaire à raison de 1000 bactéries/crevette entre la 6^{ème} et la 25^{ème} heure après l'injection.

2) Variations des paramètres immunitaires au cours du cycle d'intermue

Afin de mieux interpréter les variations enregistrées à la suite d'une infection, nous avons basé notre approche sur l'étude des variations internes tel le cycle d'intermue. Ce modèle ne nécessite pas la mise en oeuvre de plan d'expérience sophistiqué, ni d'installations spécifiques.

2.1 - Hémocytes totaux

Les comptages hématocytaires au cours du cycle d'intermue sont présentés dans la figure N°7 qui révèle qu'au stade C le nombre d'hémocytes est significativement plus faible qu'en postmue (stade B) ainsi qu'en prémue (D1,D2). Les niveaux d'hémocytes sont équivalents aux stades D2 et B.

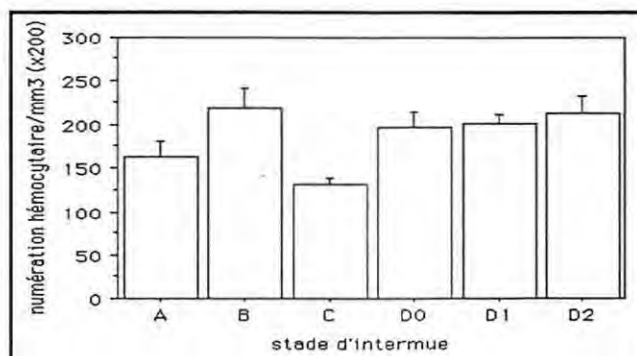


Figure N°7 : numération des hémocytes totaux dans l'hémolymph (x200/mm³) au cours du cycle d'intermue. Les moyennes sont calculées à partir de 3 animaux au stade A, 6 au stade B, 25 en C, 16 en D0, 25 en D1 et 15 en D2, poids moyen 12 g. Les moyennes sont présentées avec l'erreur standard.

2.2 - Comptage différentiel

Les cellules hyalines ainsi que les cellules à petits granules varient de manière similaires selon le modèle de variation des hémocytes totaux. Elles représentent respectivement 80 et 10% du total.

Le nombre de cellules à grands granules varie différemment. La proportion des cellules à grands granules parmi les hémocytes totaux varie selon le stade d'intermue. La proportion de ces cellules au stade C est significativement plus élevée qu'aux autres stades et représente 10% du total des hémocytes et de 6 à 8% en prémue.

2.3 - Variation de l'activité phénoloxydase au cours du cycle d'intermue

L'activité totale de la phénoloxydase est maximale en B puis minimale et constante du stade C au stade D2. En revanche, si l'on rapporte cette activité au nombre total d'hémocytes, on obtient des variations inverses de celles des hémocytes totaux. L'activité est maximale en C et minimale en D2 (fig. 8).

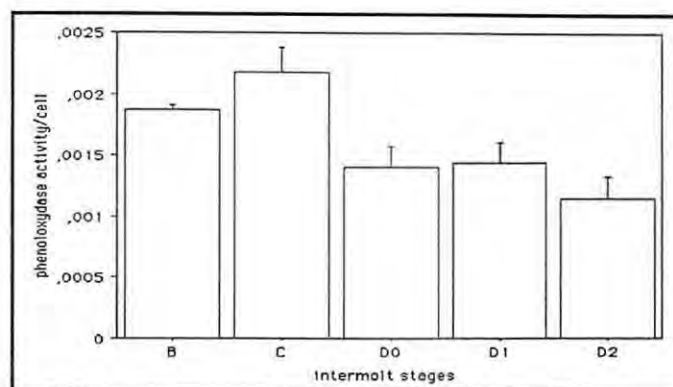


Figure N°8 : variations de l'activité de la phénoloxydase rapportée au total des hémocytes au cours du cycle d'intermue.

Les variations de la numération hémocytaire entre les stades d'intermue avec des maxima en prémue (D2) et en postmue (A-B) suggèrent un renforcement de la protection par les hémocytes à un moment où les crustacés sont fragilisés. La carapace est molle, les blessures plus fréquentes. La crevette a besoin d'un niveau de protection plus élevé pour lutter efficacement contre l'envahissement par des bactéries ou des parasites fongiques. Cette fonction, assurée par la coagulation, est initiée par les cellules hyalines. Nos résultats tendent à confirmer cette hypothèse, le nombre d'hémocytes est le plus élevé au moment de la mue, l'activité spécifique de la phénoloxydase est la plus faible, ceci permet de suggérer que le nombre de hyalinocytes est maximum, donc la capacité de coagulation est la plus élevée.

3) Stimulation des défenses cellulaires

3.1 - Injection de parois bactériennes du vibrio AM 23

Après 4 jours (10 heures), à stade d'intermue égal le nombre moyen d'hémocytes chez les animaux injectés avec des parois bactériennes est plus élevé que chez les animaux témoins mais cette différence est non significative de peu ($p = 6,5\%$).... Cette expérimentation, significativement ratée de peu, est à refaire avec un nombre plus important de crevettes afin de confirmer l'effet sur la numération hémocytaire. Il reste aussi à déterminer pour ce genre de stimulation quel est le type cellulaire qui engendre cette augmentation et quelle protection est offerte à la crevette face à une infection.

3.2 - Stimulation par la balnéation

Initialement cette expérimentation était destinée à observer l'effet d'une infection par balnéation selon le stade d'intermue. Les crevettes au stade C sont comparées à des crevettes en fin d'intermue (D1-D2). Le contact avec les bactéries dure 1 heure à une quantité de 5.10^3 . Puis les crevettes sont mises en bac. A J5, la survie des crevettes initialement en stade C est de 100% celle des crevettes initialement en D1D2 est de 95%. Ces crevettes ont évoluées passant du stade C au stade D1D2, celles qui était en D1D2 sont passées en D0D1 indiquant qu'elles ont mués. Les comptages hémocytaires indiquent que toutes les crevettes baignées ont subi une augmentation du nombre d'hémocytes de 50% par rapport au témoin. Cette différence est significative ($p < 0.1\%$). Le comptage différentiel indique que cette augmentation serait pour les 2 stades liée à une variation du nombre de hyalinocytes.

Coopérations nationales et internationales

- Université Hiroshima (Japon) : échange de souches du genre *Vibrio* avec le Dr Muroga, comparaison des souches pathogènes pour *Penaeus japonicus* et des souches de *Vibrio spp.* Nouméa.
- Université Française du Pacifique (Tahiti) : collaboration avec l'équipe de Biologie Moléculaire pour l'étude des cultures cellulaires chez les crevettes pénéides et ses applications dans la recherche de facteurs de virulence chez les vibrios pathogènes.
- Société BIOTEC-MACKZYMAL (Norvège) et société MICROFEAST (USA) : premiers contacts pour l'obtention d'échantillons d'immunostimulants destinés aux expérimentations de 1996.
- Société INVE (Belgique) et AquaTT (Irlande) : début d'une collaboration pour l'évaluation de l'efficacité des immunostimulants face aux vibrioses chez les crevettes pénéides. Obtention d'un étudiant avec un financement CEE pour des recherches prévues en 1996.

Objectifs pour l'année 1996

Les actions Soutien ne font pas l'objet de prévision. Elles seront traitées à la demande et dans les délais correspondants à leur caractère de priorité. Cependant, dans le cadre du soutien au programme génétique "étude de la résistance de *Penaeus stylirostris* lignée TT au virus IHHN", les possibilités de développement d'infections expérimentales virales au COP seront probablement étudiées au cours de l'année 1996.

La principale action de recherche programmée pour l'année 1996 est l'évaluation de l'efficacité des immunostimulants chez les crevettes pénéides. Le sujet sera d'abord exploité sur des crevettes en grossissement puis sur les stades larvaires. Le modèle d'infection par balnéation et de nouveaux marqueurs de l'immunité seront mis au point dès le début de l'année. Les immunostimulants testés seront des glucans, des parois bactériennes ou des bactéries vivantes atténuées. Pendant la phase de médication, les effets étudiés sur les crevettes juvéniles seront le taux de survie, le taux de croissance et l'influence sur les marqueurs de l'immunité. Après la phase de médication, la résistance des crevettes à une vibriose expérimentale sera évaluée en salle d'infection. Ce programme a été mis en place avec plusieurs partenaires industriels.

Les thèmes suivants seront également abordés mais de façon moins prioritaire :

Etude de Vibrio spp. Nouméa :

Forme viable non cultivable, influence de la température et explication du caractère saisonnier du Syndrôme 93. Support de virulence : recherche de toxines bactériennes.

Pathogénie des vibrioses chez Penaeus stylirostris :

Etude des voies d'entrée du vibrio pathogène.

Etude des facteurs environnementaux aggravants et de leurs effets sur les marqueurs de l'immunité. Ce dernier thème sera développé en association avec l'Unité Ecophysiologie et fera l'objet d'un sujet de stage de trois mois.

PROGRAMME CREVETTES

THEME GENETIQUE

- **CYTOGENETIQUE**
- **SELECTION GENETIQUE**
- **PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION**
- **CRYOCONSERVATION**

Induction de la polyploïdie (*P. indicus*)

Un choc chaud appliqué avant la fin du premier clivage cellulaire de l'œuf inhibe la formation du sillon de division, du moins dans un premier temps. En réalité, cette première division cellulaire n'est pas supprimée mais retardée puisque, au moment du second clivage chez les témoins, deux sillons de division perpendiculaires apparaissent simultanément. Ainsi, la cellule-œuf se divise directement en quatre blastomères, recouvrant alors le même stade de développement que les témoins. Cet effet particulier du choc chaud avait été observé par une équipe de cytogénéticiens travaillant sur le triton dans la décennie 1970. Chez cet amphibien, l'induction de la tétraploïdie s'était avérée tout aussi impossible à réaliser que chez les crevettes (ou les mollusques) en appliquant le choc chaud avant l'achèvement de la première division de segmentation de l'œuf. Par contre, lorsqu'il est appliqué en interphase de seconde division embryonnaire, le choc chaud peut induire la tétraploïdie chez le triton. Nous avons donc testé un choc chaud plus tardif chez la crevette, débutant après la formation des deux premiers blastomères. Le développement de ces embryons présente ensuite par rapport à celui des témoins un retard d'une division cellulaire (l'observation a porté jusqu'à la gastrulation).

Ce traitement a permis l'obtention de larves nauplii tétraploïdes. Ces larves ont été élevées jusqu'au stade post-larve (P5). Des individus tétraploïdes ont été détectés parmi ces post-larves (50% des survivants). Ces individus n'ont pas présenté de retard dans le passage des stades larvaires par rapport aux témoins. Toutefois, ils se distinguent des témoins par leur taille plus faible et par la disposition et le nombre réduit de leurs chromatophores. Les lots traités se sont révélés moins tolérants face aux variations environnementales notamment celles de la salinité. Si la nature eutétraploïde de ces post-larves est confirmée par analyse d'images (jusqu'à présent une panne du système d'acquisition d'images a retardé cette confirmation), il s'agira des premiers crustacés tétraploïdes obtenus par manipulation chromosomique.

De nouveaux élevages d'individus traités seront conduits jusqu'au stade adulte afin d'analyser les capacités reproductives de ces animaux.

L'élevage d'individus triploïdes induits par la 6-DMAP sera réalisé au cours de l'année 1996.

Etude du caryotype (*P. indicus*)

La garniture chromosomique des crevettes pénéides est difficile à étudier en raison de sa composition très monomorphe, du nombre fondamental élevé (44 paires) et de la petite taille des chromosomes. L'appariement, tâche principale de l'établissement du caryotype, est donc particulièrement ardu sachant que l'éventail des choix possibles s'élève à environ 4.10^{66} et l'intervention de la capacité de calcul de l'ordinateur était donc souhaitée. Un certain nombre de méthodes d'appariement ont été testées toutes basées sur les caractéristiques morphologiques des chromosomes, à savoir les longueurs de leurs petits et grands bras. Ces caractéristiques ont été mesurées par une application du système d'analyse d'images SAMBA spécialement

développée au laboratoire à cet effet. La gestion puis le traitement de ces données ont été réalisés sous Excel grâce à de multiples macros, chacune testant une méthode d'appariement particulière. Deux objectifs étaient poursuivis.

Le premier était la recherche d'hétérosomes (chromosomes sexuels), c'est-à-dire la détection de deux chromosomes relativement dissemblables une fois formées les paires de chromosomes les plus semblables deux à deux. Selon notre démarche, cette méthode d'appariement doit être utilisée dans un premier temps chez une espèce pour mettre en évidence d'éventuels hétérosomes. Si cette recherche n'aboutit pas à la détection systématique d'une paire particulière dans l'un des sexes, alors on utilisera une méthode d'appariement plus fine.

Cette seconde méthode (deuxième objectif) est basée sur l'hypothèse que chaque chromosome sans exception possède son homologue. La méthode retenue utilise un principe de résolution graphique dans un espace euclidien à deux dimensions (grand bras et petit bras) et minimise la somme des distances entre homologues. Ce principe évite l'apparition de paires très dissemblables parmi les dernières à être formées et établit donc un caryotype mathématiquement optimisé. Cette méthode originale est en cours de validation sur d'autres espèces présentant des caryotypes divers (huître, homme, souris).

Fécondation *in vitro* (*P. indicus*)

Plusieurs indices suggèrent l'existence d'un phénomène de capacitation des spermatozoïdes dans le thelycum de la femelle chez *P. indicus*, espèce à thelycum fermé. En effet, le pH intracellulaire et la concentration de l'ion Ca^{++} dans le cytosol varient selon que les spermatozoïdes sont prélevés dans les spermatophores du mâle ou dans le thelycum de la femelle. Un tel phénomène de capacitation, avec des variations de même tendance, a été décrit chez l'espèce modèle *Sicyonia ingentis*. Les spermatozoïdes non-capacités, comme ceux prélevés dans les voies génitales mâles, ne peuvent pas subir la réaction acrosomique. La démonstration de ce phénomène de capacitation consiste donc à induire *in vitro* la réaction acrosomique chez des spermatozoïdes prélevés dans le réceptacle séminal femelle (ou capacités *in vitro*). Les premières tentatives d'induction de la réaction acrosomique chez les spermatozoïdes de *P. indicus* prélevés dans le thelycum n'avaient pu aboutir. L'emploi d'une "eau d'œuf" (eau de mer dans laquelle ont baigné les œufs tout juste pondus) de plus en plus concentrée en principes actifs n'avait pas pu déclencher cette réaction acrosomique. Il était dès lors probable que l'échec était dû aux spermatozoïdes eux-mêmes plutôt qu'au facteur inductif. Les spermatozoïdes ont donc été prélevés plus tard dans le processus supposé de capacitation. C'est ainsi que l'induction de la réaction acrosomique à partir de spermatozoïdes prélevés sur des femelles ayant commencé à pondre a été réussie. Cette réaction est extrêmement rapide chez *P. indicus* puisqu'elle est achevée en moins d'une minute alors qu'elle s'accomplit en 5 à 10 minutes chez *S. ingentis*. L'analyse des différentes phases de cette réaction est en cours pour permettre la publication de ce travail sur la capacitation des spermatozoïdes de *P. indicus* (première crevette du genre *Penaeus* chez qui ce phénomène a été mis en évidence).

Les essais de fécondation *in vitro* resteront donc à être menés en utilisant du sperme prélevé sur des femelles en train de pondre. Une capacitation *in vitro* des spermatozoïdes prélevés sur des mâles est envisageable en incubant ces derniers dans le fluide sécrété par la femelle au niveau du thelycum.

Marqueurs hypervariables (*P. monodon* et *P. stylirostris*)

Le programme porte toujours sur les locus microsatellites. Le Laboratoire Génome et Populations de Montpellier, avec qui nous collaborons depuis 1992, s'est chargé de détecter les locus et de construire les séquences de leurs amorces. Les paramètres de la réaction d'amplification (PCR) pour chaque jeu d'amorces ont ensuite été optimisés au COP et à Montpellier lors d'une mission d'un mois de V. Vonau. En 1995, 9 nouveaux locus ont ainsi été obtenus chez *P. monodon*. L'étude du mode de transmission de ces marqueurs, de leur variabilité et de leur distribution dans les populations est réalisée au COP. De même, toutes les techniques annexes sont mises au point au COP.

Ainsi, une nouvelle technique d'extraction de l'ADN génomique a été développée. Elle est basée sur l'adsorption de l'ADN sur des billes de résine utilisées en chromatographie, le Chelex™. Elle permet d'extraire de l'ADN à partir d'une quantité très faible de tissu. Grâce à cette technique, il est désormais possible de révéler des locus microsatellites chez des post-larves, des larves mysis, zoé et même nauplius.

La migration et la révélation en gel de polyacrylamide a aussi été mise au point. Grâce à son pouvoir résolutif supérieur à celui de l'agarose, ce type de gel permet une identification plus sûre des allèles proches. Chez *P. monodon*, 3 des 11 locus testés (C9, Di25, Di27) ont révélé du polymorphisme. Le polymorphisme de ces locus est cependant limité, au moins dans notre population, puisqu'il n'a pas été trouvé plus de 2 allèles par locus.

Des contacts ont été pris avec les organismes de divers pays de la zone indo-pacifique afin de recevoir des échantillons de l'espèce *monodon*. Une étude du polymorphisme génétique présent à ces locus dans des populations naturelles est en effet indispensable pour estimer le niveau de consanguinité de notre souche.

La finalité principale du programme d'étude des marqueurs hypervariables chez les crevettes est désormais l'aide à la sélection chez *P. stylirostris*. Les 11 jeux d'amorces créés à partir de la banque génomique de *P. monodon* ont donc été testés avec de l'ADN de *P. stylirostris*. Un seul jeu a permis la révélation d'un microsatellite polymorphe chez cette espèce. Une banque génomique de l'espèce *stylirostris* devrait être constituée au cours de cette année. La recherche de locus microsatellites spécifiques devrait s'ensuivre. Parallèlement, des échantillons issus de deux populations élevées à Tahiti, ainsi que de Nouvelle-Calédonie, de Guam et du Mexique sont en cours de comparaison.

Un essai utilisant l'amplification génique aléatoire a été réalisé sur des souches bactériennes isolées à l'issue des épisodes de mortalité en Nouvelle-Calédonie (Syndrome 93). Cette série d'expériences a été conduite afin de démontrer l'intérêt, la rapidité de mise en œuvre et l'efficacité de ce type de technique dans la caractérisation et le diagnostic de ces souches. Les jeux d'amorces disponibles au COP (c'est-à-dire ceux isolés chez *P. monodon*) ont été employés comme des séquences d'amorces aléatoires. Tous les jeux sont potentiellement discriminants. Le protocole utilisé est original et mérite donc une validation par comparaison des résultats avec des protocoles classiques. Cependant ces travaux préliminaires ont démontré l'intérêt de cette technique d'identification rapide, complémentaire des tests biochimiques classiques et dont le pouvoir discriminant théorique est meilleur.

Travaux annexes en analyse d'images

Un certain nombre d'applications ont été développées pour les besoins spécifiques des autres unités du COP :

- Etude de critères morphométriques sur les larves de *P. stylirostris* (modification et amélioration du programme).
- Comptage et caractérisation morphométrique des spermatozoïdes de *P. stylirostris*.
- Essais de mise en évidence des effets de divers colorants sur l'analyse d'images de spermatozoïdes de *Penaeus vannamei*.
- Essais de faisabilité de la mesure de l'ouverture du siphon de l'huître perlière.

Formation de jeunes chercheurs

- Luc Peeters a obtenu, le 25 janvier 1996, sa thèse de doctorat de l'Université Française de Pacifique intitulée "Contribution à la connaissance de quelques mécanismes de reproduction et tentatives d'induction chimique de la tétraploïdie chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards (Crustacé, Décapode)", avec la mention Très Honorable augmentée des félicitations écrites du jury.

Collaborations nationales et internationales

- Pr. W. H. Clark, Jr., Chairman, University of Florida, Department of Fisheries and Aquatic Sciences (Gainesville, FL) : poursuite de l'étude des effets de la 6-DMAP sur les centrosomes et la cytodérèse. Mission de L. Peeters à Gainesville prévue en avril 1996 et financée par l'Université de Floride.

- Dr. F. Bonhomme, Université de Montpellier II, Laboratoire Génome et Populations : poursuite de la recherche de marqueurs nucléaires hypervariables chez *P. stylirostris*.

- Pr. C. Herbaut, Université Française du Pacifique : étude de la gamétogenèse des crevettes polyploïdes.

AMELIORATION GENETIQUE PAR SELECTION PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Du fait de l'interaction croissante entre les actions des thèmes *Amélioration génétique par sélection* et *Physiologie de la reproduction*, et afin d'éviter des redites, le bilan annuel 95 de ces deux thèmes est présenté conjointement.

Rappel des objectifs

L'approche sélection génétique vise à l'amélioration des performances des animaux d'élevage non plus par modification de l'environnement d'élevage, mais par action sur le potentiel génétique de l'animal: on cherche à évaluer dans certaines lignées la variabilité de certaines caractéristiques, puis de les fixer; ou à exploiter par croisement le potentiel de plusieurs lignées distinctes. Les critères de sélection recherchés sont: croissance, résistance, et morphologie. L'implantation du COP hors des zones de répartition naturelle des Pénéides d'élevage a conduit à maîtriser l'ensemble de leur cycle biologique à partir d'animaux importés, et donc à un début de domestication de ces espèces, au sens où il n'existe pas ou peu de flux géniques à partir de populations extérieures.

L'émergence dans la population de *Penaeus stylirostris* du COP d'une lignée, dite SPR43, expérimentalement résistante au virus IHHN a conforté l'idée qu'il était possible de sélectionner certains caractères intéressants chez les Pénéides, et, parallèlement, qu'il serait intéressant de mettre en place un programme de sélection destinée à la valorisation de cette SPR43.

Le thème Sélection Génétique, mis en place fin 1992, a donc pour objectif :

- la valorisation de la souche SPR43, *per se* ou par le biais de lignées améliorées ;
- l'amélioration de cette souche sur des critères d'intérêt économique ;
- l'étude du mécanisme de résistance de la souche.

Cette approche repose étroitement sur l'étude de la reproduction, aussi bien d'un point de vue fondamental que zootechnique, qui est l'objectif général du thème Physiologie de la Reproduction. Les objectifs de ce dernier ont été revus en fonction de l'évolution de l'URM 4 d'une part (mise en veille de l'étude des mécanismes hormonaux contrôlant la maturation chez *P. vannamei* et *P. indicus*), et des objectifs d'amélioration de la SPR43 (étude de la reproduction et de la zootechnie de *P. stylirostris*).

Travaux réalisés

Maîtrise de la zootechnie

La maîtrise de la zootechnie, à quelque niveau du cycle que ce soit, est le facteur essentiel d'un programme de sélection. Il n'est plus question, comme dans une production classique, de produire un nombre de juvéniles, quel que soit le stock d'origine, mais de fournir

de manière sûre des nauplii issus d'un stock donné, et d'effectif souvent limité. La maîtrise de la filière géniteurs est un des éléments de cette zootechnie, et sa mise en place conditionne l'ensemble du programme. Les efforts en matière de zootechnie menés au COP depuis sa création ayant essentiellement porté sur *P. monodon* et surtout sur *P. vannamei*, la filière *P. stylirostris* a donc été redéfinie pour répondre aux contraintes du programme:

- assurer le maintien de lots nombreux, individualisés, et de faible importance numérique ;
- minimiser les facteurs de variation environnementale inter-bassins ;
- assurer une fourniture régulière de géniteurs à partir des lots expérimentaux ;
- faciliter les manipulations (échantillonnages, tris).

L'utilisation de bacs circulaires en fibre de verre de 30 m³ et ombragés, a été généralisée à l'ensemble des expériences de sélection génétique, et à la filière géniteurs.

Géniteurs

L'utilisation de ces bacs a permis d'obtenir, à partir de post-larves, des géniteurs de bonne qualité mais de taille inférieure à celle obtenue par la méthode extensive "classique": les mâles atteignent 45g et les femelles 55g en 12 mois. L'effet de la densité est important et une densité de 15/m² à 20g devrait permettre une meilleure croissance.

La filière géniteurs alternative en bacs scobalit permet de produire des géniteurs de 50g à un an, à partir d'animaux de 25-30g directement issus des populations en expérimentation.

L'amélioration des croissances par rapport aux élevages antérieurs est largement à mettre au compte de la distribution, 3 après-midi par semaine, d'un aliment sec préparé au COP et riche en calmar et "slurry" de moules; ainsi que de taux de nourrissage élevés: 5% de 25g à la sortie des géniteurs en maturation.

Dans tous les élevages, un pourcentage plus ou moins important des mâles (15 à 45% selon les élevages) présente une hypertrophie (uni-ou bilatérale) des spermiductes qui empêche la production de spermatophores. Cette anomalie semble liée à la température puisqu'on la trouve beaucoup plus fréquemment dans les élevages de saison chaude et principalement lorsque les fortes températures coïncident avec la formation des spermatophores, vers 20-25g. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que deux élevages entièrement menés en bacs ombragés, ont présenté un faible taux d'hypertrophie (<5%). Le phénomène est irréversible.

Les femelles ne présentent pas de problèmes particuliers. Les maturations se font tout au long de l'année et particulièrement lorsque la température augmente. L'influence de ces maturations naturelles et répétées sur la qualité des pontes en maturation reste à étudier (épuisement des femelles?).

Même si certains paramètres (densité optimale, âge des transferts, température) demandent à être encore optimisés, cette filière est à même d'assurer une fourniture régulière de géniteurs, dans des conditions de milieu contrôlées et les plus homogènes possibles, et avec des performances de ponte plus régulières que dans les bassins extensifs classiques, dans lesquels les fluctuations environnementales sont importantes.

L'utilisation systématique d'eau refroidie à 17-18°C lors des opérations de transfert et de tri a permis de résoudre les problèmes de mortalité survenant lors de ces opérations.

Reproduction

L'estimation des paramètres génétiques (héritabilités des caractères, variances génétiques, gestion de la consanguinité) au sein de chaque souche nécessite le recours à des structures familiales, ce qui implique une maîtrise des conditions de maturation et de fécondation. Certains points restent encore limitants à ce niveau :

- le faible nombre de femelles entrant en ponte ;
- l'absence de synchronisation des pontes ;
- la qualité des pontes de rangs successifs ;
- la mauvaise maturation des mâles, spécialement en saison chaude ;
- une bonne connaissance des spermations successives des mâles.

Trois expériences ont permis d'étudier l'influence du rang de ponte sur les performances des crevettes et la qualité des oeufs. Les expériences ont duré trois semaines à partir de la date d'épédonculation et toutes les pontes ont été suivies jusqu'au troisième rang. Le suivi des femelles a été individuel dès la deuxième expérience: dans aucun cas, on n'observe d'effet significatif des facteurs rang de ponte et femelle sur le nombre d'oeufs pondus. De plus il n'y a aucun effet du facteur rang de ponte sur le taux d'éclosion et le taux de survie à Zoé1. On observe une grande variabilité des résultats. De nouvelles méthodes standards d'échantillonnage sont étudiées afin de limiter les imprécisions lors des comptages et pour l'estimation des taux de fécondation.

Pour répondre aux questions liées à la maturation des mâles, un groupe froid a été mis en place en 1995, permettant de jouer sur la température de stockage avant fécondation, et notamment de maintenir cette température entre 25 et 26°C, même en saison chaude.

Elevages larvaires

L'amélioration de la zootechnie inclut également la phase d'élevage larvaire. Si l'on prend comme base le chiffre de 30 familles biparentales par souche comme un minimum permettant une bonne estimation des paramètres génétiques et une bonne gestion de la variabilité génétique, on peut estimer le nombre de croisements et d'élevages larvaires nécessaires. Ces élevages sont effectués dans des volumes de 200 ou 50 litres: le protocole d'élevage dans de telles unités a du faire l'objet d'une optimisation au cours de l'année 1995.

Elevages expérimentaux

L'absence de marquages physiques ou génétiques oblige à maintenir des groupes génétiques dans des unités d'élevage distinctes: les structures actuelles sont loin de suffire à la stabulation de ces groupes. Leur maintien jusqu'à une taille permettant le marquage physique (5-10g pour les bagues oculaires, 2g pour les marques internes qui seront bientôt testées) reste encore à résoudre. La phase juvénile, entre PL et l'âge de 2 mois environ, apparaît la plus cruciale, et les essais d'élevage en petites unités se sont soldés par des résultats décevants. Des essais d'adaptation à cette phase des bassins de 30 m³ du type de ceux utilisés pour le grossissement et les prégéniteurs sont en cours. Les survies restent variables; mais les premiers résultats mettant en jeu la préparation du milieu avant ensemencement et un protocole particulier de nourrissage, ainsi que l'utilisation systématique d'ombrage (30%) a permis l'obtention de survies de l'ordre de 50% à 2g. Des essais effectués en bacs de 4 m³ ont également montré de bonnes survies et croissances.

Les biais importants amenés par les facteurs environnementaux imposent un contrôle rigoureux des milieux d'élevage. Bien que les algues soient adéquatement contrôlées par les toiles ombrage, les efforts pour standardiser les conditions d'élevage ne sont pas toujours couronnés de succès. Seules les techniques de marquage seront à même d'apporter une solution à ces variations environnementales, par la généralisation des testages de plusieurs groupes ou familles dans un même bac.

C'est dans ce domaine de la maîtrise zootechnique que les acquis apparaissent les plus importants pour la suite du programme, dans la mesure où l'ensemble de la zootechnie de l'espèce a été repensée en fonction des impératifs de sélection: contrôle du milieu, multiplication de lots de faible importance numérique, techniques de manipulations "douces", etc. Il s'agit d'un préalable essentiel, en grande partie atteint pour la majorité du cycle.

Testage de populations

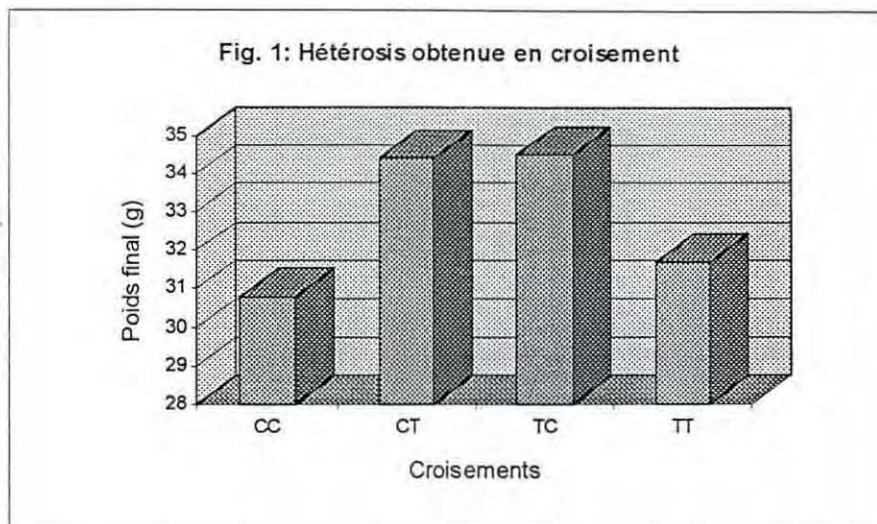
La relative faiblesse numérique des reproducteurs *P. stylirostris* présents sur le COP, et le faible nombre de PL produites sur cette espèce entre 1988 et 1993, laissaient craindre une perte de variabilité importante, qui pouvait s'exercer au détriment des performances. Malgré sa proximité génétique, et afin d'ouvrir au minimum le pool génique, la population élevée en Nouvelle-Calédonie (population CC) a été introduite au COP en juillet 1993 sous la forme de nauplii issus d'un mélange de 10 pontes, et testée contre celle produite simultanément au COP (population TT).

Il n'a pas paru judicieux, afin de préserver l'aspect sanitaire des populations présentes sur le COP, d'introduire des populations de différentes origines géographiques, ce qui aurait été souhaitable d'un point de vue purement génétique.

En théorie, les deux populations CC et TT sont très semblables: elles proviennent toutes les deux d'une importation d'origine Mexique effectuée sur les deux Territoires en 1980, en provenance de Tucson. La souche détenue au COP a totalement disparu en 1990, ainsi que l'ensemble des *P. stylirostris* d'origines diverses (Panama, Equateur) introduites depuis 1975. La population COP a donc été reconstituée en août 1990 par des réintroductions en provenance de Nouvelle-Calédonie. Les deux populations CC et TT ne devraient donc différer que par l'isolement et une gestion de reproduction différente entre 1990 et 1993.

Les populations CC et TT avaient été testées en 1993-1994 pour la croissance et la reproduction. Cette phase n'avait pas permis de mettre en évidence une différence de croissance dans les conditions utilisées. Une tendance à une meilleure réponse de la souche TT aux conditions intensives de maturation, alors que la CC répondait de manière équivalente en filière intensive et extensive, avait été obtenue, sans que les résultats fussent significatifs.

En août 1994 ont été constitués, à partir de cette première génération, deux nouveaux lots CC et TT, ainsi que les croisements réciproques CT et TC. Ces nouveaux groupes ont été produits et élevés de manière similaire en bassins intensifs de 30 m². Les croissances à 6 mois ne montrent aucune différence significative entre les lots "purs", ce qui confirme les résultats de la première phase. On constate une croissance significativement supérieure de +10% sur les lots "croisés" (cf. figure 1). Ce résultat laisse supposer l'existence d'une possible vigueur hybride, ou tout au moins le retour à une variabilité d'origine si l'on considère que les deux populations ne diffèrent que par dérive d'une même population d'origine.



Les résultats de variabilité intra-population (17% pour CC et 14% pour TT), et inter-populations (22%) obtenues par les analyses RFLP sous-traités à Therion Co en 1994 semblent révéler une consanguinité importante et comparable dans les deux populations, et un éloignement faible, ce qui confirme l'histoire connue de ces populations.

L'obtention d'un effet d'hétérosis en croisement entre ces deux populations, dont l'éloignement n'est pas très important, peut laisser espérer l'exploitation de tels effets si l'on peut disposer de populations ou lignées génétiquement plus éloignées. Un tel effet conduit également à envisager l'étude des effets de consanguinité chez l'espèce, ainsi que la constitution de lignées consanguines.

Une nouvelle série d'échantillons, comprenant une population sauvage mexicaine (provenance Aquanova), et des populations d'élevage provenant de Guam et d'Hawaïi (Collaboration avec le Guam Aquaculture Development and Training Center) a été soumise aux mêmes analyses aux fins de référence (variabilité sauvage) et de comparaison avec des populations d'origines différentes. Les résultats sont attendus.

Sélection divergente

A la fin de la période de comparaison de croissance entre les populations CC et TT, la population CC avait, pour des questions d'effectif, été choisie comme population de départ d'une sélection divergente pour la croissance. Les contraintes de tri et d'élevage n'avaient pas permis de descendre, sur ce tri de "F0" au-dessous d'une pression de sélection de 20%. Les différentielles de sélection théoriques étaient comparables entre les lignées inférieure (SI) et supérieure (SS) pour un même sexe. Cependant, la variabilité du nombre de reproducteurs entrant effectivement en phase finale de maturation et ponte rend difficile le maintien strict d'une différentielle de sélection: en effet, seul un faible nombre de reproducteurs sélectionnés donnent une descendance.

Le tri des reproducteurs ayant eu lieu environ 6 mois avant la mise en maturation, cette phase avait permis de vérifier que les lots triés et témoins restaient significativement distincts pendant cette période, diminuant ainsi le risque de voir les différences de taille entre individus être dues à des phénomènes de dominance comportementale.

La génération F1 a été constituée en octobre 1994, à partir de ces reproducteurs SI et SS d'une part, de reproducteurs témoins non triés (ST) d'autre part.

Les résultats de croissance à 6 mois de cette F1 montrent des performances significativement différentes entre les lots, avec une baisse de performances de la lignée SI (-5,6% par rapport à ST), mais une baisse encore plus sensible de la lignée SS (-13,7%) (cf. figures 4). Dans tous les groupes, le poids des femelles est significativement supérieur de + 8% en moyenne à celui des mâles (cf figure 2).

La sélection des animaux destinés à reproduire chacune de ces lignées F1 a été effectuée en mars 95, sur des bases plus strictes que pour la génération précédente: le pourcentage de mâles retenus a été en moyenne de 10,2% en SS, et de 11,3% en SI; les pourcentages sont respectivement 10,2% et 11% pour les femelles. Les différentielles de sélection sont comparables entre les groupes. Le suivi de ces pré-géniteurs a confirmé les résultats de la F0 sur le maintien de groupes statistiquement différents après les tris: avant maturation, le poids des animaux SI (tous sexes confondus) est de -9% par rapport au témoin ST, et celui des SS de +11% (cf. figure 2bis).

Afin d'accentuer l'effet de sélection, et d'éviter au maximum la reproduction d'animaux appartenant à des classes de poids se recouvrant de manière inter-groupes, une deuxième troncature a été effectuée en août 1995, avant la rentrée des reproducteurs en maturation. Dans la pratique, et pour des questions d'effectif minimum requis, 31% de la tête de lot SS, et 29% de la queue de lot SI ont été entrés en maturation. En ce qui concerne les reproducteurs issus du groupe témoin ST, 30% des animaux centrés sur la moyenne ont été retenus (cf figure 3).

La génération F2 issue de ces reproducteurs a étéensemencée en octobre 1995.

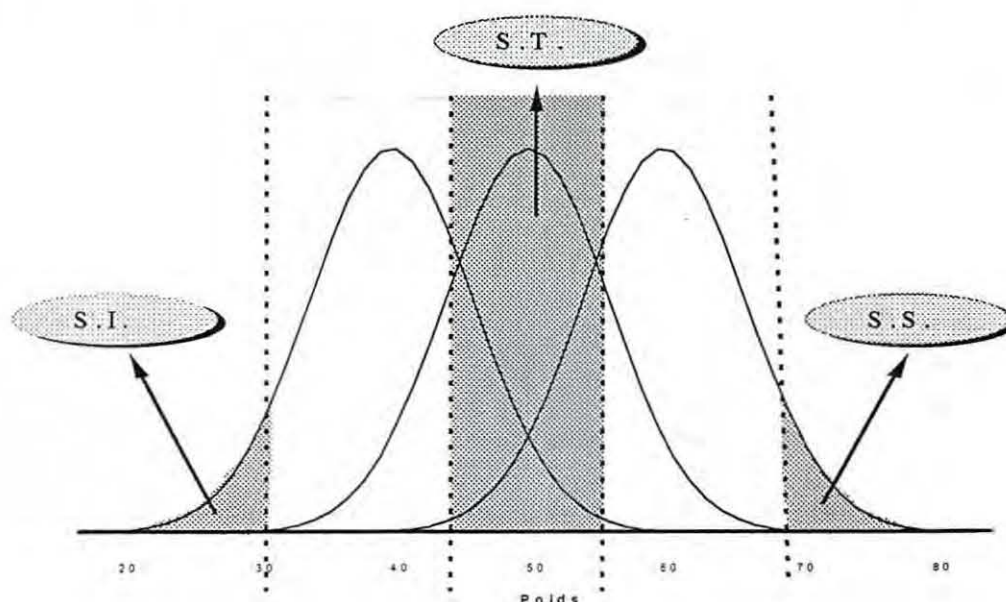


Fig. 3: Constitution schématique des lignées

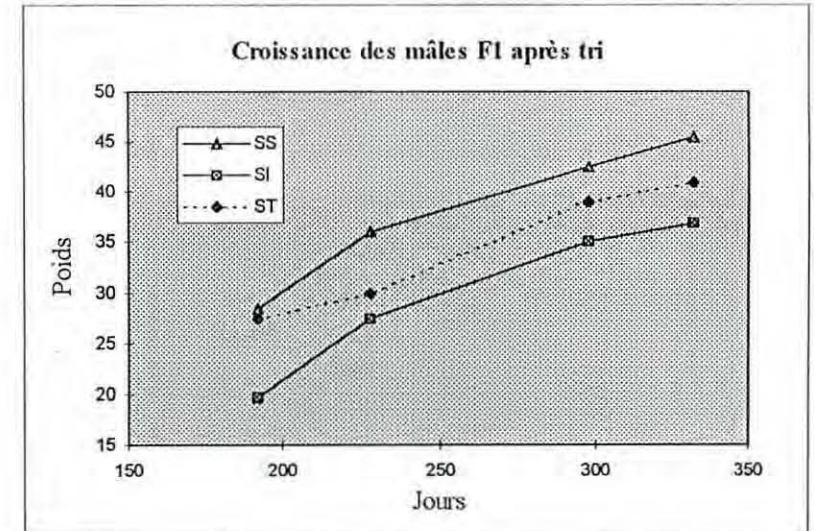
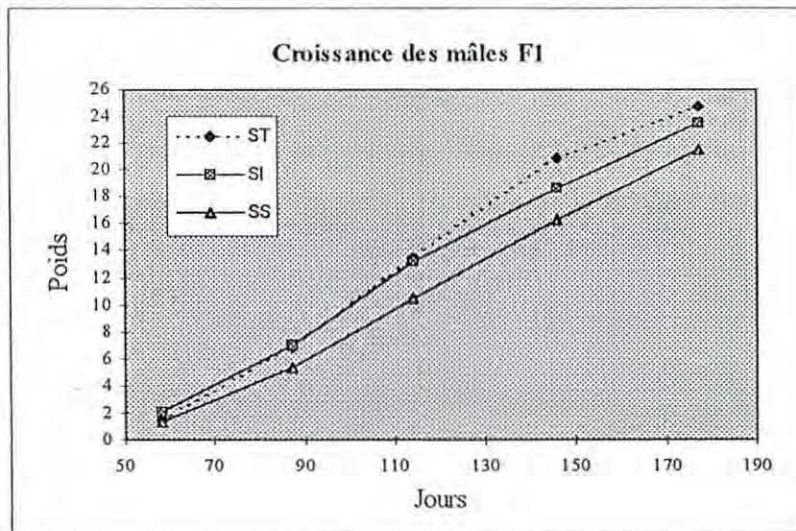
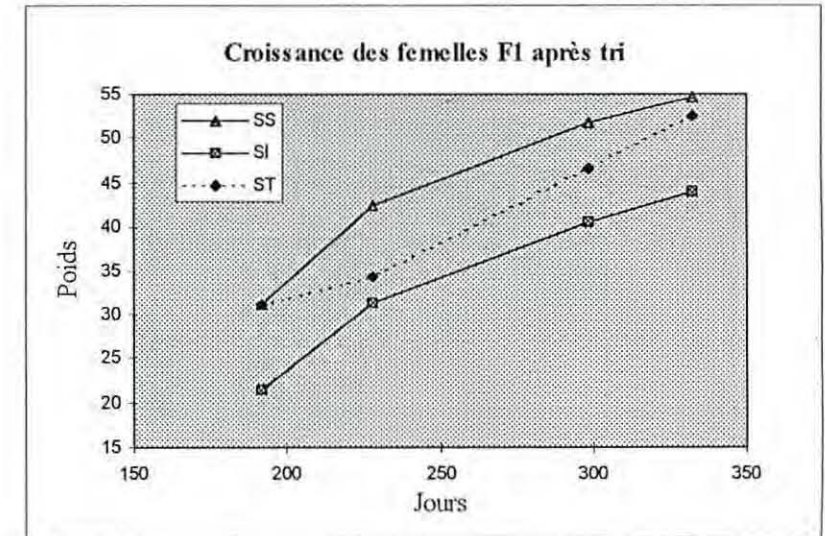
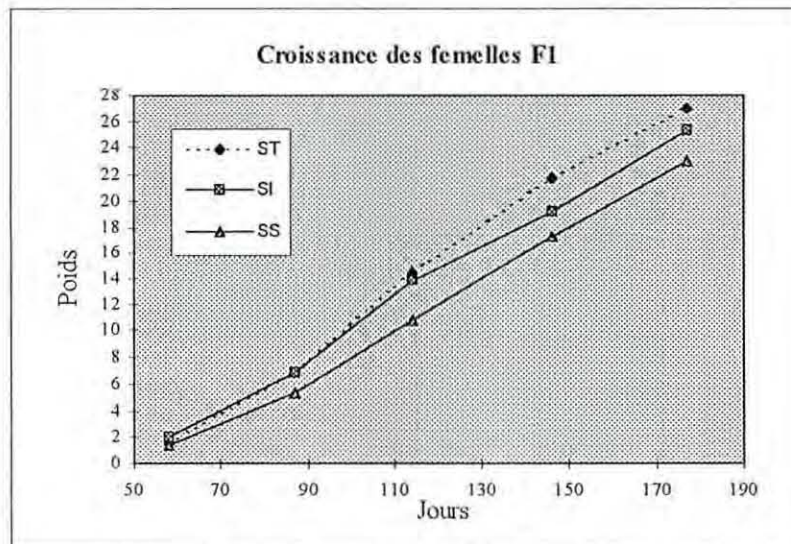


Fig. 2: Croissance de la génération F1

Fig. 2bis: Croissance des pré-générateurs F1 après tri

Recherche de différences dans la résistance aux stress d'élevage

La recherche de souches ou lignées résistantes aux diverses épizooties passe par la disponibilité de tests diagnostiques permettant de caractériser la résistance vis-à-vis de tel ou tel agent pathogène. Cependant cette approche impose (1) que l'on dispose des tests nécessaires; (2) que l'on ait affaire à une pathologie dont l'agent est connu et unique. Or, à l'heure actuelle, la première condition n'est pas pleinement satisfaite, tandis que la seconde risque d'être un cas théorique et optimiste. Dans ce contexte, il peut être tentant de rechercher un indicateur plus global de résistance, et de se tourner vers des indicateurs physiologiques généraux. Le critère actuellement utilisable, et qui a été développé par l'équipe d'Ecophysiologie du COP, est la capacité osmorégulatrice de l'animal, dont la réponse semble être liée à un facteur de stress général de l'animal. Le degré de corrélation de cet indicateur avec tel ou tel facteur de stress, comme avec une résistance aux agents pathogènes, sont inconnus.

Des expériences préliminaires de mise au point des stress applicables pour la recherche de différences de la capacité osmotique entre lignées génétiques ont été effectuées, en collaboration avec l'équipe Ecophysiologie.

Les stress suivants ont été testés :

- le stress manipulateur: émergence des animaux pendant 15 minutes, puis mesure de la CO immédiatement après le stress, puis 4 heures après;
- la baisse de salinité: la salinité est descendue, par paliers de 5 pour mille, de 36 à 5 pour mille, et la CO mesurée après 24 heures d'acclimatation à chaque palier;
- l'hypoxie: les animaux sont soumis à un stress hypoxique de 2, ou 1 ppm pendant 24 heures, puis prélevés pour mesure de la CO.

Les groupes génétiques utilisés étaient constitués des 4 groupes de croisement préalablement formés pour les tests de performances zootechniques: les deux groupes "purs" CC et TT, et les groupes croisés CT et TC.

Les résultats obtenus ont permis la mise au point technique des expériences, mais ont donné des résultats décevants sur le plan génétique. Les stress de manipulation, et de baisse de salinité ne permettent pas de mettre en évidence des différences entre les groupes, bien que la CO apparaisse logiquement fortement corrélée à la baisse de salinité. Au niveau des stress hypoxiques, certaines différences entre lots ont été décelées, mais se sont avérées difficilement interprétables.

Le stress hypoxique apparaît cependant comme étant le stress le plus facile à mettre en oeuvre et le plus à même de mettre en évidence des différences génétiques si elles existent. Des expériences mettant en jeu cet outil seront donc reconduites d'une part en utilisant des animaux plus jeunes, ce qui permettra de multiplier le nombre d'individus mesurés; d'autre part en soumettant à ce stress d'autres groupes génétiques, en particulier ceux issus de la sélection divergente.

Actions diverses

Structure des populations et morphologie

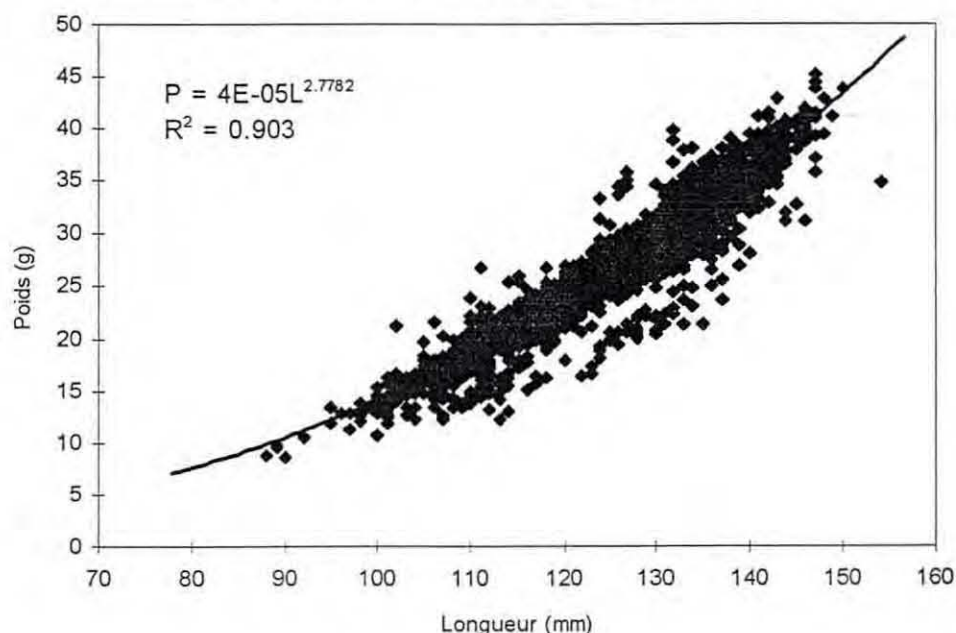
Des mesures de paramètres morphométriques ont été poursuivies sur les populations en élevage, de manière (1) à établir des relations allométriques générales; (2) à rechercher si certaines populations ou groupes génétiques présentent des caractéristiques particulières permettant notamment de les différencier; (3) et à mettre en évidence un éventuel dimorphisme du à la sélection.

Les paramètres mesurés individuellement ont été les suivants: poids, longueur totale, longueur du céphalothorax, hauteur du sixième segment; et pour certains échantillonnages: largeur du céphalothorax et poids de la queue. Des relations allométriques ont été établies, mais sans que ces relations permettent jusqu'à présent ni de distinguer les populations entre elles, ni de mettre en évidence des différences entre les sexes (cf. figure 4).

En terme de structure de population, et quelle que soit cette dernière, la sex-ratio demeure stable et équilibrée autour de 50/50, et les femelles sont significativement plus grosses que les mâles, de +8% à +16% selon les populations échantillonnées. Ces mesures ont notamment permis d'établir la structure des populations dans l'optique des tris liés à la taille, et de déterminer de manière suffisamment précise les limites de troncatures.

L'exploitation de ces données morphométriques est en cours.

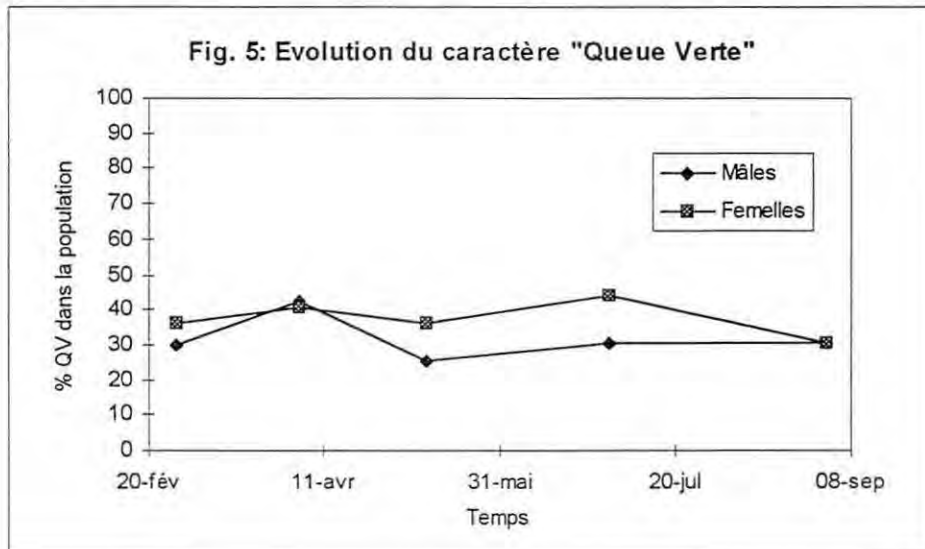
Fig.4: Relation allométrique Poids - Longueur



Déterminisme de coloration

Les individus de *P. stylirostris* présentent généralement des uropodes de couleur bleutée, dont la bordure porte des bandes jaunâtres plus ou moins marquées. La découverte dans la population importée de Nouvelle-Calédonie en 1993 d'individus dont les uropodes sont presque uniformément vert vif, et qui de ce fait sont parfaitement reconnaissables, ont conduit à sélectionner les quelques individus porteurs de ce caractère, et à les reproduire. Les animaux "queue verte" (QV) ne présentant pas de différences de croissance par rapport aux individus "normaux". Le caractère ne semble pas être dépendant du sexe.

Une expérience dans laquelle une proportion connue d'animaux QV avait été mise au départ a conclu à la stabilité dans le temps de ce paramètre (cf figure 5).



Une expérience destinée à vérifier le déterminisme génétique du caractère a été effectuée, mais des mortalités survenues en élevage larvaire ont fait perdre certains croisements. Les résultats partiels montrent cependant que les croisements QVxQV aboutissent à une proportion de post-larves QV largement supérieure (48,5%) à celle obtenue avec des croisements NN entre individus "normaux" (< 5%). Les croisements NNxQV donnent des résultats intermédiaires.

L'hypothèse génétique de ce caractère étant renforcée, les juvéniles produits ont été mis en élevage, et l'étude sera poursuivie. Si un tel caractère de coloration pouvait être effectivement fixé, son utilisation en tant que témoin intra-bassin dans les tests zootechniques permettrait, en l'absence d'autres moyens de marquage des populations, de faire des économies importantes en terme de structures d'élevage, tout en augmentant la précision des estimations.

Fourniture de nauplii et post-larves

Il faut noter la participation active de l'équipe de génétique quantitative à l'approvisionnement en PL de *P. stylirostris* du COP, ainsi qu'aux fournitures de PL et de nauplii pour le projet Aquanova.

Ces dernières, programmées dans les accords passés avec la société mexicaine Aquanova ont interféré, souvent de manière importante, avec les rentrées de reproducteurs destinées aux expérimentations, mais les résultats obtenus au Mexique par Aquanova, et qui sont rappelés brièvement ci-dessous, ont des conséquences importantes pour le programme de sélection.

Dans le contexte mexicain, les tests de comparaison d'élevage entre la SPR43 et la souche de *P. stylirostris* locale ont conclu à une croissance et une survie supérieures de la première, sans que les autres espèces locales (*P. stylirostris* et *P. vannamei*) ne présentent de mortalités supérieures à la normale, une fois en présence de la SPR. Ces premiers résultats d'introduction de la SPR43 dans une zone endémique de l'IHHN confirment les espoirs que les expériences de laboratoire avaient suscités quant au caractère de résistance présenté par la souche.

Commentaires particuliers

La mise en place d'une filière spécifiquement orientée vers la sélection a permis d'acquérir les connaissances nécessaires et de se positionner dans une problématique d'amélioration génétique.

L'objectif d'établir des stocks de géniteurs de *P. stylirostris* permettant des expérimentations tout au long de l'année a été mis à mal, (1) par le manque de bacs de 30 m3 utilisés pour préparer les géniteurs; (2) pour des raisons de bilan pathologique des élevages. Le "flou" existant actuellement quant à la présence ou non de certains indices pathogènes sur certains lots a conduit à l'élimination de certains d'entre eux, ce qui a complètement désorganisé la gestion des stocks.

Si l'intérêt du suivi pathologique des populations apparaît évident, les critères conduisant à l'élimination de tel ou tel stock incriminé doivent être précisés, sous peine de remettre en question certaines des orientations du programme (maintien de certaines lignées, exportations et importations de matériel vivant).

Les expérimentations menées semblent montrer la possible exploitation de phénomènes d'hétérosis par croisements inter lignées. Les premiers résultats de sélection divergente sont en revanche délicats à interpréter. Dans les deux cas cependant, on peut soupçonner une consanguinité relativement importante de la lignée SPR43 du COP. Le recours à des populations extérieures apparaît indispensable.

L'absence de marquage reste un handicap sérieux, qui enlève la possibilité de regrouper les groupes ou fratries au sein d'un environnement commun. L'influence des facteurs environnementaux biaise fortement les résultats dans le cas de la filière crustacés, et il est d'autant plus difficile de s'en affranchir que l'insuffisance des bassins expérimentaux limite les possibilités de replicats.

En prenant comme base le chiffre, déjà cité, de 30 familles biparentales par souche comme un minimum permettant une bonne estimation des paramètres génétiques, c'est autant de bassins qui sont nécessaires pour maintenir séparées ces fratries, en l'absence de marquage, et sans replicat. Avec un marquage autorisant le mélange, un dispositif expérimental correct demanderait de 8 à 12 bassins pour tester les lignées existantes. La seule poursuite des expérimentations en cours nécessiterait 24 bassins en l'absence de marquage.

Rappelons que 12 unités seulement étaient disponibles en 1995, pour l'ensemble des expériences et de la constitution des lots de reproducteurs. Les mises au point techniques ont donc dû s'effectuer "en conditions réelles", c'est-à-dire dans le cadre des expérimentations elles-mêmes.

L'existence de la SPR43, vraisemblablement résultat de la consanguinité de la population, est un atout, tant au niveau de la valorisation, que de la compréhension des phénomènes de résistance. La valorisation de cet atout doit passer par l'estimation de la variabilité, la caractérisation de la résistance, et l'ouverture du pool génétique.

Face aux contraintes que sont :

- l'absence de possibilités de marquage des individus ou des populations ;
- le manque des structures expérimentales nécessaires ;
- la difficulté de l'introduction de nouvelles populations destinées au testage, et au contrôle de la consanguinité.

Les efforts seront axés sur :

1. la mise en place de la structure expérimentale (*constitution et maintien des fratries, estimation de la variabilité et de l'hérabilité des caractères*) ;
2. l'accès à un renforcement de la variabilité génétique (*zones de quarantaine pour importations et/ou croisements in situ*) ;
3. la mise au point des outils aboutissant à la définition des critères de sélection (*tests diagnostiques, infections expérimentales, critères basés sur des réactions de résistance ou de défense*) ;
4. le renforcement et l'optimisation de la zootechnie afin de préserver au maximum la souche SPR43 existante, ainsi que les lignées à venir (*optimisation de la zootechnie, doublement des sites de maintien, contrôle de nouvelles importations*).

La mise au point des marqueurs génétiques (*identification de populations mélangées, recherche de généalogie, estimation d'hérabilités, caractérisation de populations*) apparaît également prioritaire si l'on veut s'affranchir des contraintes de structures et d'environnement. Cette action est actuellement sous-traitée au laboratoire de F. Bonhomme (Université de Montpellier 2), dans le cadre de l'URM 16. Il est important de pousser ce laboratoire à obtenir rapidement des résultats sur ce sujet.

Rappel des objectifs

Le programme cryoconservation a été redéfini et individualisé. Cette année a été l'année effective de la réouverture du laboratoire, et la dernière année de formation du responsable en métropole.

L'objectif du programme proprement dit n'a pas changé : il s'agit de mettre en place des techniques permettant la cryoconservation des produits sexuels et des embryons de crustacés en collaboration avec l'UNCEIA/SELIA, Maisons-Alfort, FRANCE.

Travaux réalisés - Principaux résultats 1995

L'année 95 a été principalement consacrée au démarrage des essais expérimentaux sur le sperme.

Rappel du personnel repositionné sur ce programme :

- **Jean GOGUENHEIM**, responsable, en formation de reconversion, au travers de stages à l'UNCEIA/SELIA, avec P. DUMONT (50% du temps 94 en cryoconservation, 30% en zootechnie)

- **Louise MOU** (40% du temps 94 en cryoconservation - 20 % du temps en pathologie, 40% en zootechnie), cette année en fin de reformation zootechnie (maturation) et en formation pathologie (Bactériologie et histologie).

- **Peva LEVY** (20% du temps 94 en cryoconservation, le reste en pathologie et zootechnie).

Les travaux de refonte du laboratoire avaient pris du retard et se sont terminés en début d'année 1995. Les expérimentations ont donc repris courant premier trimestre 1995.

Cette année, seuls les travaux sur le sperme ont pu être abordés, après une période (mars - avril) de démarrage de tests et de réglage des différents matériels du labo (**Cryostat azote MINICOOL**, et cryostat alcool **HUBER -75**).

Les premiers essais 95 sur *P. vannamei* ont donné quelques résultats préliminaires intéressants, et quelques nauplii ont été obtenues après congélation du sperme dans l'azote et fécondation de femelles : mais les stocks de reproducteurs étant de qualité plus que moyenne, et le sperme de qualité insuffisante pour envisager des congélations fiables, on a donc été amené pour gagner du temps à relancer la procédure complète de congélation centrée sur le

protocole testé en 1991, en couplant les travaux sur les deux espèces à thélycum ouverts utilisées sur le centre : *P. vannamei* et *P. stylirostris*.

Il faut donc insister ici que, pour envisager sérieusement une congélation du sperme, un état qualitatif minimum du sperme est nécessaire : probablement du sperme avec plus de 70 à 80% de spermatozoïdes spikés.

En parallèle, avec la stagiaire A. JADAUD, des essais de suivi des mâles et de contrôle de leur qualité ont été menés :

- Vérification des différences entre les demi-spermatophores gauches et droites, dans les conditions d'élevage du COP :

Ces vérifications ont confirmé la plus grande quantité de spermatozoïdes dans le demi-spermatophore gauche).

De même, absence de différence qualitative entre les demi-spermatophores gauche et droit.

Mais la variabilité des résultats ne permet pas d'envisager une sélection du spermatophore gauche pour utilisation en production : les deux demi-spermatophores restent donc à utiliser en production, le droit restant valable.

- Vérification de l'amélioration de la qualité du sperme après épédonculation des mâles : plus de spermatozoïdes, et de meilleure qualité.

Evolution du nombre de spermatozoïdes dans le temps (mâles épédonculés et non-épédonculés).

DATE	Epédonculé		Non Epédonculé	
	GAUCHE	DROIT	GAUCHE	DROIT
5	19.6	13.4	6.5	2.7
10	22.4	14.5	11.6	5.1
15	27.7	18.0	16.6	8.1
20	27.4	17.1	14.4	6.7
25	26.4	15.8	9.6	3.3

Figure n°14 du rapport JADAUD : Tableau sur les comptages de spermatozoïdes (spermatophore gauche et droit) pour les mâles épédonculés et non-épédonculés de *P. vannamei* (en millions) date depuis la déspermatation en jours

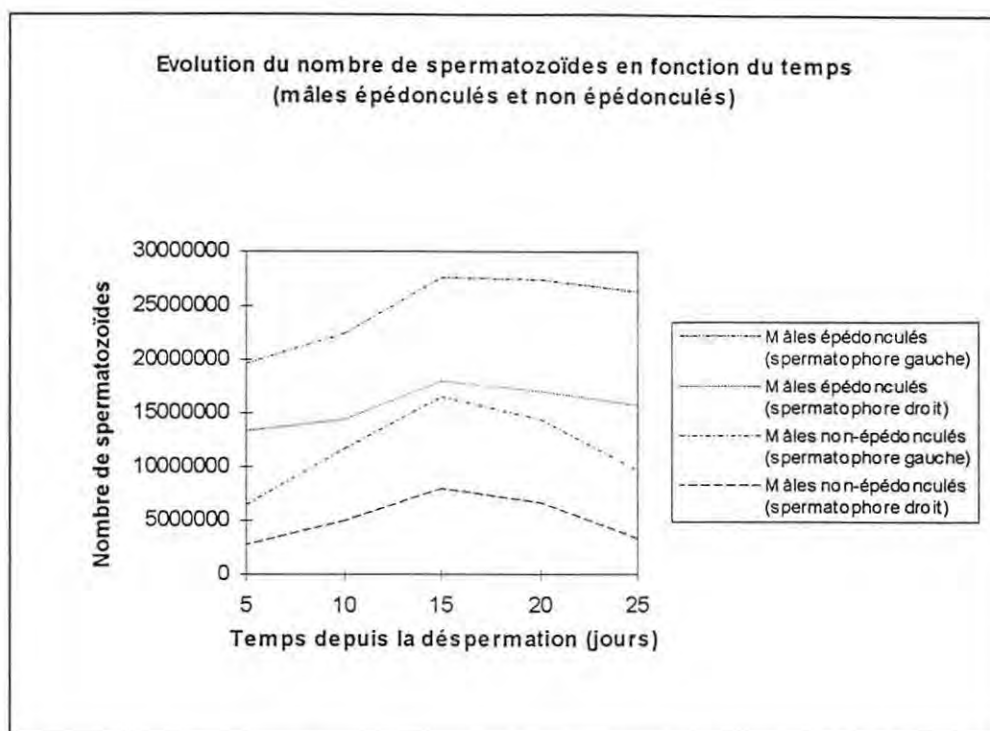


Figure n°15 du rapport JADAUD : Représentation graphique des données de la figure n°17.

Plusieurs résultats ressortent nettement des figures n°14 et 15 :

- La quantité de spermatozoïdes est plus importante dans les spermatophores (gauche et droit) des mâles épédonculés que dans ceux des mâles non-épédonculés.
- Quant à l'évolution de la quantité des spermatozoïdes dans le spermatophore:

Pour les mâles épédonculés : Sur la courbe du graphique ci-dessus, on peut observer un plateau élevé entre 15 et 25 jours. Ce plateau montre la période pendant laquelle la quantité de spermatozoïdes est la plus importante dans le spermatophore.

- Ainsi, de 15 à 25 jours le spermatophore contient un maximum de spermatozoïdes.
- 25 jours est la date maximale d'utilisation, après cette date, le nombre de spermatozoïdes décroît. Cependant, le sperme peut encore être utilisé pour les fécondations : les taux seront moins bons mais toujours satisfaisants jusqu'à un peu moins de 30 jours date après laquelle il est inutile de poursuivre les fécondations avec ce sperme (qualité moindre du sperme).

Pour les mâles non-épédonculés : Sur le graphique, un pic est observé à ± 15 jours (ce pic correspond au nombre maximum de spermatozoïdes observés depuis la déspermeation).

- Vers 15 jours, après la déspermeation, les spermatozoïdes sont nombreux. A la différence des mâles épédonculés, cette abondance de spermatozoïdes ne reste pas constante et décroît très vite à partir de cette date. La date maximale d'utilisation du sperme pour les fécondations se situe donc vers 20 jours.

En définitive, les mâles épédonculés contiennent quantitativement beaucoup plus de spermatozoïdes que les mâles non-épédonculés.

Résultats des inséminations artificielles (*P. vannamei*)

Les données sont d'abord étudiées graphiquement. L'analyse graphique permet de formuler des hypothèses. Celles-ci seront ensuite testées statistiquement.

Analyse graphique :

Les histogrammes ci-dessous montrent, dans le temps, la différence de qualité du sperme entre mâles épédonculés et non-épédonculés par le biais des résultats de fécondation et d'éclosion.

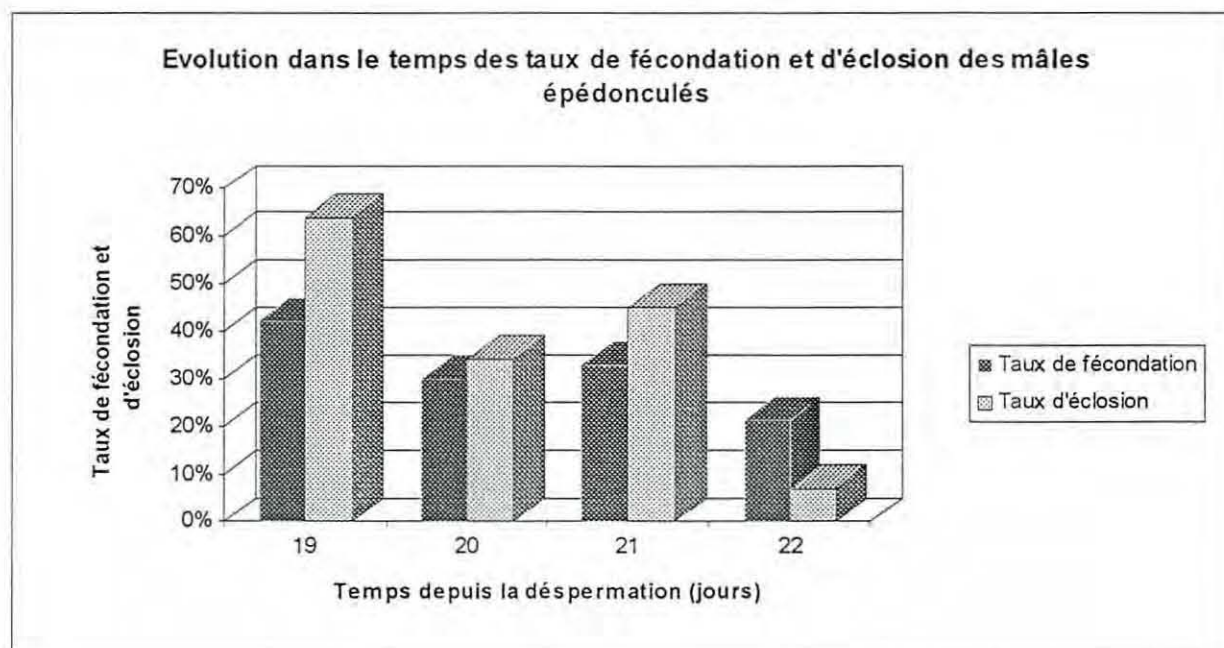


Figure n°19-a. du rapport JADAUD

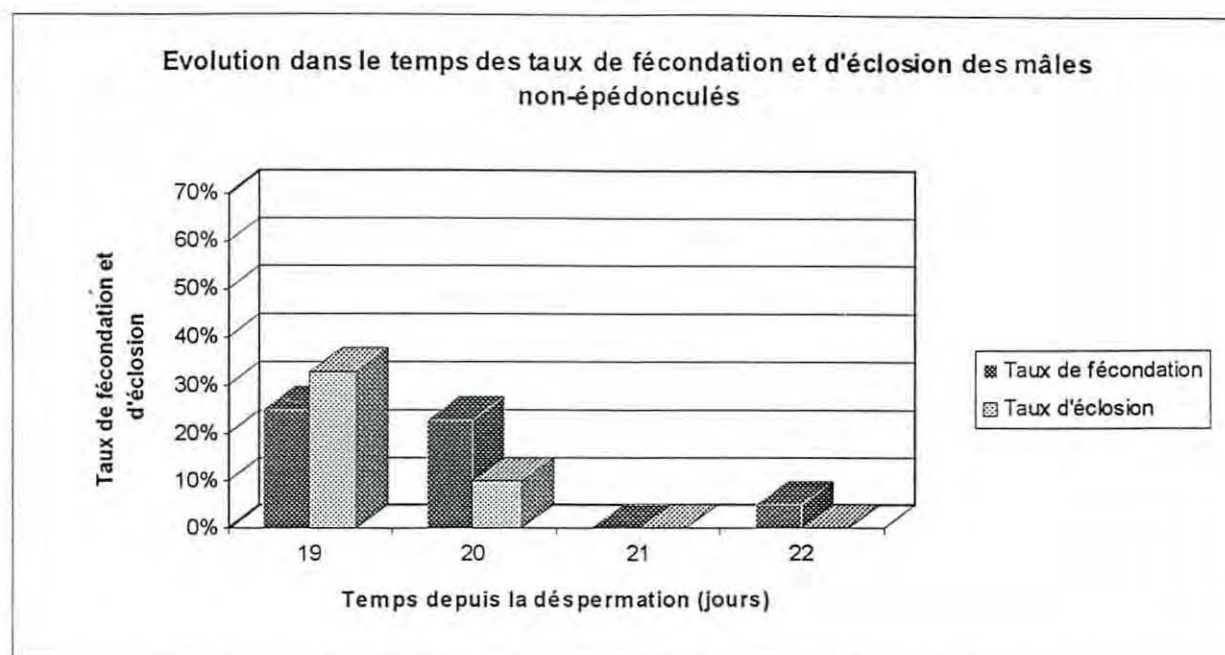


Figure n°19-b. du rapport JADAUD : Histogrammes sur l'évolution dans le temps des taux de fécondation et d'éclosion de mâles épédonculés (figure n°19-a) et non-épédonculés (figure n°19-b).

Temps (jours)	Mâles épédonculés		Mâles non-épédonculés	
	Tx fécondation	Tx d'éclosion	Tx fécondation	Tx d'éclosion
19	42%	64%	25%	33%
20	30%	34%	23%	10%
21	33%	45%	0%	0%
22	21%	7%	5%	0%

Figure n°20 du rapport JADAUD : Tableau de données sur les taux de fécondation et d'éclosion des mâles épédonculés et non-épédonculés (depuis la déspermatation).

La comparaison directe des taux de fécondation et d'éclosion entre des mâles épédonculés et non-épédonculés permet de formuler deux hypothèses :

- Les taux de fécondation et d'éclosion obtenus à partir des mâles épédonculés seraient toujours plus importants que ceux obtenus à partir des mâles non-épédonculés pour des dates comprises entre 19 et 22 jours après l'épédonculation (déspermatation).

Ces résultats correspondent bien aux résultats des comptages (figure n°14 et 15), à savoir, pour les mâles épédonculés, une quantité maximale de spermatozoïdes atteinte vers +15 jours après la déspermatation et conservée jusqu'à +25 jours. Pour les mâles non-épédonculés, le pic de spermatozoïdes est à +15 jours, mais il décroît très vite à partir de ce moment.

- Par ailleurs, ces histogrammes montrent un pouvoir fécondant durable en faveur des mâles épédonculés alors que les taux de fécondation des mâles non-épédonculés diminuent très vite.

En conclusion, des mâles épédonculés présentent de meilleurs taux de fécondation et d'éclosion que des mâles non-épédonculés.

Cependant il reste encore beaucoup à faire pour obtenir des mâles et donc des spermatozoïdes d'un haut niveau qualitatif, suffisant pour envisager une congélation fiable.

Au niveau congélation, il ressort des résultats 1995 :

- que le milieu utilisé en congélation ne laisse pas apparaître de toxicité visible notamment chez *P. stylirostris*

Test de toxicité du milieu de conservation :

P. stylirostris

Mâles	Tx fécondation	Tx d'éclosion
1	17%	20%
2	15%	60%
3	53%	72%
4	20%	60%

Figure n°23 du rapport JADAUD : Tableau des résultats de fécondation et d'éclosion après effet du cryoprotecteur (à température ambiante) sur le sperme de *P. stylirostris*.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que le milieu de conservation n'exprime pas de toxicité après 30 minutes pour les spermatozoïdes. En effet, les résultats de fécondation et d'éclosion obtenus à partir du sperme placé dans le cryoprotecteur sont bons.

Le sperme ne semble pas avoir été détérioré par le contact avec le cryoprotecteur puisque les taux d'éclosion observés sont corrects.

Par ailleurs, le sperme garde son pouvoir collant même après avoir été immergé dans le cryoprotecteur. Ce phénomène s'observe au moment de la fécondation. En effet, le sperme adhère très bien au thélycum de la femelle.

P. vannamei

Mâles	Tx fécondation	Tx d'éclosion
1	10%	45%
2	15%	70%
3	30%	60%

Figure n°24 du rapport JADAUD : Tableau des résultats de fécondations et d'éclosions après effet du cryoprotecteur (à température ambiante) sur le sperme de *P. vannamei*.

Le même milieu de conservation (glycérol-saccharose) est utilisé sur *P. vannamei*. Ce milieu n'exprime pas de toxicité pour les spermatozoïdes. En effet, les taux de fécondation sont révélateurs d'un bon pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

- que le protocole de descente en température est satisfaisant et que des résultats corrects sont obtenus jusqu'au plateau faisant suite à la cristallisation (-15°C) notamment chez *P. stylirostris*

Influence des différents protocoles de refroidissement sur le pouvoir fécondant du sperme

P. stylirostris

Expérience de cryoconservation à -15°C :

	Tx de fécondation	Tx d'éclosion
Descente à -15°C	7%	30%
	15%	60%
	15%	80%
	20%	70%

Figure n°25 du rapport JADAUD : Résultats des fécondations avec le sperme de *P. stylirostris* cryoconservé à -15°C

Le sperme issu des descentes à -15°C n'a pas été dénaturé puisque les fécondations réalisées à partir de ce sperme ont été fructueuses. En effet, les taux de fécondation obtenus à partir de ce sperme sont satisfaisants et les taux d'éclosion jusqu'à 80% révèlent un sperme de bonne qualité. En fait le développement de l'oeuf est normal et il aboutit à l'éclosion. L'obtention de taux d'éclosion aussi importants montre que la congélation n'a pas détérioré les spermatozoïdes. Par ailleurs, les observations microscopiques confirment que le sperme est en bon état.

P. vannamei

Expérience de cryoconservation à -15°C :

Mâles	Tx de fécondation	Tx d'éclosion
1	10%	50%
2	5%	30%
3	20%	65%

Figure n°30 du rapport JADAUD : Résultats des fécondations avec le sperme de *P. vannamei* cryoconservé à -15°C

Le sperme a été observé au microscope. Les spermatozoïdes observés sont soit bien arrondis et avec un spike, soit déformés avec un spike, soit déformés sans spike. Le nombre de spermatozoïdes non dénaturés (ronds et arrondis) est assez important après cette descente puisque les taux de fécondation et d'éclosion obtenus à partir de ce sperme sont satisfaisants.

- qu'ensuite les résultats sont moins bons et dégressifs : ces résultats devraient être sensiblement améliorés avec du sperme de meilleure qualité

Expérience à -25°C :

	Tx de fécondation	Tx d'éclosion
Descente à -25°C	2%	60%
	2%	80%
	3%	90%
	10%	90%

Figure n°27 du rapport JADAUD : Résultats des fécondations avec le sperme de *P. stylirostris* cryoconservé à -25°C

Le sperme cryoconservé est observé au microscope. Beaucoup de spermatozoïdes ont gardé une forme bien arrondie et portent toujours un spike. Cependant, il y a davantage de spermatozoïdes déformés ou éclatés après la descente à -25°C qu'après la descente à -15°C.

Les femelles sont fécondées à partir de ce sperme cf tableau, les taux de fécondation vont de 2 à 10 % et les taux d'éclosion de 60 à 90 %. Ainsi, le sperme fécondant reste de bonne qualité puisqu'il permet d'obtenir des larves.

Expérience à -45°C :

Les résultats satisfaisants, obtenus pour le sperme congelé à -25°C, ont permis d'effectuer une descente à -45°C. Une observation microscopique a montré un grand nombre de spermatozoïdes éclatés et une partie infime de spermatozoïdes spikés et ronds.

Les fécondations réalisées à partir de ce sperme ont donné des résultats nuls. Le nombre de spermatozoïdes non dénaturés étant infime par rapport au nombre de spermatozoïdes éclatés.

- Il a été constaté aussi, que, comme chez d'autres espèces animales, la congélation apportait une forme de sélection des spermatozoïdes, et permettait d'obtenir un meilleur taux d'éclosion par rapport aux oeufs fécondés.

Ces résultats ont été obtenus en définitive essentiellement sur *P. stylirostris*, les stocks de *P. vannamei* étant de moins bonne qualité que les stocks de *P. stylirostris* en fin d'année.

- En parallèle, les courbes de descente utilisées avec le cryostat azote ont été étudiées et transposées en partie au cryostat à alcool, bien que les vitesses de descente restent plus limitées. Ces essais sont encore en cours, et devraient permettre de limiter l'utilisation de l'azote dans les phases expérimentales des protocoles.

Objectifs pour l'année 1996

L'année 1996 devrait voir les résultats se clarifier :

Conservation du sperme des pénéides

Les expériences sur *P. stylirostris* devraient raisonnablement aboutir : il faudra alors reprendre expérimentalement le protocole et le fiabiliser, pour améliorer les résultats obtenus, ce qui ne se fera qu'en améliorant sérieusement la qualité des mâles utilisés (température contrôlée, despermation, épédonculation, alimentation), et donc obtenir un stockage de sperme avec des tests d'utilisation en production et dans le temps (96-98). Il faudra alors envisager une première unité expérimentale de stockage sous azote et permanente (cuves de stockage azote pour cryotubes conservés en boîtes, et système de contrôle des niveaux d'azote).

Dans une deuxième phase, continuer le transfert de la technique aux autres espèces de pénéides, notamment *P. monodon* (97-98).

Parallèlement, des tests sur le sperme seront poursuivis, pour tenter de mettre en place un ou des tests fiables permettant de connaître l'état qualitatif du sperme des géniteurs avant utilisation en maturation (96-98).

Conservation des embryons de pénéides

Dans une première phase, *début 96*, relancer les expériences sur *P. indicus* pour atteindre le niveau de 1991 (descente à -6°C et cristallisation), et ensuite mettre en place des protocoles expérimentaux pour aller jusqu'à la congélation d'embryons (96-98).

Très rapidement (*fin 96*), reprendre le protocole à la base pour améliorer les différentes phases de descente de température grâce au congélateur à alcool acquis en fin d'année 1994 qui permet des vitesses de descente plus rapide qu'avec l'ancien variostat à alcool (passage de 1°C/mn à 2°C/mn) (97-99).

Ensuite, améliorer et fiabiliser le protocole pour une utilisation à un niveau de production. (98-00).

Enfin, reprendre le protocole expérimental établi sur *P. indicus* pour tenter le transfert aux autres espèces, notamment chez *P. stylirostris* et *P. monodon*. (1997-2000).

Collaborations et incitations nationales

La collaboration avec P. DUMONT, l'UNCEIA, à MAISONS-ALFORT a été reconduite en 95, mais ne le sera pas en 96.

PROGRAMME HUITRE PERLIERE

Objectifs et contexte

L'objectif global du programme huître perlière au COP est de contribuer à fournir les connaissances indispensables à une meilleure gestion de la perliculture en général. Dans ce cadre, les méthodes et modèles appliqués en métropole pour la gestion de la conchyliculture sont transposés à l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. La détermination du stock optimum de nacres à mettre en élevage dans un site donné reste la problématique de base des travaux de l'unité. La résolution de cette question passe par une bonne connaissance des lois qui régissent la physiologie de l'huître et l'essentiel des travaux de l'unité ont été consacrés à ce thème. Si les études au laboratoire restent indispensables dans une première approche, l'objectif est d'arriver à l'établissement de ces lois *in situ*. Aussi, un effort important est-il consacré à l'instrumentation avec intervention sur le terrain et automatisation des mesures. Ce thème instrumentation a suscité une réflexion commune avec le département de la DITI pour mettre en chantier un prototype d'appareil intégré permettant l'étude de la physiologie des bivalves : c'est le projet AMPHYBI.

Le travail sur l'huître perlière est fait dans le cadre du PGRN, Programme Général de Recherche sur la Nacre. Ce programme, coordonné par l'EVAAM, fait intervenir plusieurs organismes, principalement l'ORSTOM, l'UFP, l'EPHE. L'année 1995 a constitué une année charnière avec la fin de la première phase du PGRN et la mise en place de la seconde phase de ce programme. Un séminaire PGRN réunissant scientifiques et perliculteurs a eu lieu en début d'année pour faire le bilan de la première phase et dégager les orientations de la deuxième phase. Au cours de cette réunion et suite à une enquête réalisée auprès des perliculteurs, les travaux sur l'état des lagons, leur surcharge éventuelle en nacres ainsi que leur surveillance du point de vue zoosanitaire ont été placées parmi les thèmes jugés prioritaires. Dans la mesure où les travaux du COP s'inscrivent bien dans ces thèmes et où l'IFREMER consacre un personnel important à ce programme (3 chercheurs, 4 techniciens, 1 Vat et 1 thésard), l'IFREMER a joué un rôle important dans la définition de la phase 2 du PGRN. La participation du COP à cette nouvelle phase de recherche s'avère donc substantielle avec en particulier une thèse programmée sur la modélisation de la croissance des huîtres perlières.

Synthèse des résultats des travaux du COP

La synthèse de ces travaux est présentée dans les conclusions des rapports finaux de recherche.

Action de recherche N° 8 : Ecophysiologie de l'huître perlière

Comme stipulé dans le cadre de cette convention, un important travail de conception d'outils de mesure des fonctions physiologiques de la nacre a été accompli. Il a permis la mise au point des techniques de mesure de la respiration et de la filtration des huîtres perlières *Pinctada margaritifera*, utilisables aussi bien au laboratoire que *in situ*. L'informatisation du traitement du signal marque un progrès notable par rapport aux techniques classiques. Un complément non prévu au départ a été apporté avec l'étude de l'activité valvaire. Cependant la disponibilité tardive (juillet 1994) et partielle des équipements a restreint le nombre et le champ

des expérimentations. Si des améliorations sont encore à réaliser, on peut considérer que ces outils et l'expérience acquise constituent une bonne base d'étude.

Les travaux ont été menés en parallèle au laboratoire et *in situ* à Takapoto. Les résultats obtenus *in situ* apparaissent en effet primordiaux pour la modélisation effective de la croissance. Cependant, l'approche laboratoire est indispensable, d'une part, pour la mise au point et, d'autre part, pour tester l'influence de paramètres définis en milieu contrôlé.

Les études au laboratoire se sont révélées difficiles du fait de problèmes liés au conditionnement des animaux : condition physiologique, maturation et pontes. Les tentatives d'établissement des relations liant la respiration et la filtration au poids sec des huîtres ont été ainsi perturbées. Cependant, des résultats intéressants ont pu être obtenus : définition des niveaux de consommation d'oxygène en fonction de la nourriture disponible, adaptation de la filtration en fonction de la concentration en microalgues cultivées.

Le travail *in situ* qui apparaissait le plus difficile à mettre en oeuvre a donné en définitive les résultats les plus satisfaisants. La relation d'allométrie consommation d'oxygène poids sec établie à Takapoto est de la forme $Y = 0.8.W^{0.67}$. L'exposant d'allométrie de 0,67 est très proche de la valeur moyenne de 0,7 citée dans la littérature pour les bivalves. Le coefficient a de 0,8 place l'huître perlière parmi les bivalves ayant un métabolisme élevé. La valeur moyenne pour les bivalves suspensivores et dépositivores se situe en effet à 0.50 ± 0.49 (BAYNE et NEWELL, 1983).

La relation d'allométrie filtration poids sec obtenue à Takapoto par la technique de fluorimétrie associée aux algues cultivées est de la forme $Y = 8.03.W^{0.96}$. La valeur du coefficient a est élevée, traduisant un fort taux de filtration. La quasi isométrie trouvée pour le coefficient b constitue une anomalie par rapport à la norme chez les bivalves. Les données de la littérature situent ce coefficient entre 0.66 et 0.82 en conditions expérimentales (WINTER 1978), et 0.44 dans le milieu naturel (BAYNE et NEWELL 1983).

Des résultats ponctuels de mesure au cytofluorimètre avec les micro-algues du milieu naturel comme traceur confirment ces fortes valeurs de filtration.

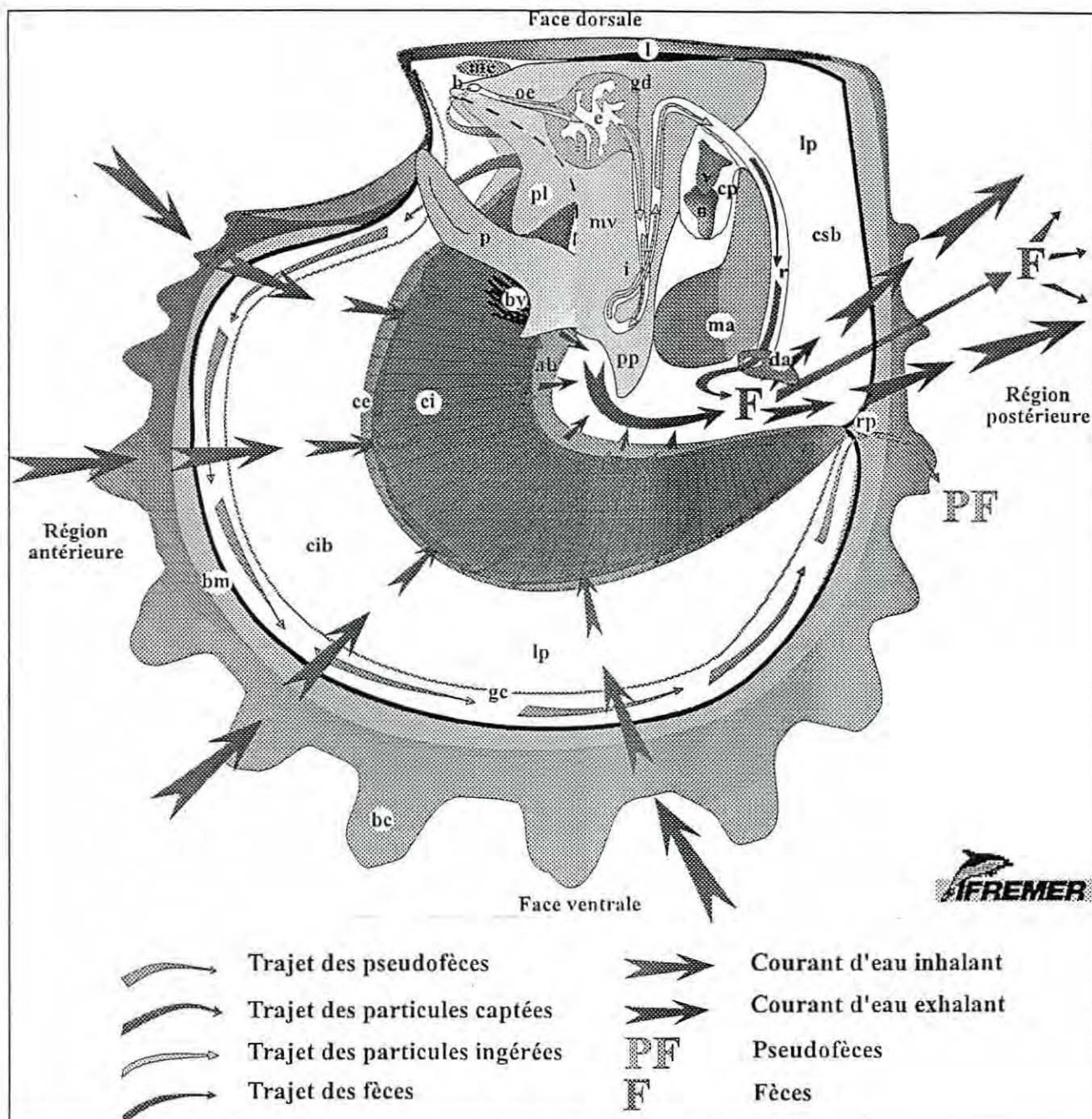
La relation d'allométrie obtenue par la technique de récupération des biodépôts à Takapoto est de la forme $Y = 33.5.W^{0.28}$. Elle donne des taux de filtration très forts, spécialement chez les jeunes individus, très différents des résultats de la littérature. Le coefficient a de 33,5 paraît extrêmement élevé et ces premiers résultats doivent être considérés avec précautions. Une confirmation est nécessaire.

Les suivis de l'activité valvaire ont montré un rythme nyctéméral d'ouverture : les valves sont plus ouvertes la nuit que le jour. Le comportement apparaît plus perturbé le jour avec des mouvements valvaires plus amples et plus fréquents. Les mesures de respiration et de filtration de jour et de nuit ont été comparées : aucune différence statistique n'a été mise en évidence, hormis par la méthode des biodépôts qui montre une filtration plus importante le jour. L'étude des cycles de filtration et de respiration, sur des périodes de plus de 24 heures est indispensable pour mieux comprendre les rythmes biologiques de *Pinctada margaritifera*.

Ces résultats permettent de répondre aux interrogations concernant l'équilibre du bilan énergétique de la nacre à Takapoto. Les premiers essais de bilan effectués tablaient sur la rétention du seul matériel particulaire supérieur à $1.3\mu m$ et une filtration d'environ $4l/h/g$ (BUESTEL et POUVREAU, 1994). Ils montraient que l'équation du bilan était largement

déséquilibrée dans ces conditions. Les forts taux de filtration trouvés *in situ* suffisent à rétablir ce bilan. Il s'avère donc que les huîtres perlières compensent l'oligotrophie du milieu par un fort taux de filtration. Conjugué à la disponibilité permanente de nourriture (absence de phénomène saisonnier), cette puissance de filtration expliquerait bien les fortes croissances observées.

Les études de la nutrition de la nacre décrites dans le rapport nutrition du PGRN (rétention particulaire, bactérienne et absorption du dissous) complètent ces données. L'ensemble de ces résultats demande à être complété et affiné. Ce sera l'objet du travail proposé dans le cadre de la deuxième phase du PGRN qui devrait aboutir à l'établissement d'un modèle de croissance de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*.



Légende (la partie gauche de l'animal a été enlevée)

ab : axe branchial ; b : bouche ; bc : barbe de croissance ; bm : bords du manteau ; by : byssus ; ce : cténidie externe (droite) ; ci : cténidie interne (droite) ; cib : chambre infrabranche ; ca : cavité péricardique ; csb : chambre suprabranche ; da : diverticule anal ; e : estomac ; gc : gouttière ciliée ; gd : glande digestive ; i : intestin ; l : ligament ; lp : lobe palléal (droit) ; ma : muscle adducteur ; me : muscle éleveur antérieur du pied ; mv : masse viscérale ; o : oreillette ; oe : oesophage ; p : pied ; pl : palpes labiaux (droits) ; pp : poche perlière ; rp : repli palléal ; v : ventricule.

Modalité de la nutrition chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*

Action de recherche N° 19 : Nutrition de l'huître perlière

La fiche-programme N°19 du Programme Général de Recherche sur la Nacre avait pour objectif l'étude de la nutrition des huîtres perlières *Pinctada margaritifera*. Cette étude était divisée en quatre thèmes :

- **Thème 1** : Evaluation de la capacité de rétention par les nacles du phytoplancton et autres particules du seston présentes dans le milieu.
- **Thème 2** : Estimation de la capacité de rétention des bactéries par les nacles.
- **Thème 3** : Estimation de la capacité de rétention de la matière organique dissoute par les nacles.
- **Thème 4** : Test d'un régime alimentaire à base d'algues cultivées pour le maintien en bassin des huîtres perlières.

La détermination de la rétention des particules par les huîtres perlières a fait appel à diverses techniques pour couvrir tout le spectre de taille des particules susceptibles d'être retenues. Une analyse détaillée des contenus stomacaux a montré que *Pinctada margaritifera* peut ingérer des particules dont la longueur peut atteindre 180 μm . Ces dernières sont constituées essentiellement de fragments de spicules et de crustacés. Les modèles élaborés à partir des comptages au microscope optique montrent que l'optimum de rétention se situe entre 5 et 40 μm .

La mesure par un coulter counter de la filtration avec une suspension de particules de taille comprise entre 2 μm et 16 μm montre une rétention quasi constante de 3 à 16 μm , mais qui diminue au-dessous de 3 μm . Le seuil de rétention serait compris entre 1 et 2 μm mais ces petites particules semblent difficilement retenues.

La rétention des bactéries (environ 1 μm pour la plupart) a été mesurée par la mesure de l'éclaircissement par les nacles d'une suspension de bactéries marquées. Cette rétention très faible (38 fois moins que l'algue *Isochrysis*) montre que les bactéries sont peu ou pas retenues. La rétention des cyanobactéries (*Synechococcus*) mesurée par un cytomètre de flux dans le milieu naturel à Takapoto est quasi nulle par rapport à celle des microalgues. Leur taille, 0,8 à 1 μm , est donc inférieure au seuil de rétention.

Si l'on fait abstraction d'une sélection des particules en fonction de leur nature qui reste à préciser, il ressort de l'étude de la rétention que seul le matériel particulaire de taille supérieure à environ 2 μm peut être ingéré. Contrairement à certaines hypothèses, les nacles n'ont donc pas développé d'aptitude particulière à retenir les très petites particules. Les branchies des nacles ne possèdent de cils latéraux frontaux (BERNARD, 1994). Or les autres bivalves dans ce cas, tels que *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica*, ont un seuil de rétention plus élevé que ceux dont les branchies sont équipées de ces cils latéraux frontaux (JORGENSEN, 1990). L'inaptitude des nacles à retenir les petites particules serait liée à ce caractère anatomique.

La somme des protéines, lipides et glucides convertie en énergie est considérée comme un bon indice global de la totalité de la nourriture assimilable par les mollusques (WIDOWS *et al.*, 1979). La mesure des PLG a été effectuée au cours d'un cycle annuel à Takapoto (BUESTEL et POUVREAU, 1994) avec des filtres GFC. Ces derniers retiennent les particules de

taille supérieure à 1,3 μm . Les valeurs des PLG converties en énergie sont donc bien représentatives de la nourriture des nacres. L'énergie apportée par les PLG est de 2,06 j/l en moyenne annuelle. Sur ce total, la part apportée par le phytoplancton, calculée d'après la chlorophylle, est d'environ 60%. Si les détritiques et le zooplancton contribuent à la nutrition de l'huître perlière, ce n'est donc que secondairement par rapport au phytoplancton.

L'énergie disponible dans ce milieu est faible mais constante sur toute l'année. Elle doit être rapprochée des très fortes valeurs de filtration trouvées chez *Pinctada margaritifera* (ROBERT et al., 1995) qui permettraient d'équilibrer le bilan énergétique.

Le manque de précision dans la détermination de la rétention entre 1 et 3 μm ne nous permet pas d'évaluer la participation de cette classe de taille à la ration alimentaire de l'huître. Cependant, les modèles donnent pour les particules de 2 à 3 μm une filtration égale à la moitié environ de celle obtenue pour les particules de tailles supérieures. Compte-tenu de l'abondance du carbone dans la classe 1-3 μm (le phytoplancton appartenant à cette classe de taille représente 32% du carbone du phytoplancton total soit 5,72 mgC/m³), une filtration même relativement faible apporte un complément alimentaire appréciable. A ce carbone d'origine phytoplanctonique, il faut ajouter les grosses bactéries, présentes en grande quantité en saison des pluies (DUFOUR et al., 1994). Pour préciser ce point, des modèles plus précis sont à établir avec un matériel adapté.

La matière organique dissoute qui pourrait fournir 25 fois plus d'énergie que le particulaire dans un lagon tel que Takapoto (BUESTEL et POUVREAU, 1994), ne satisfait qu'une infime partie des besoins énergétiques quantitatifs de l'huître perlière.

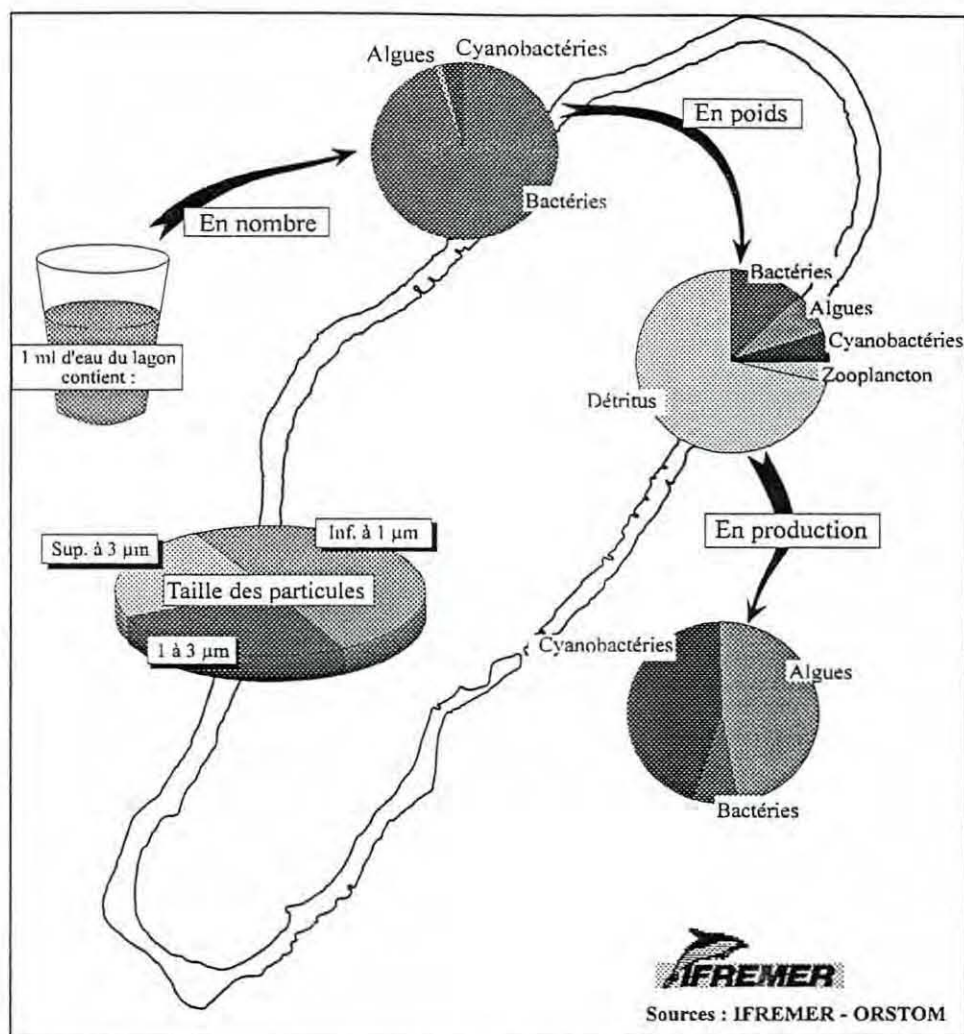
Le conditionnement en laboratoire a pu être réalisé en utilisant des cultures monospécifiques d'*Isochrysis aff galbana*. Le rôle des particules minérales dans les processus de digestion reste à définir. En laboratoire, la durée du transit intestinal est proche de trois heures pour un bol alimentaire constitué de phytoplancton.

Pour résumer, le spectre de rétention de *Pinctada margaritifera* est large entre environ 2 et 180 μm . Il lui permet d'ingérer une grande partie du phytoplancton et les grosses bactéries. Il ne lui donne pas accès aux compartiments qui constitueraient une grande source d'approvisionnement en carbone : celui des cyanobactéries et des bactéries de petite taille.

Ces résultats sont à rapprocher des caractéristiques du lagon de Takapoto synthétisées dans la figure suivante qui montre les parts relatives des divers compartiments du particulaire dans le lagon de Takapoto.

Les bactéries qui constituent la plus grande partie de la matière organique particulaire présente dans les lagons (DUFOUR et al., 1994) contribuent faiblement à la ration alimentaire des huîtres (5 à 10%). Si des détritiques et du zooplancton peuvent faire partie du régime alimentaire de l'huître perlière, ils ne constituent qu'un apport secondaire qui doit être précisé. Les microalgues du phytoplancton, de taille supérieure à 2 μm , fournissent la plus importante source de carbone aux huîtres perlières.

Ces conclusions valident les méthodes employées dans l'étude du milieu à Takapoto (Fiche-Programme n°7 : Croissance milieu). L'utilisation de filtres GFC qui ne retiennent que les particules supérieures à 1,3 μm est bien adaptée à l'étude des potentialités nutritives du milieu vis-à-vis des huîtres.



Part relative des divers compartiments du particulaire
dans le lagon de Takapoto.

L'ensemble de ces résultats a permis de définir la nourriture accessible aux nacres. La connaissance de la production phytoplanctonique et des besoins énergétiques des huîtres permettra d'évaluer, à terme, la capacité trophique des lagons vis-à-vis de l'huître perlière.

Préparation de la deuxième phase du PGRN

Pour répondre à la demande des perliculteurs, deux groupes de travail ont été constitués, l'un sur la nacre animé par l'IFREMER et l'autre sur le milieu animé par l'ORSTOM. En réalité les deux groupes ont travaillé ensemble, les sujets apparaissant totalement imbriqués. Les deux approches préconisées dans la conclusion du rapport Croissance - Milieu ont été adoptées :

- Une approche analytique du fonctionnement d'un atoll perlicole avec le prolongement des études sur l'atoll de Takapoto ;
- Une approche globale de l'ensemble des sites de perliculture avec la mise en place d'un réseau de suivi de la perliculture.

Le travail a été réparti en différentes opérations complémentaires en fonction des compétences des différents organismes :

THEME CAPACITE BIOTIQUE

APPROCHE ANALYTIQUE Site : Takapoto	APPROCHE GLOBALE Sites: principaux atolls perlicoles
<p>BESOINS GLOBAUX DES NACRES ET COMPETITEURS :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Régime alimentaire de la nacre</u> EPHE - IFREMER • <u>Modèle de croissance de la nacre</u> IFREMER • <u>Stocks de nacres en élevage</u> IFREMER - UFP -EVAAM • <u>Stocks naturels de nacres</u> EPHE - EVAAM • <u>Ecophysiologie des compétiteurs</u> UFP • <u>Stocks des compétiteurs</u> UFP - IFREMER - EVAAM 	<p>RESEAU DE SUIVI ET DE SURVEILLANCE EVAAM - ORSTOM - IFREMER - SMA</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Suivi croissance et mortalité</u> • <u>Estimation des stocks (élevage)</u> • <u>Suivi pathologique</u> • <u>Suivi milieu (données climatiques et hydrobiologiques)</u> • <u>Caractéristiques hydrodynamiques des atolls retenus pour le réseau</u>
<p>PRODUCTION DE L'ATOLL :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Production primaire</u> ORSTOM • <u>Hydrodynamique</u> ORSTOM 	

THEME PATHOLOGIE

Des actions spécifiques sont prévues avec un financement extérieur au PGRN et la participation de l'EVAAM, l'IFREMER, l'UFP. Ce thème est complété au sein du PGRN par une opération consacrée à l'étude des réactions des nacres aux différents stress subis lors des élevages (EVAAM - IFREMER).

Définition du sujet et début de la thèse de Stéphane POUVREAU

La proposition de sujet de thèse soumise au comité des bourses IFREMER a obtenu un classement très favorable. En définitive le sujet a pu être proposé et accepté également à la commission des bourses du CNRS. La modélisation de la croissance de la nacre suppose, dans un premier temps, une synthèse des différents travaux réalisés pour décrire les lois physiologiques de la nacre. Dans un deuxième temps, un calibrage sera fait à Takapoto avec prise de données simultanées sur le milieu et les performances physiologiques.

**PUBLICATIONS DU LABORATOIRE
AQUACULTURE TROPICALE DU C.O.P.
- 1995 -**

ARTICLES DANS REVUE A COMITE DE LECTURE

- **Cousin M., G. Cuzon and J. Guillaume** (1995). Apparent digestive coefficient of starches from different botanical origin for *P. stylirostris*. *Aquaculture* (sous presse).
- **Cahu C., G. Cuzon and J. Quazuguel** (1995). Egg composition according feeding of breeders. *Comp. Biochem. and Physiol.*, vol. 112A, 417-424.
- **Le Groumellec M., C. Martin, P. Haffner, B. Martin and Aquacop** (1995). Cell culture from tropical shrimps. *J. Aqua. Trop.*, 10 : 227-286.
- **Van Wormhoudt A., D. Sellos, A. Donval, S. Plaire-Goux and G. Le Moullac** (1995). Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Experientia*, 51 : 159-163.
- **Van Wormhoudt A., G. Bourreau and G. Le Moullac** (1995). Amylase polymorphism in *Crustacea Decapoda* : electrophoretic and immunological studies. *Biochem. System Ecology*, 23: 139-149.
- **Morelli M., L. Le Déan, L. Peeters, V. Vonau and A. Diter** (1995). Karyotype of *Penaeus indicus* (Crustacea, Decapoda) established using image analysis system. *Soumis à Marine Biology*.

ARTICLES DANS REVUE SANS COMITE DE LECTURE

□

OUVRAGES OU ARTICLES DE SYNTHESE DANS OUVRAGES

- **Cuzon G. and J. Guillaume** (1995). Protein energy ratio of peneids. In : IWGCN Book on shrimp nutrition. Ed. L. d'Abramo and D. Conklin. *Publication. WAS*.

COMMUNICATIONS POUR COLLOQUE OU GROUPE DE TRAVAIL

- **Cuzon G., J. Guillaume, C. Cahu and J. Patrois** (1995). Some fundamentals in breeders nutrition. *Presentation IIIrd Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Guayaquil, Nov. 1995*.
- **Cuzon G. and Aquacop** (1995). Nutritional disease in larviculture. *Presentation IIIrd Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Guayaquil, Nov. 1995*.

- Crozat Y., J. Patrois et Aquacop (1995). Culture of *Penaeus indicus* embryonic cells. *Présentation sous forme de poster à la WAS 95.*
- Bédier E., J. Patrois, L. Ottogalli, M. Weppe and Aquacop (1995). Development of the *Penaeus stylirostris* Aquacop SPR43 strain : in situ experiments and genetic enhancement. *Présenté à la WAS 96 à Bangkok -Thailande. (submitted)*
- Bédier E., J. Patrois and Aquacop (1995). Genetic enhancement of the *Penaeus stylirostris* Aquacop SPR43 strain. *Préparé pour Second International Conference on the Culture of Penaeid Prawns and Shrimps. (submitted)*

□

ARTICLES DE VULGARISATION

- Buestel D. et S. Pouvreau (1995). La croissance et l'alimentation de l'huître perlière. Application à la gestion rationnelle des élevages d'huîtres perlières. *Document de vulgarisation du PGRN.* 12 pages.

RAPPORTS INTERNES DRV REFERENCES

- Buestel D., S. Pouvreau, J. Tiapari, S. Bougrier, J.M. Chabirand, P. Geairon et A.Fougerouse (1995). Ecophysiologie de l'huître perlière. Approche des relations entre la croissance de l'huître *Pinctada margaritifera* et le milieu dans le lagon de Takapoto, *Rapport RI/DRV 95 - 18. RA/ TAHITI.* 132 pages.

RAPPORTS FINAUX DE CONTRAT (CEE, FAO, CONVENTION)

- Jonquières G., J.M. Amouroux, A. Bennett, J. Blanchot, S. Bougrier, D. Buestel, X.Caisey, B. Delesalle, J.M. Dormoy, P. Dufour, P. Geairon, F. Hautefeuille, P. Loret, J. Pagès, A. Pellan, S. Pouvreau, S. Robert, H. Teissier, J. Tiapari et J.P. Torréton (1995). Etude de la nutrition de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. *Rapport final de la convention de recherche N° 19 du PGRN.* 156 pages.
- Robert S., A. Bennett, F. Bernard, J. Blanchot, S. Bougrier, D. Buestel, X. Caisey, J.C.Cochard, J.M. Dormoy, P. Geairon, G. Jonquières, A. Pellan, S.Pouvreau, J. Prou, G. Remoissenet, V. Stiger, H. Teissier et J. Tiapari (1995). Etude de la respiration et de la filtration de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. *Rapport final de la convention N° 8 du PGRN.* 95 pages.

AUTRES TYPES DE RAPPORTS

Missions à l'étranger et groupes de travail

- Cuzon G. et J. Patrois (1995). WAS à San Diego : Conférence annuelle sur l'Aquaculture. *Rapport de mission*, 15 pp.

- **Cuzon G.** (1995). IWGCN : 5th Conference on shrimp nutrition.
- **Cuzon G.** (1995). Mission de liaison en France. *Rapport de mission*, 15pp.
- **Cuzon G.** (1995). 3ème Conférence sur l'Aquaculture à Guayaquil. *Rapport de mission*, 13pp.

Missions à la mer

□

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

- **Loret P.** (1995). Composition du phytoplancton de Takapoto et régime alimentaire de l'huître perlière *Pinctada margaritifera*. *Mémoire DEA. Université Française du Pacifique*. 35 pages.
- **Chung B.** (1995). Effet de la nourriture sur le métabolisme de la crevette *P. stylirostris* - *Mémoire DEA - Université Française du Pacifique*. 48 pp.
- **Mongodin M..E.** (1995). Conséquences physiologiques d'infection bactérienne expérimentale chez *Penaeus stylirostris*. *Mémoire de IUT Brest Département « Biologie Appliquée » option Génie de l'Environnement*. 27 pp.
- **Heyvang I.** (1995). Evaluation de l'effet des boues de fond de bassin sur la physiologie de *Peaneus stylirostris* en élevage. *Mémoire de maîtrise Sciences et Techniques « Sciences de l'Environnement » - Université de Rouen*. 45 pp.
- **Jadaud A.** (1995). Analyses quantitatives et qualitatives du sperme de *Penaeus stylirostris* et de *Penaeus vannamei* dans le but d'optimiser la gestion des stocks de reproducteurs et pour la cryoconservation des gamètes. *Rapport de stage pour l'obtention du Diplôme de Technicien Supérieur de la Mer INTECHMER-CNAM, Cherbourg*. 64 pp.

Documents de travail de laboratoire

- **Froissard S. et D. Ansquer** (1995). Rapport d'expérimentations sur le diagnostic bactériologique du Syndrome 93. Ce document présente une synthèse détaillée des actions Soutien « Aide au diagnostic du Syndrome 93 » pour la période de Juin à Août 95.
- **Buestel D. et H. Floch** (1995). Fiche descriptive du programme de développement d'instrumentation. Projet AMPHYBI : Appareil de Mesure de la physiologie des Bivalves. 3 pages.

- **Bennett A. et S. Robert** (1995) Compte-rendu de l'expérimentation huître perlière et bactéries. *Rapport interne COP*. 3 pages.
- **Bédier E.** (1995). Programme de sélection génétique des crustacés. Bilan intermédiaire a été rédigé. Ce document fait le point après 3 ans de fonctionnement du programme d'amélioration génétique par sélection.

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

- **Buestel D.** (1995). Perles noires en Polynésie Française. *Recherches marines*. Octobre 1995.

Rapports intermédiaires de contrat ou de convention

- **Anonyme** (1995). PGRN - Seconde phase. Proposition de mise en place d'un réseau d'observation et de suivi biologique des lagons perlicoles de Polynésie Française. 10 pages.

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

Projets de rapport interne DRV ou synthèse sur un sujet

□

THESE

- **Pouvreau S.** (1995). Etude des mécanismes expliquant la croissance de l'huître perlière au sein de l'écosystème conchylicole de l'atoll de Takapoto. Application à l'optimisation de la charge en élevage. *Projet de thèse*.
- **Cousin M.** (1995). Etude de l'utilisation des glucides et du rapport protéines-énergie chez deux espèces de crevettes péneides *P. vannamei* et *P. stylirostris*. *Thèse INA/PG*. 210 pp.
- **Peeters L.** (1995). Contribution à la connaissance de quelques mécanismes de reproduction et tentatives d'induction chimique de la tétraploïdie chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards (*Crustacé, Décapode*). *Thèse de Doctorat de l'Université Française du Pacifique*. 146 pp.

BREVET

□