

Goarant C.,  
Harache Y.,  
Herbland A.,  
Mugnier C.



22029

# Styli 2003

## Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

Actes du colloque,  
Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003

C. Goarant, Y. Harache, A. Herbland, C. Mugnier



**Ifremer**

### Comité de lecture

Cédric Bacher	Richard Farman
Évelyne Bachère	Robert Galois
Nathalie Baillon	Yves Harache
Nicolas Barré	Jérôme Hussenot
Jean-Pierre Baud	Sadasivam Kaushik
Franck Berthe	Gilles Le Moullac
Alain Bodoy	Frédérique Le Roux
Gilles Bœuf	Jean-François Marini
François Bonhomme	Anne-Geneviève Martin
Guy Boucher	Jean-François Samain
Pierre Boudry	Jean-Louis Martin
Christophe Chevillon	André Pecqueur
Éliane Chungue	Jean-Pascal Torreton
Claude Courties	André Toulmond

### Signalement bibliographique

#### *Monographie:*

Goarant C., Harache Y., Herbland A., Mugnier C., 2004. Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 280 p.

#### *Article:*

Harache Y., Herbland A., 2004. Le programme Désans (Défi Santé *Stylirostris*): une démarche comparable au défi Morest, appliquée à la filière crevette calédonienne. *In*: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 38, 31-38.

## Remerciements

Le comité d'organisation et le comité scientifique remercient tout particulièrement les institutions et collectivités de la Nouvelle-Calédonie et de l'État, ainsi que tous les contributeurs qui ont permis, par leur financement ou leur aide matérielle, la réalisation du colloque Styli 2003, organisé sous l'égide du haut-commissaire de la République en Nouvelle-Calédonie et des présidents des Assemblées de Province de Nouvelle-Calédonie.

Le financement a été assuré par :

- l'État : Délégation française auprès de la Communauté du Pacifique, ministère des Affaires étrangères
- les trois Provinces de la Nouvelle-Calédonie :
  - Province des Îles
  - Province Nord
  - Province Sud



Certains événements ont pu être organisés grâce au soutien financier et/ou la mise à disposition d'installations et de personnel et, en particulier, de : l'Adécal, l'IRD, la CPS, les mairies de Nouméa, Koné et Moindou, et la Sica Nouvelle-Calédonie.





## Avant propos

---

Voilà tout juste 30 ans, l'aquaculture de la crevette voyait le jour en Nouvelle-Calédonie, grâce à l'esprit pionnier de quelques scientifiques et au soutien financier de l'Assemblée territoriale, alors qu'au niveau mondial, cette activité n'en était qu'à ses balbutiements.

Aujourd'hui, bien que modeste par rapport à la production mondiale et restant fragile dans le contexte de la concurrence internationale, l'aquaculture calédonienne est devenue une réalité économique. Elle constitue un outil d'aménagement du territoire permettant le développement d'activités économiques en zone rurale, avec des perspectives importantes de développement dans la partie nord de la Grande-Terre.

La recherche, soutenue par l'État français et les collectivités de Nouvelle-Calédonie, a joué un rôle important dans l'émergence de cette activité. Depuis les premiers travaux exploratoires, qui ont permis la mise en place de la culture de l'espèce *Litopenaeus stylirostris*, jusqu'à aujourd'hui, la recherche s'est structurée et a évolué, faisant désormais appel à des techniques modernes, nécessitant des outils adaptés et un nombre croissant de compétences complémentaires.

L'Ifremer, acteur de la recherche dès l'origine, *via* les travaux du centre de Tahiti et de son implantation sur place, a renforcé son dispositif de recherche dans le cadre du contrat de développement 2000-2004. Ce renforcement s'est concrétisé par l'élaboration d'un programme quadriennal pluridisciplinaire baptisé « Désans » (Défi Santé *Stylirostris*), visant à une meilleure compréhension des mécanismes favorisant l'apparition des crises saisonnières affectant la production.

Dans ce contexte, il a été jugé utile par l'ensemble des partenaires associés dans le cadre du contrat intercollectivités (l'État et les trois provinces de Nouvelle-Calédonie), qui en ont assuré le financement, de tenir un colloque international baptisé « Styli 2003 ». Ce colloque s'est déroulé en Nouvelle-Calédonie à Nouméa et à Koné en juin 2003, avec un fort soutien de l'Institut de recherche pour le développement (IRD) et du secrétariat de la commission du Pacifique (CPS). Il a regroupé autour des acteurs locaux de la recherche les partenaires institutionnels et privés de la filière Crevette, et plus d'une vingtaine d'experts venant d'outre-mer. En tout, près de 250 personnes ont participé aux travaux.

Les objectifs assignés à ce colloque étaient les suivants :

- établir un bilan des recherches menées au cours des cinq dernières années ;
- présenter les acquis scientifiques des différentes disciplines en sollicitant l'avis d'une quinzaine de spécialistes extérieurs à la Nouvelle-Calédonie, apportant des compétences complémentaires dans les domaines de l'écologie des bassins, la pathologie, la physiologie, l'immunologie, la nutrition et la génétique ;

- mener une réflexion critique, avec l'aide des experts présents, sur les orientations du programme Désans;
- entreprendre des réflexions prospectives dans le cadre d'ateliers techniques avec les partenaires de la filière.

Le colloque était organisé en **quatre sessions thématiques** qui se sont tenues les 2 et 3 juin à l'auditorium du centre IRD de Nouméa :

- **présentation de la filière** : perspectives de développement, priorités, réflexions sur la complémentarité recherche-développement ;
- **la crevette** : physiologie, immunologie, nutrition et génétique ;
- **l'écosystème bassin** : qualité du milieu, évolution en cours d'élevage, méiofaune, activité bactérienne, modélisation ;
- **les pathogènes** : *Vibrio* pathogènes, épidémiologie, pathologie expérimentale, gestion zoosanitaire.

Après une journée consacrée à la visite des installations expérimentales de l'Ifremer et de fermes de production, une dernière journée a été consacrée, à l'Hôtel de la Province Nord à Koné, aux discussions et synthèses.

Le présent ouvrage réunit l'ensemble des communications présentées lors de cette conférence.

C. Goarant, Y. Harache, A. Herbland, C. Mugnier

## Sommaire

<b>Avant-propos</b>	4
<b>La filière crevette en Nouvelle-Calédonie vue par les collectivités locales</b> R. Farman, N. Baillon	9
<b>La filière crevette en Nouvelle-Calédonie : situation actuelle, développement et besoins de recherche</b> C. Fontfreyde, S. Capo, M. Guillaume	13
<b>Une vision globale de l'aquaculture de crevettes et de son marché</b> P. Andrier	18
<b>Le soutien d'une filière aquacole par la recherche : l'exemple de la conchyliculture française et du programme Morest (Mortalités estivales de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>)</b> J.F. Samain, P. Boudry, L. Dégremont, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, J. Moal, M. Mathieu, C. Lambert, J.M. Escoubas, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, T. Burgeot, C. Bacher	23
<b>Le programme Désans (Défi Santé <i>Stylirostris</i>) : une démarche comparable au défi Morest appliquée à la filière crevette calédonienne</b> Y. Harache, A. Herbland	31
<b>Physiological response to stress and health implications in Crustacea</b> M.R. Hall, E. de la Vega	39
<b>Immunité anti-infectieuse et indicateurs de santé chez les crevettes péneïdes</b> É. Bachère, J. de Lorgeril, D. Saulnier, Y. Guéguen, M. Muñoz	57
<b>La gestion du flux d'oxygène chez les animaux aquatiques. Application au cas des crevettes péneïdes</b> J.C. Massabuau, C. Soyez	66
<b>Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette péneïde <i>Litopenaeus stylirostris</i> à 20°C</b> N. Wabete, L. Chim, P. Lemaire, J.C. Massabuau	75
<b>La crevette et le syndrome d'été en Nouvelle-Calédonie : quelles réponses physiologiques et immunitaires ? Résultats préliminaires du programme Désans</b> C. Mugnier, C. Justou et le personnel du LAC	85
<b>Les facteurs nutritionnels influençant la qualité des larves et des post-larves de crevettes péneïdes</b> C. Cahu	93
<b>Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de <i>Litopenaeus stylirostris</i>. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction des saisons d'élevage</b> L. Chim, R. Galois, J.L.M. Martin, P. Lemaire, N. Wabete, J.C. Massabuau, G. Cuzon	99

<b>Genetic selection of aquaculture organisms including prawns with a special focus on the way to integrate a breeding programme into the private industry</b> M. Macbeth, C. McPhee, M. Burke, J. Bartlett, C. Jones, W. Knibb M. Kenway, K. Wilson	106
<b>Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture</b> S. Lapègue, E. Bédier, E. Goyard, L. Dégremont, J.P. Baud, A. Gérard, P. Gouilletquer, P. Boudry	113
<b>Selective breeding of <i>Litopenaeus vannamei</i> in Colombia</b> T. Gitterle, B. Gjerde, C. Lozano, H. Johansen, J. Arturo Suárez, A. Suárez, J. Faillace, C. Erazo, E. de la Vega, M. Rye	121
<b>Synthèse des travaux de génétique « crevette » menés à Tahiti : quel bénéfice pour la filière calédonienne ?</b> E. Goyard, E. Bédier, J. Patrois, V. Vonau, D. Pham, G. Cuzon, L. Chim, L. Penet, T. Dao, P. Boudry, Aquacop	126
<b>Nitrogen and shrimp ponds: whole-farm N budgets and nitrogen removal from effluent</b> C. Jackson	134
<b>Influence des pratiques zootechniques et des paramètres environnementaux sur les performances de production, et sur la formation et le devenir des déchets dans les élevages de crevettes</b> J.L.M. Martin, H. Lemonnier, P. Garen	142
<b>Data management for professional shrimp farm operation</b> C. Jackson, M. Austin	147
<b>Mesure en cytométrie en flux du picoplancton autotrophe et hétérotrophe : un outil de contrôle de la qualité des eaux de fermes d'élevage de crevettes</b> C. Courties, G. Boeuf	150
<b>Évolution des paramètres physico-chimiques et biologiques de bassins d'élevage de crevettes soumis à deux régimes de renouvellement en eau avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 »</b> J. Lefèvre, H. Lemonnier, C. Goarant, J. Blanchot	158
<b>Méiobenthos et indicateurs de la qualité des écosystèmes. Quel intérêt pour l'aquaculture des crevettes ?</b> G. Boucher	167
<b>Stimulation de la chaîne trophique naturelle dans les bassins d'élevage de <i>Litopenaeus stylirostris</i>: influence sur les performances zootechniques</b> L. Della Patrona, L. Chim, S. Capo, P. Lemaire, P. Brun, J.L.M. Martin	173
<b>Influence des pratiques zootechniques de la crevette (<i>Litopenaeus stylirostris</i>) et de l'âge des bassins sur la qualité des sédiments</b> H. Lemonnier, R. Brizard, A. Legrand	180



<b>Environnement bassin et vibriose dans des élevages de crevettes de saison chaude en Nouvelle-Calédonie : résultats préliminaires du programme Désans</b>	
H. Lemonnier et le personnel du LAC	187
<b>Vers une étude épidémiologique des vibriones</b>	
M. Gay, D. Saulnier, N. Faury, F. Le Roux	196
<b><i>Vibrio penaeicida</i> et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle-Calédonie : revue et perspectives</b>	
C. Goarant, J. Herlin, D. Ansquer, R. Brizard, A.L. Marteau	203
<b>Épidémiologie de <i>Vibrio nigripulchritudo</i> dans le cadre du syndrome d'été : résultats préliminaires du programme Désans</b>	
C. Goarant, J. Herlin, D. Ansquer, F. Imbert, D. Domalain, A.L. Marteau	210
<b>Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose</b>	
D. Saulnier, C. Goarant, J. Charlier, D. Ansquer, P. Levy, Y. Labreuche, J. de Lorgeril, É. Bachère, G. Aguirre-Guzman, N. Cochennec-Laureau	216
<b>Mid-crop mortality syndrome in Australian prawn farming: a case study</b>	
B.R. Cullen, L. Owens	223
<b>Stratégies d'épidémiosurveillance et d'épidémiogilance pour la filière crevette de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002</b>	
P. Primot, J. Herlin, O Ferré, H. Sadonès, D. Domalain, C. Goarant	229
<b>Relations entre l'aquaculture et l'environnement côtier (impact, sélection de site, potentiel de production) : application à l'aquaculture de crevettes</b>	
J.L.M. Martin	236
<b>Un exemple de gestion des effluents d'une ferme industrielle de crevettes intégrant la mangrove</b>	
J.V. Mogollón, L.E. Sánchez-Arias, R. Bador	241
<b>Les bases de données en aquaculture : exemples, intérêts et contraintes, système proposé pour la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie</b>	
A.G. Martin, J.C. Masson, B. Soulard	246
<b>Synthèse provisoire sur l'approche pluridisciplinaire du syndrome d'été (programme Désans)</b>	
C. Goarant, H. Lemonnier, C. Mugnier, A. Herbland	255
<b>Références bibliographiques</b>	261

# La filière crevette en Nouvelle-Calédonie vue par les collectivités locales

R. Farman<sup>(1)</sup>, N. Baillon<sup>(2)</sup>

(1) Direction des ressources naturelles, Province Sud, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

(2) Service de la mer, direction du développement économique, Province Nord, Koné, Nouvelle-Calédonie  
farman@drn.province-sud.nc

## Résumé

La filière crevette calédonienne existe depuis une vingtaine d'années, depuis l'installation des premières fermes privées en 1983. Les différentes phases de mise en place de cette activité, précédées d'une dizaine d'années de recherches menées sur le territoire de Nouvelle-Calédonie, avec le soutien des collectivités locales, ainsi que les principales caractéristiques de cette filière sont rappelées. L'aquaculture calédonienne dont la croissance a été accompagnée par une organisation de la filière, visant à assurer sa cohérence vis-à-vis de l'exportation, connaît des perspectives de développement intéressantes. Un doublement des surfaces exploitées, assorti d'un doublement de la production est attendu dans les cinq prochaines années, avec un déplacement du centre de gravité de l'activité vers le nord de la Grande-Terre, permettant un rééquilibrage des activités économiques. Les partenaires institutionnels entendent poursuivre l'accompagnement de cette filière en contribuant à sa «durabilité», par une assistance scientifique et technique de l'activité, et diverses mesures économiques de soutien à la filière.

## Abstract

The first commercial farms were established in New Caledonia in 1983. The history of the development of shrimp farming in New Caledonia, with the help of local institutions over the last 20 years is briefly described, as well as the main characteristics of the industry. The previsions for development of the production, which should double in the next five years, indicate a progressive shift of the heart of the activity towards the northern part of the island. Institutions of New Caledonia and the French government support this development through scientific and technical support to the industry, as well as financial incentives, with the will to guarantee the sustainability of the activity.

## Introduction

Avec une production annuelle qui est passée de quelques dizaines de tonnes à 1 800 tonnes en 20 ans et qui représente aujourd'hui la deuxième activité économique du territoire après le nickel, la filière crevette en Nouvelle-Calédonie constitue un outil de développement économique important qui a mis en œuvre une stratégie de développement durable.

En effet, le secteur privé a su, avec le soutien déterminé des pouvoirs publics, rapidement concrétiser les résultats de la recherche et c'est ainsi que la filière telle qu'on l'entend fête aujourd'hui ses 20 ans d'existence.

### **Historique**

---

C'est donc une histoire qui dure : des premiers hectares de bassins créés en 1983 et toujours en production, on est passé aujourd'hui à près de 500 hectares.

Il n'a fallu ainsi qu'une décennie pour transférer les résultats de la recherche au secteur privé :

- premières expérimentations à l'initiative de la CPS/FAO à Saint-Vincent : 1972 ;
- création de l'Association pour le développement de l'aquaculture en Nouvelle-Calédonie sous la direction scientifique du CNEXO : 1973 ;
- création du premier bassin « privé », la ferme Chevalier : 1978 ;
- signature du protocole d'accord et d'un premier contrat cadre de 5 ans renouvelables : 1979 ;
- création des premières exploitations à Tontouta et Moindou : 1983-1984.

L'essor et la réussite de la filière n'ont été possibles que grâce à une heureuse conjonction de facteurs :

- la volonté affirmée des collectivités locales de favoriser le développement de nouvelles activités rurales que les différentes communautés pourraient intégrer ;
- des conditions climatiques permettant de bonnes performances et une production toute l'année ;
- le choix de l'une des espèces en début de « domestication » : à la fin des années soixante-dix, seules les équipes françaises spécialisées en aquaculture tropicale de Tahiti et de Nouvelle-Calédonie réalisent le cycle complet en élevage de quelques espèces de crevette ;
- une ingénierie éprouvée et un réel savoir-faire, acquis dans la phase de recherche-développement ;
- l'essaimage des chercheurs et techniciens dans le privé ;
- des infrastructures et des activités de service de bon niveau ;
- le maintien dans la durée d'un effort important de recherche, financé par l'opération intercollectivités du contrat de développement, qui a permis le renforcement de l'équipe de l'Ifremer ;
- une intégration des différentes composantes de la filière, permettant une politique globale et cohérente de développement.

En dix ans, on a ainsi pu assister à la montée en puissance de la filière avec la création d'une dizaine de fermes. Cependant, ce développement n'a pas été « linéaire » mais plutôt par paliers successifs en fonction des avancées techniques ou commerciales. Ce rythme est aujourd'hui beaucoup plus soutenu.

### **Caractéristiques de la filière**

---

La filière calédonienne est parfaitement intégrée dans son milieu, à plusieurs niveaux.

### **Le milieu naturel**

Ce développement a connu un tel succès notamment parce que c'est une activité bien intégrée dans son milieu avec la mise en valeur d'espaces autrement improductifs mais sans pour autant porter atteinte à l'intégrité du littoral, notamment des mangroves : une ferme en Nouvelle-Calédonie « épouse » la forme naturelle du littoral (tannes ou marais d'arrière-mangrove) qu'elle valorise et s'attelle à protéger.

Peu d'activités de productions primaires peuvent d'ailleurs s'enorgueillir d'être si « environnementalement correctes ».

En outre, ces exploitations font dorénavant l'objet d'une étude ou d'une notice d'impact (selon l'importance du projet) dans le cadre de l'occupation temporaire du domaine public maritime (dont l'instruction est de la compétence provinciale).

### **Le milieu socio-économique**

La filière est une des principales sources de création d'activité économique hors du grand Nouméa. L'aquaculture de crevettes est d'ailleurs bien intégrée au tissu économique et social de l'intérieur de la Nouvelle-Calédonie (la « brousse ») car c'est une activité compatible avec le mode de vie des populations, acquérant aisément le savoir-faire.

Par ailleurs, la création d'une filière industrielle a permis l'émergence de fermes dites « familiales » en complément d'activités existantes comme l'élevage.

La présentation du Groupement des fermes aquacoles (GFA) abordera plus en détail le poids économique de la filière, notamment, en termes d'emplois (voir Fontfreyde *et al.*, cet ouvrage).

### **Des perspectives d'avenir**

---

Dans un pays qui s'y prête (géographie, climat et sites disponibles), avec des débouchés commerciaux compatibles avec les coûts de production, le potentiel de développement reste encore à réaliser avec le doublement du nombre d'hectares en production dans les cinq ans à venir.

En effet, suite à l'inventaire des sites potentiels réalisé conjointement par les provinces Nord et Sud, l'Ifremer et l'Adécal, et grâce aux bons résultats enregistrés par la filière ces trois dernières années ainsi qu'aux nouvelles mesures d'incitation fiscale mises en place par la Nouvelle-Calédonie, on assiste aujourd'hui à un foisonnement de projets.

Même si il est difficile de connaître précisément la date de mise en eau des projets actuellement à l'étude (certains promoteurs sont plus « pressés » que d'autres), on peut néanmoins prédire le doublement des superficies en production d'ici cinq ans et, à terme, la mise en valeur de la totalité des sites répertoriés, correspondant à une superficie de 1 300 hectares environ avec les techniques actuelles. La filière crevette en Nouvelle-Calédonie offre ainsi de bonnes perspectives d'avenir.

La présentation de la Sopac (structure de conditionnement et de commercialisation de la production) abordera plus en détail les aspects commerciaux et l'organisation de la production (voir Andrier, cet ouvrage).



### **Les attentes des partenaires institutionnels**

---

Si ce secteur a pu émerger grâce au soutien des pouvoirs publics, ces derniers attendent néanmoins que la filière puisse acquérir progressivement une plus grande autonomie. Les collectivités devront cependant continuer à assurer la veille zoonositaire, qui a permis à la Nouvelle-Calédonie d'échapper aux grandes épizooties virales frappant les productions dans de nombreuses régions du globe, et à lever un certain nombre de contraintes, notamment :

- **Techniques**

Une partie de l'effort important que les collectivités locales et l'État consentent en matière de recherche au travers de leur soutien au laboratoire aquacole de Calédonie sera consacrée à un accompagnement scientifique et technique des nouveaux projets, notamment pour les fermes de petite taille à caractère « familial ».

- **Économiques**

En travaillant avec le GFA sur la réduction des coûts de production (ex. énergie, charges sociales...), en accompagnement des investissements (fiscalité) et en soutenant la création d'un fonds d'intervention qui permettra de faire face à certains aléas, notamment commerciaux.

### **Conclusion**

---

Le développement de la filière crevette a été possible grâce à l'effort de recherche mené depuis trente ans en Nouvelle-Calédonie, conjugué aux initiatives du secteur privé, le tout fortement soutenu dès l'origine par les pouvoirs publics qui veilleront à pérenniser ces acquis. D'autant plus que l'activité, dont une part importante du développement à venir se fera en Province Nord, représente incontestablement un outil d'aménagement du territoire, favorable au rééquilibrage des activités économiques.

## La filière crevette en Nouvelle-Calédonie : situation actuelle, développement et besoins de recherche

C. Fontfreyde, S. Capo, M. Guillaume

Groupement des fermes aquacoles (GFA), BP 111, 98845 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
gfanc@lagoon.nc

### Résumé

La filière crevette produit environ 1 800 tonnes de crevette *Litopenaeus stylirostris* par an et représente la deuxième source d'exportation de la Nouvelle-Calédonie, derrière le nickel. Elle comprend quatre écloséries (aucun géniteur n'est prélevé dans le milieu naturel), douze fermes de grossissement de taille modeste représentant 500 ha de bassins installés derrière les mangroves sur 400 km de côte à l'ouest de la Grande-Terre, un atelier de conditionnement dédié uniquement à la crevette. Cette filière fournit également du travail à plusieurs sous-traitants, à deux fabricants locaux d'aliments et mobilise un encadrement par les pouvoirs publics composé aux trois-quarts par du personnel de recherche de l'Ifremer. La sphère crevette mobilise environ 900 personnes, 300 permanents et 600 occasionnels, pour environ 350 équivalents temps plein. Ces emplois, souvent non qualifiés, sont pour moitié situés en brousse où ils contribuent au développement économique de zones souvent isolées. L'importance de la crevetticulture pour la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie devrait se renforcer avec le doublement prévu, à moyen terme, de la production et des outils de production. La quasi-totalité de ces créations d'emplois et de richesses devrait se faire en brousse. La croissance de la production est permise par l'augmentation de nos exportations sur le secteur du haut de gamme. Compte tenu de coûts de production largement supérieurs à ceux de nos concurrents, nous ne pouvons nous différencier que sur la qualité : la qualité du lagon calédonien que nous souhaitons préserver et mieux connaître, la qualité de notre crevette dont les propriétés organoleptiques sont reconnues à travers le monde, la qualité de notre savoir-faire. Les objectifs techniques que nous souhaitons atteindre dans le cadre de nos deux cahiers des charges, très contraignants mais garants de notre produit, sont : pouvoir à nouveau réaliser des élevages en hiver et éviter la pointe de production qui pénalise toute la filière ; diminuer les mortalités de saison chaude qui, pour une raison inconnue, ne touchent qu'une ferme ; diminuer l'apparition de points noirs, source de décote et de baisse du chiffre d'affaires, sur les crevettes de certaines fermes ; prévoir des outils pour résister aux maladies en éclosérie.

### Abstract

The New Caledonian prawn farming industry produces 1 800 tons of *Litopenaeus stylirostris* annually. The New Caledonian industry includes one prawn processing workshop, 4 hatcheries and 12 farms; 500 ha of ponds are taking place behind

the mangroves on the west coast on the main island. Prawn farming sector includes 2 local shrimp feed manufacturers, some sub-contractors and public authorities and provides 900 jobs, 300 permanent and 600 part-time jobs.

The prawn industry should double its size and its production during the next 5 years and will be able to provide a higher value and more jobs in rural areas.

This growth is the result of our export strategy. As our costs are higher than in the other countries we have to compete on the quality level. We have three winning cards: the quality of the lagoon that we want to preserve, the quality of the prawn and the quality of the know-how that we would like to improve.

Our R&D priorities are, in the respect of our two codes of practice:

- to improve survival rates during the cold season in all the farms and escape the costly seasonality of our production;
- to improve the survival rates during the hot season in the only farm where this problem occurs;
- to reduce the black spots incidence on the prawns because high prices are given only for premium quality;
- to better control the diseases in hatcheries.

La filière crevette produit environ 1 800 tonnes de crevettes *Litopenaeus stylirostris* par an et représente la deuxième source d'exportation de la Nouvelle-Calédonie, derrière le nickel. Les 20 ans d'existence de la filière ont permis la mise en évidence de certaines particularités et contraintes inhérentes à la Nouvelle-Calédonie, forçant les producteurs à adapter leurs systèmes d'élevage. Cependant, la filière a réussi à se développer grâce à des atouts forts tels qu'une qualité de produit irréprochable et l'obtention de marchés porteurs, et poursuit aujourd'hui son expansion.

### **Les contraintes environnementales**

---

Parmi les facteurs limitant le développement de la filière, les contraintes environnementales, par le biais de la topographie et du climat, imposent des systèmes d'exploitation particuliers.

- D'une part, la **topographie** va le plus souvent déterminer la typologie de l'exploitation (fig. 1). Les fermes dites familiales occupent des surfaces de 10 à 20 ha, emploient une main-d'œuvre familiale et nécessitent des frais d'investissement limités en intégrant fréquemment une pluriactivité sur site. Les fermes intermédiaires couvrent jusqu'à 60 ha, les investissements sont plus importants et leur statut juridique est souvent de type SARL, avec un responsable technique différent de l'actionnaire principal. Les grandes fermes, qui sont des SA (sociétés anonymes), représentent des investissements importants et emploient une main-d'œuvre spécialisée (biologie, mécanique, comptabilité), les surfaces occupées sont supérieures à 60 hectares.

Les surfaces utilisées pour l'installation de fermes aquacoles se situant en arrière de mangroves et sur des prés-salés inexploitable par l'agriculture, le choix de sites potentiels se restreint de plus en plus. Une voie de recherche qui consisterait à tester des élevages en terre végétale inculte permettrait d'écarter en partie cette problématique liée à la topographie.

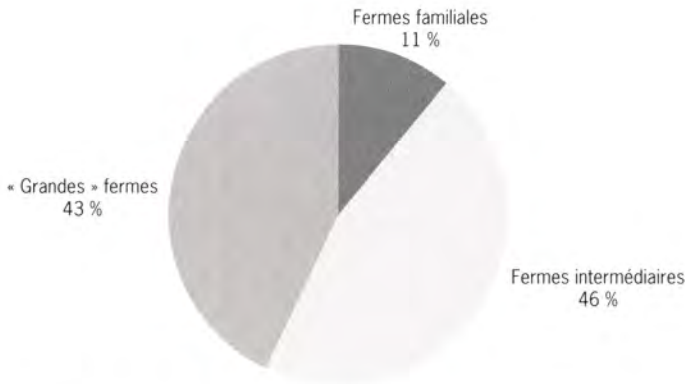


Figure 1 - Typologie des exploitations et part dans la production.

• D'autre part, l'existence d'une saison fraîche marquée induit une saisonnalité de la production qui, par conséquent, décrit une courbe en cloche avec des maxima de production aux mois de mars, avril, mai et juin (fig. 2). Cette saisonnalité amène la plupart des éleveurs à ne faire qu'un seul cycle d'élevage par an, laissant des bassins vides plusieurs mois dans l'année. Toutefois, une partie de ce temps d'assec des bassins est mis à profit pour travailler le fond des bassins, le travail d'oxygénation des sols étant primordial pour la réussite du cycle suivant.

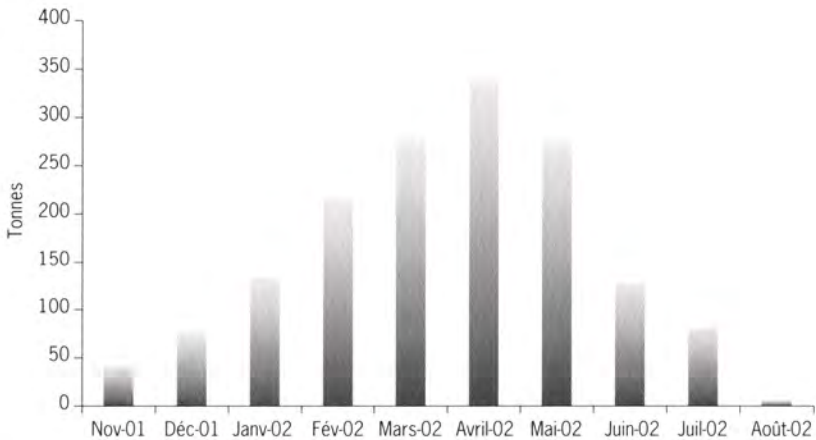


Figure 2 - Livraisons des systèmes de production actuels.

L'augmentation des survies pendant la saison fraîche, tout en respectant les cahiers des charges qualité de la crevetticulture calédonienne, est donc une des voies majeures de recherche pour l'optimisation de l'exploitation des surfaces ; une autre voie de recherche qui testerait l'élevage d'autres animaux pendant la saison fraîche pourrait mettre à profit ces moments de non-exploitation des bassins.



### Les limites des systèmes de production actuels

Le rendement moyen de la filière, y compris les surfaces peu ou pasensemencées, est de 3,9 t/ha/an en 2001-2002. Le rendement des bassins normalementensemencés est en amélioration depuis quelques années grâce à de meilleures survies et un poids moyen plus élevé.

Deux systèmes de production existent en Nouvelle-Calédonie. Le premier, aéré, implique d'être relié au réseau électrique, d'investir et entretenir du matériel spécifique à l'aération, et de posséder une bonne technicité. Le second, non aéré, est plus rustique et impose moins de contraintes; il implique des densités d'animaux moindres au mètre carré. Néanmoins, plusieurs choix d'aération peuvent coexister dans la même ferme (un tiers des fermes aèrent la totalité de leurs bassins, un tiers des fermes n'en aèrent aucun). L'évolution des systèmes existants passe par une amélioration



Figure 3 - Bassin aéré.

des vitesses de croissance et une augmentation de la biomasse en bassin, tout en restant dans le cadre du cahier des charges, très strict sur ces points.

Par contre, des tests de nouveaux matériels, la recherche d'aliments plus efficaces incluant moins de farine de poissons, l'augmentation de la résistance des post-larves, des tests d'élevages associés/combinés ou d'élevage d'autres espèces en saison fraîche sont des directions potentielles à prendre par la recherche. En outre, comprendre l'existence de taux de survie atypiques en saison chaude (mortalités d'été affectant les bassins) permettra d'identifier les paramètres limitant les systèmes de production actuels.

### Le renforcement des points forts de la filière



Figure 4 - Tri des crevettes de 2<sup>e</sup> gamme à la Sopac.

en gardant les objectifs de qualité reste une quête importante pour toute la filière.

Le développement de la filière crevette calédonienne a été possible grâce à la qualité exceptionnelle du produit. La présentation irréprochable des crevettes est donc un gage de réussite et de pérennité pour la filière, en particulier à l'export. Ainsi, un tri rigoureux à l'atelier de conditionnement, écartant les crevettes de deuxième gamme, est opéré pour servir les marchés cibles. L'amélioration de la qualité de la production totale en diminuant la part des crevettes de deuxième gamme tout

La crevette calédonienne doit aussi son succès à l'image apportée par la qualité exceptionnelle du milieu naturel calédonien, le « plus beau lagon du monde ». Toute la filière aquacole s'efforce donc de préserver ce milieu naturel en maîtrisant les effluents et en conservant la mangrove lors de nouvelles constructions. Une nouvelle étude encore plus approfondie de l'impact des fermes sur l'environnement serait nécessaire pour parfaire cette image.

La Nouvelle-Calédonie est un des rares pays où le cycle de vie des crevettes est maîtrisé dans sa totalité depuis plusieurs dizaines de générations. Aucune crevette n'est prélevée dans le milieu naturel. Ainsi, les écloséries privées ont fourni, pendant la campagne 2002-2003, 142 millions de post-larves. Afin de permettre le renforcement de la filière, une meilleure régularité des productions par les écloséries reste nécessaire.

### **Une filière dynamique, un développement important prévu dans les prochaines années**

La filière calédonienne est bien structurée : elle comprend 4 écloséries, 11 fermes, un atelier de conditionnement, 2 provendiers, divers partenaires publics (composés aux trois-quarts par du personnel de recherche de l'Ifremer) et privés.

La sphère crevette mobilise environ 900 personnes, 300 permanents et 600 occasionnels, pour environ 350 équivalents temps plein. Ces emplois, souvent non qualifiés, sont pour la plupart situés en brousse où ils contribuent au développement économique de zones souvent isolées. Les besoins en formation de personnels (ouvriers et techniciens) deviennent maintenant une des clés qui favorisera le développement futur de la filière.

Un plan de développement ambitieux prévoit le doublement de la production, des surfaces, de la taille de la filière et de l'emploi en brousse dans les quatre années à venir.

Ce développement devra s'accompagner d'une réflexion sur plusieurs thèmes d'études : une meilleure connaissance des interactions ferme/environnement, l'amélioration de l'aliment, une veille technique et technologique et des tests des nouveautés, la mise en place de formations, l'apport de conseils aux nouveaux entrepreneurs, le développement de nouveaux systèmes de production et la diversification.

En conclusion, la filière crevette est un secteur en plein essor, mais les axes de recherche suivants devront être abordés afin de poursuivre ce développement et améliorer les systèmes de production actuels :

- augmenter les survies pendant la saison fraîche ;
- comprendre les taux de survie atypiques en saison chaude ;
- diminuer la part des crevettes de deuxième gamme dans la production totale ;
- renforcer la régularité des productions en éclosérie.

Tous ces besoins en développement devront absolument intégrer le respect des cahiers des charges et, par là même, de la qualité (condition *sine qua non* de l'exportation vers les marchés étrangers) : qualité du produit, qualité des techniques de production, qualité et préservation de l'environnement.



## Une vision globale de l'aquaculture de crevettes et de son marché

P. Andrier

Sopac, BP 2987, 98460 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
sopac@sopac.nc

### Résumé

La production mondiale de crevettes d'aquaculture, après une période de relative stabilité dans les années quatre-vingt-dix, a connu un accroissement très rapide depuis 1999, marqué par l'émergence de nouveaux pays producteurs. Cette augmentation de l'offre crée une forte tension sur les prix, amplifiée par la baisse du dollar US par rapport à l'euro. Ceci s'est traduit par une baisse importante des cours mondiaux, notamment en 2002. La Nouvelle-Calédonie, avec 1 800 tonnes dont 1 500 exportées, reste un très petit producteur contribuant pour moins de 0,2 % aux apports mondiaux.

Le contexte géographique et socio-économique de la Nouvelle-Calédonie ainsi que le choix d'inscrire cette activité émergente dans une perspective durable se traduisent par des coûts de production élevés. Ceux-ci nécessitent de viser des marchés haut de gamme, accessibles grâce aux caractéristiques de la production calédonienne : qualités organoleptiques intrinsèques de l'espèce *Litopenaeus stylirostris*, introduite il y a plus de 25 ans, cahier des charges extrêmement strict visant à garantir cette qualité ainsi que la sécurité du consommateur et la préservation de l'environnement. Ces mesures ont été rendues possibles grâce à la solidarité de tout le secteur de production et l'organisation qui en résulte. La production, qui devrait doubler dans les cinq prochaines années, représente dorénavant le premier produit d'exportation agro-alimentaire de Nouvelle-Calédonie et permet le développement d'activités économiques et d'emplois en zone rurale, faisant de la crevetticulture un outil d'aménagement du territoire et de rééquilibrage des activités économiques vers le nord de la Grande-Terre.

### Abstract

The world shrimp farming production, after a stabilized production during the 90's, has shown a rapid increase since 1999, with the emergence of new producing countries. This increase of the production, induced a significant decline of market prices, whose effect is accentuated by the weakness of the US \$ against Euros. Prices have known a decrease of 25% in 2002. New Caledonia, with a production of 1 800 tons, 1 500 of which being exported, remains a very small producer, contributing to less than 0.2% of the world landings. The geographic and socio-economic context on New Caledonia, and the choice to develop this activity with the perspective of sustainability, result in high production costs. This requires to focus at markets requiring high quality products. This was made possible by the quality of the species produced, introduced 25 years ago: *Litopenaeus stylirostris* as well as the rearing conditions accepted by the growers, allowing a certification of quality, consumer safety as well as environment preservation. The organization of the sector has made possible these guarantees. The production, which should double over the next

five years, already constitutes the first exported agro-product of New Caledonia, allowing the development of the activity and the creation of employment in rural areas. This makes shrimp farming an interesting development tool contributing to the development of activities in the north part of the main island.

### **Introduction**

---

La Sopac (Société des producteurs aquacoles calédoniens), créée en 1994 à l'initiative des aquaculteurs de Nouvelle-Calédonie pour transformer et commercialiser leurs produits, a réussi à imposer sur le marché international une crevette haut de gamme, de qualité reconnue. Avec une production annuelle moyenne de 1 800 tonnes, au cours des trois dernières années, la crevette est aujourd'hui le deuxième produit exporté après le nickel.

La solidarité des aquaculteurs et la forte structuration de la filière ont permis de définir les bases techniques, scientifiques et économiques du développement durable de la production de crevettes en Nouvelle-Calédonie. La Sopac s'est attachée parallèlement à construire de véritables relations de partenariat avec ses clients, leur offrant une qualité correspondant à leurs cahiers des charges ainsi que l'exclusivité sur l'origine Nouvelle-Calédonie.

Les recherches effectuées depuis trente ans par l'Ifremer ont joué un rôle important dans le développement de cette activité qui emploie aujourd'hui environ 900 personnes dans le pays (emplois directs et indirects, permanents et temporaires). Non indigène en Nouvelle-Calédonie, l'espèce *Litopenaeus stylirostris*, originaire du Mexique, s'est révélée bien adaptée à l'environnement calédonien. Elle présente une excellente résistance aux conditions climatiques et offre le meilleur rendement, donnant des atouts stratégiques aux aquaculteurs pour garantir le développement durable de leur exploitation.

Vingt ans après la création des premières fermes, force est de constater que l'aquaculture calédonienne est un instrument de développement en harmonie avec l'environnement. Cet équilibre est le résultat des mesures prises par la filière, en plein accord avec les collectivités locales et la recherche, pour que cette activité, importante sur le plan économique et créatrice d'emplois en brousse, ne constitue pas une nuisance, notamment pour le lagon et la mangrove.

Ces bons résultats encouragent aujourd'hui de nombreux projets de fermes aquacoles : une douzaine de nouvelles fermes doivent être créées d'ici cinq ans. Premier exportateur agro-alimentaire de Nouvelle-Calédonie, la Sopac emploie entre 50 et 200 personnes durant la saison sur son site de Nouméa. Une deuxième usine de transformation verra le jour dans le nord du pays vers la fin 2004 pour faire face à l'augmentation de la production qui devrait doubler dans les prochaines années.

### **Le marché mondial de la crevette**

---

#### **La production**

La production mondiale de crevettes d'aquaculture a représenté 1 350 000 tonnes en 2002. Au cours des deux dernières années, cette production a subi une forte augmentation (fig. 1). Les principaux pays producteurs sont ceux du Sud-Est asiatique : Thaïlande (qui fournit près de 25 % de la production d'aquaculture), Chine, Vietnam, Indonésie... et certains pays émergents, comme le Brésil, se sont fixés



des objectifs de croissance extrêmement importants dans des délais très courts. Cette augmentation de la production mondiale crée une forte tension sur les prix, amplifiée par la baisse du dollar par rapport à l'euro.

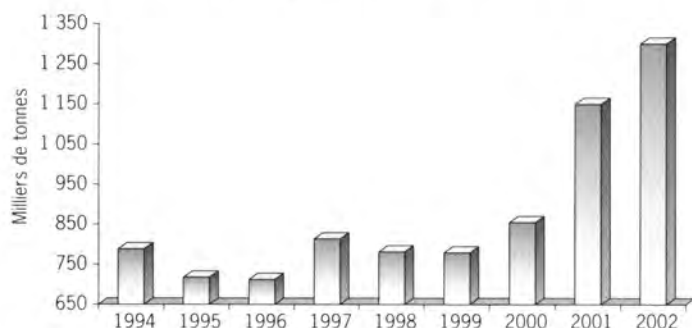


Figure 1 - Accroissement des volumes de production sur le marché mondial.

### Les marchés

Les trois marchés importants sont les États-Unis, l'Europe et le Japon. L'offre et la demande sur ces trois marchés sont fortement influencées par la variation du niveau de production et les fluctuations des taux de devises. Les caractéristiques de ces trois marchés sont sensiblement différentes tant sur le plan des réglementations sanitaires, des habitudes de consommation que sur celui des modes de mise en marché. D'une manière générale, les prix moyens ont fortement chuté depuis deux ans (baisse de 25 % au cours du second semestre 2002) et sont actuellement à un faible niveau (fig 2).

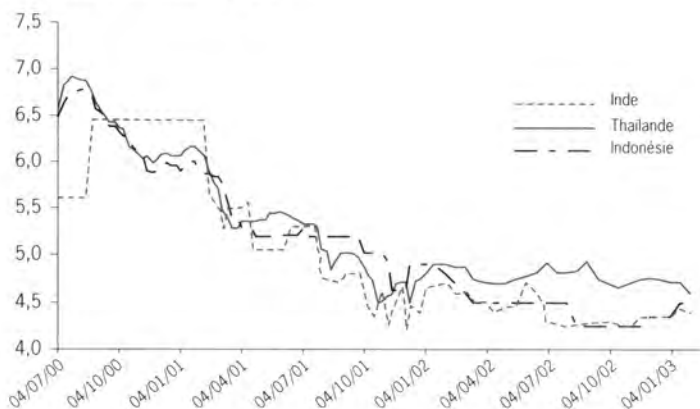


Figure 2 - Évolution des cours du marché de la crevette « Black tiger » en \$US, entre juillet 2000 et janvier 2003 (calibre 26/30).

## La Nouvelle-Calédonie dans le contexte international

### La Calédonie et les autres pays producteurs

Dans ce contexte international difficile, la Nouvelle-Calédonie demeure un très petit pays producteur, ne représentant que 0,2 % de la production mondiale d'aquaculture en 2001. Les volumes produits sont faibles (1 800 tonnes par an)

et la production globale traitée par la Sopac est restée stable de 1999 à 2002, s'établissant en moyenne autour de 1 500 tonnes par an. Compte tenu de la forte augmentation de la production mondiale, la part relative de la Nouvelle-Calédonie va diminuer, malgré le doublement de la production calédonienne prévu au cours des cinq prochaines années.

### **Les contraintes liées à la production en Nouvelle-Calédonie**

La filière aquacole calédonienne a fait le choix technique d'unités de petite taille bien intégrées à l'environnement naturel et social de la Nouvelle-Calédonie. Ce morcellement en petites exploitations a cependant un effet important sur les coûts de production. Avec 498 ha pour 12 fermes, la taille moyenne d'une ferme est de 41,5 ha en Nouvelle-Calédonie. À titre de comparaison, la taille moyenne d'une ferme à Madagascar est de 500 ha, soit dix fois plus importante.

La saisonnalité de la production a également une conséquence non négligeable sur les coûts de l'aquaculture calédonienne. Pour des raisons d'ordre biologique (Syndrome 93) et de mode de fonctionnement des fermes, plus de 70 % de la production sont réalisés sur 4 mois de l'année. Cela nécessite un surinvestissement pour assumer les pics de production.

Coûts de production comparatifs entre la Nouvelle-Calédonie et Madagascar.

	Madagascar	Nouvelle-Calédonie
Coût à l'hectare	12 000 à 25 000 \$ US	63 000 à 110 000 \$ US
Prix sortie bassin	3 à 5 \$ US/kg	6 à 10 \$ US/kg
Main-d'œuvre (SMIC mensuel)	30 euros	840 euros

Les spécificités et le contexte socio-économique de l'aquaculture calédonienne induisent des coûts plus élevés que dans les autres pays producteurs, comme le montre le tableau. L'aquaculture en Nouvelle-Calédonie présente cependant de nombreux avantages dont l'intérêt est évident pour le développement socio-économique du pays : la possibilité de développer de petites exploitations de type familial pouvant assurer un complément d'activités utile, le recours à des emplois peu qualifiés et saisonniers adaptés aux besoins et aux caractéristiques de la vie locale, l'apport de devises, etc.

### **La réponse de la Sopac : un produit haut de gamme, patrimoine de la Nouvelle-Calédonie**

#### **L'engagement qualité**

Les professionnels de l'aquaculture calédonienne ont mis la qualité au cœur de leurs préoccupations, avec 4 axes principaux : sécurité alimentaire, traçabilité totale, qualité constante et respect de l'environnement. Les producteurs se sont engagés, par contrat écrit, au strict respect du cahier des charges de la Sopac, afin d'apporter une qualité de production et de commercialisation conforme aux attentes des clients et des consommateurs. Cette démarche volontariste commune a permis d'obtenir les agréments de la Communauté européenne, de la Marine américaine et des Services vétérinaires de la Nouvelle-Calédonie. Elle a également permis d'obtenir la certification « Filière Qualité Carrefour » en 2000 ainsi que le label « Critères Qualité Certifiés », consacrant une reconnaissance internationale en 2002.

### **Une espèce particulière peu produite dans le monde**

Depuis 30 ans, l'aquaculture de la crevette tropicale *Litopenaeus stylirostris* se développe de façon remarquable en Nouvelle-Calédonie, principal pays producteur de cette espèce. L'espèce se prête bien à la fourniture de crevettes de gros calibre, particulièrement appréciées des consommateurs du monde entier. L'espèce soigneusement sélectionnée s'épanouit dans un environnement exceptionnel qui permet de produire une crevette haut de gamme, réunissant des qualités proches d'un produit biologique. Sa couleur et ses qualités gustatives (texture et goût) lui donnent toute son originalité et satisfont les segments du marché les plus exigeants.

### **Un instrument de développement en harmonie avec l'environnement**

La crevette de Nouvelle-Calédonie bénéficie de conditions environnementales remarquables, que les producteurs s'attachent à préserver. La filière de production, très professionnalisée, dispose d'un niveau de compétence technique élevé. Par respect pour l'environnement, les aquaculteurs se sont engagés à respecter un mode de production peu intensif, qui limite la taille des exploitations et la densité de crevettes dans les bassins. Ceux-ci sont alimentés en eau naturelle du lagon, l'utilisation des engrais chimiques, des pesticides et des antibiotiques est formellement proscrite. Pour protéger l'écosystème calédonien, la surveillance du milieu et l'impact de l'activité s'effectuent en collaboration avec les organismes de recherche (Davar, IRD, Ifremer, Institut Pasteur).

### **Des résultats au service du développement de la Nouvelle-Calédonie**

---

#### **Aquaculture et développement durable**

Les résultats encourageants obtenus par l'aquaculture calédonienne ont été rendus possibles grâce à la solidarité de l'ensemble des acteurs de la filière. Essentiellement installée dans les zones improductives, non utilisées par d'autres activités, l'aquaculture est un facteur reconnu de rééquilibrage économique de la Nouvelle-Calédonie. Les emplois nouveaux, souvent non qualifiés, sont situés en zone rurale, en majorité dans le nord de l'île, où ils contribuent au développement économique et social des tribus isolées. L'accroissement de la production s'accompagnera de la création d'emplois et de richesses qui bénéficieront en quasi-totalité aux habitants de la « brousse calédonienne ».

#### **Des clients partenaires**

L'environnement aquacole mondial et les caractéristiques de la production calédonienne (des volumes limités, des coûts élevés) ont conduit la Sopac à mettre en place une stratégie commerciale de partenariat avec ses clients. Ceux-ci acceptent en effet de payer les produits calédoniens plus chers que le prix du marché en échange d'une qualité garantie et de l'exclusivité sur leur marché. Cette politique commerciale permet à la Sopac de vendre plus de 85 % de la production calédonienne à l'exportation, devenant ainsi le premier exportateur agro-alimentaire de Nouvelle-Calédonie.

## Le soutien d'une filière aquacole par la recherche : l'exemple de la conchyliculture française et du programme Morest (Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas*)

J.F. Samain, P. Boudry, L. Dégremont, P. Soletchnik, M. Ropert, E. Bédier, J. Moal, M. Mathieu, C. Lambert, J.M. Escoubas, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, T. Burgeot, C. Bacher

Ifremer, Centre de Brest, laboratoire de physiologie des Invertébrés, Technopole Brest Iroise, BP 70, 29280 Plouzané, France  
Jean.Francois.Samain@ifremer.fr

### Résumé

Des travaux isolés portant sur les mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* et rapportés dans la littérature mondiale depuis les années 1940 (Japon, USA, Europe) n'ont pas permis de comprendre le phénomène. Des hypothèses suggérant des interactions complexes entre l'environnement, l'hôte et le pathogène ont été alors formulées, nécessitant de rassembler des spécialistes de disciplines complémentaires (génétique, physiologie, immunologie, pathologie, écotoxicologie et environnement) pour étudier ensemble ce phénomène sur un même matériel biologique.

Les principaux résultats des travaux des deux premières années du programme Morest et les hypothèses qui en découlent sont présentés ici. Les questions posées par les mortalités saisonnières, estivale et hivernale, des crevettes *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie suggèrent aussi la nécessité de construire un modèle d'interactions comprenant l'animal, l'environnement et les pathogènes.

Dans les deux cas, les outils et les concepts sont très proches et ils s'adressent aux mêmes spécialistes. Enfin, la forte implication du secteur de production dans ces deux élevages est un atout qui permet d'apporter un nombre important d'observations sur le terrain.

### Abstract

Summer mortality of *C. gigas* oyster was studied and reported in world literature for the last 60 years (Japan, USA, Europe). However no final interpretation was available and complex interactions were suggested between environment, oysters and pathogens. Such multifactorial event led us to organize a research network (including genetics, physiology, immunology, pathology, ecotoxicology, environment) collaborating on the same biological material.

The main results from the first two-year study of the Morest project and the resulting hypotheses are reported in this paper. Questions arising from the summer and winter mortality of the shrimp *L. stylirostris* in New Caledonia suggest to consider as well the possible interactions between the shrimp, environment and pathogens. The same disciplines and specialists will be involved on a similar concept and with similar tools. At last, the large contribution and interest of growers in these two productions is also a great advantage to complete the scientific and technical panel with a large scale experience and observations.

## Introduction

---

Les mortalités massives anormales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* en élevage au cours de la période estivale ne sont pas un phénomène nouveau, puisque de tels épisodes ont été décrits dans la littérature depuis plus de 50 ans. En effet, les premières observations datent de 1940 au Japon (Koganazawa, 1975). Ces mortalités estivales ont lieu entre juin et septembre avec des pertes pouvant ponctuellement dépasser 50 % de la population. Elles sont souvent associées à des épisodes de températures élevées, dans des baies peu profondes, riches en sels nutritifs et en phytoplancton. Selon les sources de littérature ou de la profession, il peut s'agir de juvéniles ou au contraire d'animaux les plus gros de un à deux ans, proches de la commercialisation (Glude, 1975). En France, ce phénomène touche les cheptels de *Crassostrea gigas* en élevage depuis quelques années (1988→ et 1993→) pour les juvéniles et les adultes (Gouletquer *et al.*, 1998).

D'une façon générale, il n'a pas été possible à ce jour d'expliquer de façon systématique les épisodes de mortalité anormale de *C. gigas* par un agent pathogène et de reproduire la maladie (que ce soit un virus ou une bactérie) et ce, malgré de nombreuses années d'observations et différents lieux d'élevage. Pour expliquer ce phénomène, il semble qu'il soit nécessaire de faire appel à un mécanisme d'interactions multifactoriel plus complexe. Des pathogènes opportunistes, dont la pathogénicité serait variable selon les conditions environnementales, ne seraient capables d'infecter l'huître que dans des conditions particulières où son état physiologique serait affaibli. Ces conditions dépendraient à la fois de son cycle vital et des conditions de son environnement. L'hypothèse de travail serait alors que la mortalité résulte des interactions entre trois compartiments : l'environnement, l'hôte et des pathogènes opportunistes.

Du côté de l'hôte, beaucoup d'auteurs relient les phénomènes de mortalités au processus de reproduction chez *C. gigas*, que ce soit chez les juvéniles lors de leur première maturation ou bien chez les adultes (e.g. Mazurié *et al.*, 2000; Myrand *et al.*, 2000; Heude-Berthelin, 2000; Gouletquer *et al.*, 1998; Soletchnik *et al.*, 1996; Perdue, 1983; Maurer *et al.*, 1986). L'hypothèse d'un effort de reproduction trop « coûteux » est souvent avancée (e.g. Myrand *et al.*, 2000). En période active de reproduction, toute l'énergie acquise est allouée au compartiment germinal, les réserves sont épuisées, la demande métabolique est à son maximum et, par conséquent, l'animal n'a plus les moyens énergétiques pour lutter contre une agression quelconque provenant du milieu (excès de température, nourriture déficiente, zootechnie contraignante, attaque parasitaire...).

Enfin, des expériences de croisements à petite échelle semblent montrer une composante génétique pour la survie. D'un point de vue théorique, une amélioration génétique de la survie du fait d'une sélection permanente et naturelle pour ce caractère n'apparaît pas facile à comprendre, ce qui a justifié de reprendre ces expériences à grande échelle (Dégremont, 2003).

## Objectifs et structure du projet

---

Dans ce projet, on s'attachera en priorité à établir le lien entre la génétique, la reproduction, l'immunologie, les stress, l'environnement et les pathogènes. L'étude de



ces interactions devrait permettre de vérifier si les mortalités peuvent résulter de seuls déséquilibres physiologiques ou si l'hypothèse de pathogènes opportunistes se vérifie.

Pour étudier la complexité de ce schéma d'interactions, il est nécessaire de rassembler les spécialistes des différentes disciplines concernées (génétique, physiologie, immunologie, pathologie, écotoxicologie, écologie, épidémiologie) sur une même stratégie permettant de caractériser les différentes composantes du phénomène. Par ailleurs, il est nécessaire de travailler avec du matériel biologique dont on connaît bien l'historique. Pour ce faire, on comparera toujours des animaux représentatifs de la population naturelle, mais issus des techniques d'écloserie, avec du naissain de captage naturel. Les étapes prévues dans le programme vont permettre de :

- développer, valider, mettre au point les outils adaptés dans toutes les disciplines. L'évolution rapide des outils et des technologies (écloserie, biologie moléculaire, cytomètre de flux, capteurs, modèles, etc.) constituera une avancée par rapport aux études précédentes ;
- bien cerner la question par comparaison *in situ* de sites ateliers représentatifs à la fois de situations écologiques significativement différentes et d'écosystèmes conchylicoles. Ces observations devraient permettre de révéler les principaux facteurs associés aux mortalités et de comparer les performances de familles génétiques avec des naissains de diverses origines naturelles ;
- découpler les facteurs ainsi associés et hiérarchiser leur impact en reproduisant une partie du phénomène en expérimentation contrôlée afin d'aboutir à un modèle d'interactions ou une classification des facteurs de risque ;
- réaliser une étude épidémiologique à partir des données existantes sur l'environnement (réseaux d'observation Répamo, RNO, Réphy), adapter les modèles physiques d'écologie côtière pour cerner de façon précise les situations des différents sites géographiques, leur variabilité annuelle et, à long terme, d'en apprécier l'effet possible sur les mortalités (production primaire, apports des bassins versants...).

L'identification des facteurs de risque, leur hiérarchisation et le modèle d'interactions devraient permettre de mieux expliquer les crises et, en conséquence, de trouver des moyens de les prévenir. C'est pourquoi des expérimentations pour sortir de la crise seront développées tout au long du programme. Elles devraient permettre de tester, à une échelle proche de celle des élevages, divers scénarios possibles. Des solutions de sortie de crise peuvent être envisagées dans les domaines suivants : en génétique, si une composante est montrée ; en zootechnie, si par des pratiques culturales il est possible de réduire les phases de risque ; dans le domaine de l'environnement, s'il s'avère que des activités anthropiques contribuent au phénomène. Enfin, des méthodes de prévision et d'alerte devraient pouvoir se dégager, si une partie du phénomène résulte d'évènements climatiques prévisibles mais sur lesquels il est impossible d'agir.

## Résultats

---

Après deux années d'étude selon cette approche, il est déjà possible de hiérarchiser un certain nombre d'évènements.

### Caractérisation *in situ* des mortalités

Une température au moins égale à 19 °C apparaît comme le premier facteur à partir duquel se déclenchent des mortalités « anormales ». La mortalité peut alors apparaître sous 8 à 10 jours. On explique ainsi les décalages des épisodes de mortalités observés en mai-juin dans le sud (Arcachon), en juillet (Marennes), au début d'août (sud Bretagne) et fin août (Normandie). Une fois le phénomène amorcé, il peut continuer même si la température diminue ensuite.

La reproduction apparaît comme un second facteur de risque. La durée de ce risque peut être très courte dans les sites du sud où la mortalité sévit pendant 2 à 4 semaines et semble disparaître après la ponte. Au contraire, cette phase peut se prolonger, selon les années, dans les sites plus froids où la ponte n'est que partielle. Dans ce cas, la mortalité peut durer plusieurs mois, pendant la phase de régression des gamètes et parfois au-delà. Au cours de la période de reproduction, c'est la température de 19 °C qui déterminerait le risque. Il n'y a donc pas de phase précise dans la reproduction qui soit plus sensible, la température pouvant atteindre la valeur critique durant la vitellogenèse ou même la ponte. De plus, les huîtres triploïdes issues de croisements  $4n \times 2n$ , et qui ne mûrent pas, semblent échapper à la mortalité, tandis que celles qui mûrent sont atteintes, ce qui confirme que la reproduction augmente le risque.

La génétique est un troisième domaine à prendre en compte : des croisements biparentaux en première génération effectués à grande échelle (45 familles testées sur 3 sites) montrent que certaines familles apparaissent toujours sensibles (S) sur tous les sites ateliers et d'autres semblent toujours plus résistantes (R). Des croisements de deuxième génération en sélection divergente (SxS et RxR) montrent que ce caractère est transmissible avec un niveau élevé d'héritabilité réalisée. Cependant, l'expression de la mortalité ne se produit pas avec la même intensité selon les sites, ce qui montre l'existence d'un risque environnemental.

Pour étudier leurs caractéristiques, ces huîtres sont mises en élevage sur un même site dans le sud de la Bretagne (Auray) en 2002. Les huîtres R ont une dynamique de reproduction normale et pondent alors que les S, qui investissent un peu plus dans la reproduction, ne pondent pas et une partie importante meurt dès la température 19 °C pendant la phase de vitellogenèse. On dispose là d'observations biologiques très intéressantes dont il faudra analyser l'origine par les méthodes allant de l'écophysiologie à la physiologie fonctionnelle.

En plus de la composante environnementale révélée par les familles génétiques, il existe d'autres circonstances dans lesquelles les mortalités ne sont pas observées dans l'étang de Thau et à la nourricerie de Bouin où les huîtres sont élevées dans des raceways en béton et nourries *ad libitum* et mûrent en conséquence. Bien que la température dépasse largement 19 °C, les mortalités estivales ne sont pas observées. Dans ces deux exemples, les huîtres, toujours immergées, sont relativement loin du sédiment et sont dans des milieux relativement stables du point de vue trophique. Cependant, dans cette situation, une simple manipulation en phase de risque génère des mortalités. Ces observations suggèrent que, si la température et la reproduction constituent des phases de risque, d'autres paramètres que l'on peut classer comme responsables de stress environnementaux sont nécessaires pour faire basculer le système. Parmi la diversité des stress envisageables, un exemple intéressant est la proximité du sédiment : des huîtres positionnées à 15 et 70 cm

du sédiment dans le bassin de Marennes-Oléron montrent que la proximité du sédiment augmente fortement le risque de mortalité. Seules les huîtres triploïdes ne meurent pas à 15 cm, et leurs hémocytes présentent une forte activité de phagocytose contrairement aux huîtres diploïdes qui sont en phase de reproduction et ne semblent pouvoir se défendre. Ce résultat confirme à la fois un risque lié à une composante environnementale et la perte de capacité de défense des huîtres pendant leur reproduction. D'autres stress possibles doivent être envisagés, tels que celui de l'émersion associé à celui de la température, les stress d'hypoxie et d'hyperoxie, ou encore des stress dus à des substances toxiques issues directement ou indirectement d'activités anthropiques.

### **Découplage expérimental des paramètres**

- **Nutrition et effort de reproduction :** les relations entre le niveau de la ressource trophique, l'effort de la reproduction et la sensibilité aux infections ont été recherchées. Trois niveaux trophiques ont été appliqués à des huîtres soumises en bassins contrôlés à un cycle thermique de type « Marennes ». Les résultats montrent que l'effort de reproduction est proportionnel au niveau de nourriture. Des mesures de bilan de croissance (« scope for growth ») font apparaître un déficit énergétique pour les huîtres les plus nourries en fin de gamétogenèse. Des infections expérimentales par injection de pathogènes opportunistes (vibrioses isolés d'huîtres moribondes) montrent alors que les mortalités affectent d'autant plus les huîtres que le niveau nutritionnel, l'effort de reproduction et le déficit énergétique qui en résultent sont élevés. Le niveau trophique est donc une variable majeure de risque dans ce système biologique, puisque l'effort de reproduction lui est associé. Il reste à vérifier l'origine de la fragilité des huîtres à l'infection en focalisant ce travail sur la réponse immunitaire.

- **Recherche et caractérisation de pathogènes :** des tentatives d'isolement de pathogènes à partir d'huîtres moribondes ont conduit à isoler un grand nombre de vibrios qui ont été caractérisés par biologie moléculaire (ARN 16S et gyrase). Leur pathogénicité a été testée soit par injection soit par cohabitation d'huîtres contaminées avec des huîtres saines. Plusieurs groupes ont été identifiés, à l'intérieur desquels les souches présentent des virulences variables. Ceci confirme bien la difficulté de reproduire la maladie de façon fiable, mais ouvre des voies de recherche sur l'origine génétique ou environnementale de la variabilité de la virulence. De même, si un virus Herpes est parfois trouvé, il ne représente que 10 % des observations et une éventuelle action combinée avec les vibrios est à étudier.

### **Construction d'un modèle d'interactions hiérarchisées**

Ces premiers résultats permettent de construire un schéma d'interactions qui à la fois les résume et formule un certain nombre d'hypothèses de travail à vérifier (fig.). On peut proposer deux scénarios : l'un dans lequel l'environnement a peu d'effet sur le système biologique, l'autre dans lequel, au contraire, certains facteurs environnementaux ont un effet prépondérant. Ainsi, comme l'effort de reproduction est une phase de risque en amont, les apports de nutriments, qu'ils soient des sels nutritifs ou qu'ils dérivent de la reminéralisation de la matière organique, doivent être introduits dans le modèle. Si ces apports sont modestes, on peut imaginer que



les maillons qui en dépendent seront peu amplifiés. Il en sera ainsi de la production primaire, et donc de l'effort de reproduction qui affecterait peu l'immunité. Dans l'hypothèse inverse, la production primaire qui en résulterait aurait pour conséquence une reproduction plus intense et une immunité fragilisée des huîtres, permettant leur infection.

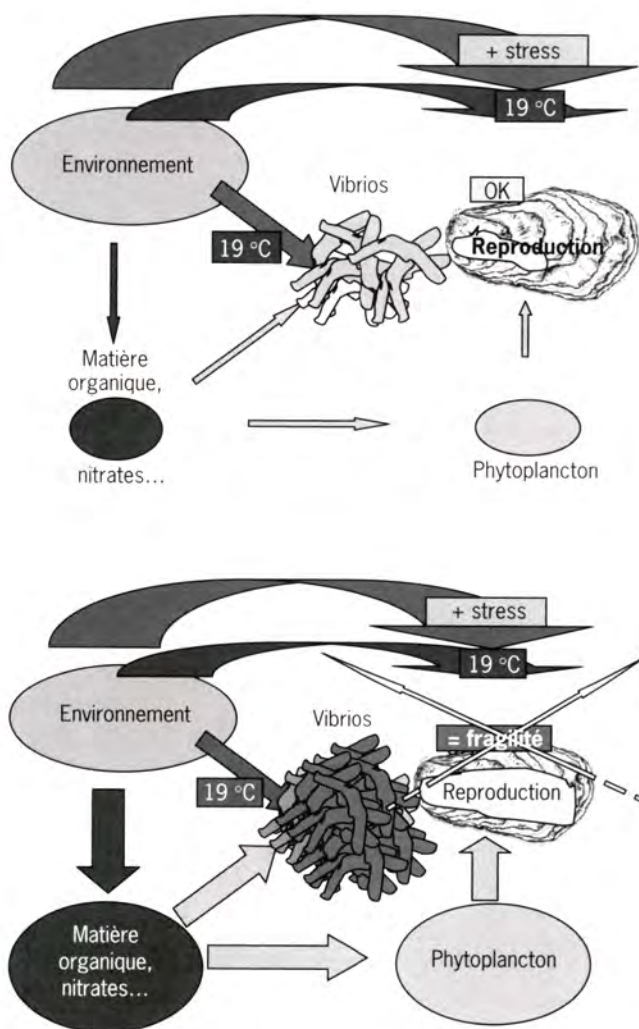


Schéma des hypothèses d'interactions à partir des connaissances acquises dans la littérature et après deux ans d'étude Morest. Les travaux engagés visent à valider et compléter ces interactions. En haut, conditions d'apports limités de nutriments et de matière organique conduisant à une situation sans mortalité estivale. En bas, conditions d'apports importants de nutriments et de matière organique conduisant à des mortalités estivales.

Du côté des pathogènes, les apports de matière organique ont aussi un effet sur la microflore bactérienne. Si les apports sont mineurs, il en résulterait peu de prolifération bactérienne, peu de production de sels nutritifs ou de produits inter-

médiaires (dérivés toxiques?), peu d'activation de facteurs de virulence. Dans le cas inverse, la matière organique pourrait induire un effort de reproduction plus intense *via* les apports de sels nutritifs qui en sont à l'origine. La reminéralisation de la matière organique pourrait s'accompagner d'épisodes d'hypoxie partielle ou produire des dérivés toxiques dans le sédiment qui seraient autant de stress. Elle pourrait aussi favoriser la croissance de vibrios, et donc augmenter la probabilité de la présence de pathogènes, et agir sur l'expression de certains facteurs de virulence. L'explication de l'existence d'une température critique de 19 °C doit alors s'analyser sur ces différents aspects : la biologie de l'hôte (par exemple la demande métabolique), la biologie des pathogènes (croissance, expression de facteurs de virulence), les processus de reminéralisation hypoxique dans le sédiment, associés aussi à une microflore particulière, pourraient être sensibles à cette température. La construction du modèle d'interactions génère plusieurs voies de recherche à engager en priorité et permet, dès à présent, de formuler des possibilités de sortie de crise.

### **Premières hypothèses de solutions de sortie de crise**

- **Solutions génétiques** : le fait d'avoir une composante génétique forte permettant de distinguer des souches R et S avec une forte héritabilité de ce caractère, conduit à envisager une méthode de sélection appropriée. Par ailleurs, la compréhension de l'origine de cette résistance est aussi une priorité importante, puisqu'elle répond à un mécanisme complexe d'interactions dont au moins l'un des éléments est une étape décisive ayant une composante génétique transmissible. Ces travaux devraient avoir aussi des retombées en matière de sortie de crise. La réduction de l'effort de reproduction est une autre voie possible qui peut être obtenue par la production d'huîtres triploïdes issues de croisements  $2n \times 4n$  puisqu'elles sont en principe stériles. Les producteurs l'ont déjà mise en œuvre et les limites de cette technique sont à l'étude.
- **Solutions zootechniques** : la diminution de l'accès à la ressource trophique pendant la période de vitellogenèse est aussi une possibilité. Des premiers essais de transfert d'huîtres d'une zone riche en nourriture vers une zone moins riche d'avril à septembre ont permis d'obtenir une excellente réponse. D'autres modalités similaires sont en cours d'étude (réduction de l'accès à la ressource par la position des huîtres sur l'estran, par la densité d'huîtres par poche...). Mais il faudra veiller à la récupération à l'automne du déficit de croissance pour que les animaux retrouvent une taille normale à l'entrée de l'hiver.
- **Solutions environnementales** : à ce stade du programme, nous n'avons pas encore de données sur ce point. Cependant, il est déjà évident que la définition de limites admissibles de rejets, comme ceux issus des bassins versants, devra être établie si un effet de ces bassins était démontré dans les mortalités.
- **Solutions de veille et d'alerte** : ces solutions résulteraient de l'effet de variables climatiques. Ainsi, il est déjà possible, d'après les courbes de montée de la température de l'eau de mer, de prédire chaque année pour chaque bassin conchylicole, la date à partir de laquelle le risque est maximum.

### **Conclusion : pourquoi Morest et Désans ?**

---

Les questions posées par les mortalités saisonnières, estivale et hivernale, de crevettes en Nouvelle-Calédonie se rapprochent de celles posées par l'huître creuse en été en France. En effet, dans la majorité des cas, pour le syndrome d'hiver, le schéma est proche de celui de pathogènes opportunistes bénéficiant de conditions environnementales limites pour l'hôte. Dans le cas des mortalités estivales, même si un pathogène vrai est identifié, il ne semble sévir que dans une seule exploitation, alors qu'il est présent dans d'autres sites mais non associé à des mortalités. Ces données suggèrent donc la nécessité d'envisager un modèle d'interactions comprenant l'animal, l'environnement et les pathogènes.

Bien que les situations ne soient pas identiques (par exemple, les élevages de crevettes portant sur des juvéniles, tout le volet relatif à l'allocation d'énergie pendant la phase de reproduction n'est pas pertinent, mais en revanche les conséquences des mues, phases de fragilité accrue, devront être analysées dans le détail), les outils d'étude qui sont utilisés pour une espèce, ou qui doivent être développés, feront appel à des concepts très proches et aux mêmes spécialistes. Enfin, la forte implication du secteur de production dans ces deux élevages est un atout qui permet d'apporter un nombre important d'observations sur le terrain. Ces observations compléteront les études *in situ* et doivent permettre d'élaborer dans les filières un bilan épidémiologique de l'effet des conditions environnementales et des pratiques zootechniques mises en œuvre sur les mortalités observées.

Dans ce sens, la construction d'un projet pluridisciplinaire s'avère indispensable pour les mortalités de *L. stylirostris*. La construction du projet Désans selon une stratégie proche de Morest favorise la coopération entre les acteurs des deux projets et en augmente les chances de succès. Le potentiel humain présent en Nouvelle-Calédonie sur la crevette doit donc être considéré comme une partie du dispositif global fédéré sur ces deux questions par l'Ifremer (environ 55 personnes à temps plein travaillent aujourd'hui sur Morest).

## Le programme Désans (Défi Santé *Stylirostris*) : une démarche comparable au défi Morest appliquée à la filière crevette calédonienne

Y. Harache, A. Herbland

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Yves.Harache@ifremer.fr

### Résumé

L'aquaculture calédonienne, qui a produit près de 1 900 tonnes de crevettes en 2002, est restée à l'abri des principales maladies virales affectant l'activité dans de nombreux pays d'Amérique latine ou d'Asie. Cependant, la production n'est pas exempte de difficultés et se trouve confrontée depuis plusieurs années à des mortalités saisonnières. Celles-ci ont débuté par des mortalités hivernales importantes, affectant la totalité des fermes, caractérisées comme « syndrome 93 ». Ces mortalités sont dues à *Vibrio penaeicida*, bactérie pathogène pour les crevettes mais sans risque pour le consommateur. Plus récemment (1997), un second germe pathogène, *Vibrio nigripulchritudo* est apparu dans une ferme, où des mortalités estivales interviennent de façon systématique. Ce second phénomène est resté limité à cette seule ferme. Ces contraintes créent des difficultés d'organisation de la production et pèsent sur la rentabilité de la filière.

La recherche de solutions passe par une meilleure compréhension des causes d'apparition des mortalités. Si les fluctuations de l'environnement des bassins semblent jouer un rôle important, ces périodes critiques de l'élevage ne peuvent être expliquées par l'action d'un seul facteur, mais mettent en jeu de nombreux paramètres. La similitude des observations faites à l'occasion des mortalités saisonnières de l'huître creuse en France métropolitaine a conduit à établir un parallèle entre les deux phénomènes. Dans les deux cas, huîtres comme crevettes, c'est l'interaction entre les facteurs environnementaux, l'état physiologique de l'animal et les *Vibrio* pathogènes qu'il faut étudier pour comprendre l'enchaînement qui conduit à amoindrir la résistance des animaux et finalement à la mortalité d'une partie de la population.

Le département Ressources aquacoles de l'Ifremer a développé le programme Morest pour répondre aux interrogations de la profession conchylicole, dont les premiers enseignements - résultats de deux années de travail - ont été présentés dans la communication précédente.

La convergence des observations faites sur les élevages de crevettes a conduit à développer une approche comparable, aboutissant au programme Désans (Défi Santé *Stylirostris*) qui a été conçu sur une base pluri-annuelle et multidisciplinaire, de manière à pouvoir croiser les résultats des différentes spécialités : zootechnie, écologie, nutrition, physiologie, immunologie, pathologie et génétique.

L'approche consiste à mieux documenter les conditions accompagnant la dynamique des mortalités observées au cours des élevages en s'appuyant sur la comparaison de plusieurs fermes. Elle est complétée par des expérimentations visant à tester les hypothèses émises à partir des résultats de ces suivis. Parallèlement, et sans



attendre une explication générale des mortalités, des solutions de « sortie de crise » seront recherchées, comme par exemple l'amélioration des pratiques zootechniques, la satisfaction des besoins nutritionnels spécifiques résultant de conditions d'environnement particulières et l'étude de la base génétique de la résistance aux pathogènes.

On espère ainsi que, comme pour le programme Morest, tout en poursuivant ses objectifs propres, chaque discipline apportera sa contribution à la construction du scénario explicatif global des syndromes 93 et d'été, et contribuera à la pérennité et au développement de la filière crevette, composante maintenant importante pour l'économie de la Nouvelle-Calédonie.

### Abstract

---

Shrimp culture in New Caledonia has produced nearly 1 900 tons in 2002. The activity remains free of the major viral pathologies affecting most producing countries in South America or Asia. However, the industry has been affected over the last years by seasonal mortalities. Starting during the cold season in 1993, these mortalities described as the "Syndrome 93" are due to outbreaks of *Vibrio penaeicida*, a bacteria pathogenic for shrimps but harmless for human consumption. More recently, a second bacteria: *V. nigripulchritudo*, has been found associated with summer months mortalities in a unique farm, where significant mortalities affect all ponds every year since its apparition. The phenomenon remains restricted to this unique site. These two constraints create seasonal bottlenecks for the production, and affect negatively the profitability of the industry.

The search for appropriate solutions requires a better understanding of the causes triggering the apparition of mortalities. Environmental fluctuations appear to play an important role but are probably only one of the many possible explanatory factors. Similarities with the summer mortalities observed in the French oyster industry led to establish a parallel between the two phenomena. In both cases, oysters and shrimps, the complex interaction between environmental factors, the physiological status of the animal, and the dynamics of *Vibrio* development have to be considered together, to better understand the reasons of a decrease of animal resistance to stress and the apparition of significant mortalities.

The Aquaculture Department of Ifremer has developed the specific Morest programme to bring answers to the questions raised by the oyster mortalities. The preliminary results of two years of investigations have been presented in the previous communication. Observations made in shrimp farms led to propose a similar programme Désans (possibly translated as *Stylirostris* Health Challenge), based on a multidisciplinary approach associating rearing technology, pond ecosystem studies, shrimp ecophysiology and immunology, nutrition, pathology and genetics.

The approach proposed consists in a more precise description of the multifactorial conditions preceding the dynamics of mortalities, by a comparative approach between two sites. These observations are then associated with experimental procedures for testing the different hypotheses resulting from observation. In the mean time, potential solutions to improve the global performances will be explored: improvement of rearing procedures, specific seasonal nutritional requirements and genetic base of the resistance to pathogens.

It is thus expected that, as for the Morest programme, each research speciality, will bring its contribution to a global explanation scheme of the seasonal syndromes, contributing to strengthen the sustainability of New Caledonian aquaculture, which represents now an important component of the country economy.

### **Introduction**

---

Les espèces aquatiques sont étroitement dépendantes des fluctuations du milieu dans lequel elles vivent, et il est fréquemment observé dans plusieurs productions aquacoles des difficultés saisonnières se traduisant par des périodes de fragilité des animaux, accompagnées de mortalités, parfois associées à des pathogènes : mortalités estivales de salmonidés en Bretagne, de bars en Méditerranée et d'huîtres sur le littoral atlantique (Samain *et al.*, cet ouvrage). Les élevages de crevettes de Nouvelle-Calédonie n'échappent pas à ces crises saisonnières, comme le montrent les mortalités observées dans certains élevages.

Si le rôle de la température de l'eau et de ses fluctuations semble *a priori* prépondérant, ces périodes critiques et les mortalités qui s'ensuivent ne peuvent généralement pas être expliquées par l'action d'un seul facteur. Dans les deux cas, huîtres comme crevettes, c'est l'interaction entre les facteurs environnementaux, l'état physiologique de l'animal et les *Vibrios* pathogènes qui peut apporter des éléments pour comprendre l'enchaînement des phénomènes qui contribue à la diminution de la résistance des animaux et aboutit finalement à la mortalité d'une partie de la population.

### **Le contexte de l'aquaculture calédonienne**

---

#### **Historique et dynamique du développement**

L'aquaculture de crevettes en Nouvelle-Calédonie est le fruit de trente ans de recherches, menées en étroite collaboration avec les travaux du Centre océanologique du Pacifique (Cnexo puis Ifremer). Les institutions locales de Nouvelle-Calédonie se sont impliquées, dès le départ, dans le soutien à un programme de recherche-développement, conduisant à un développement raisonné de l'activité, impliquant tous les partenaires. Cette activité repose sur la production d'une seule espèce *Litopenaeus stylirostris*, crevette originaire d'Amérique centrale, dont l'aptitude à l'aquaculture a été testée au cours des années soixante-dix par rapport à celle des espèces locales capturées dans la mangrove. Elle s'est avérée bien adaptée aux conditions climatiques locales qui présentent des fluctuations saisonnières marquées entre l'été et la saison fraîche résultant des mois d'hiver.

Après une première série d'introductions, sous contrôle sanitaire, entre 1975-1978 (origine Panama et Mexique), puis une ultime importation en 1980 (origine Mexique), l'espèce a été reproduite localement sans aucune autre introduction ultérieure (Ottogalli *et al.*, 1988 ; Galinié, 1990). La Nouvelle-Calédonie a ainsi été le premier pays à mettre en place une aquaculture utilisant exclusivement les juvéniles d'écloserie produits à partir de géniteurs captifs, ce qui représente près d'une trentaine de générations en 2003, soit un début de « domestication ».

La production avoisine aujourd'hui près de 1 900 tonnes de crevettes, impliquant quatre écloséries et douze fermes de production, regroupées pour la plupart dans un groupement de producteurs (Groupement des fermes aquacoles). Les crevettes sont destinées principalement à l'exportation où la concurrence est sévère. La production calédonienne, du fait de coûts structurels de production élevés par rapport à la concurrence, a fait le choix de se positionner sur un produit haut de gamme, visant dès le départ les objectifs de sécurité alimentaire, de qualité et de respect de l'environnement.

C'est ainsi que l'activité répond à des normes de production extrêmement strictes (décrites par ailleurs) correspondant à un cahier des charges draconien. L'intensification (densité de post-larves ensemencées et biomasse instantanée) y est maintenue dans des limites prédéfinies et le recours à un certain nombre de produits, comme les engrais organiques et les antibiotiques, est totalement proscrit pendant la phase de grossissement. Les techniques utilisées pour la construction des fermes ont eu le mérite de préserver l'environnement côtier, en occupant les tannes argilo-sableuses situées en arrière de la mangrove.

#### **Des mortalités saisonnières**

- **Le syndrome 93** : la crevetticulture calédonienne, du fait de son insularité et de l'arrêt très précoce de l'introduction de matériel vivant, est restée à l'abri des principales maladies à virus, affectant les productions de façon quasi-systématique de l'Amérique du Sud à l'Asie.

Cependant, des mortalités saisonnières importantes sont apparues au cours de l'hiver 1993 dans la quasi-totalité des exploitations. Associées à des chutes brutales des températures à l'intersaison été-hiver (et parfois à l'intersaison hiver-été) et intitulées « Syndrome 93 », elles sont caractérisées par une pathologie bactérienne classique à *Vibrio penaeicida*, (Goarant, 2000). Ces mortalités sont apparues sur pratiquement tous les sites de production, de façon systématique, réduisant la survie du cycle hivernal aux alentours de 30-40 % (Mermoud *et al.*, 1998). Confrontée à ce problème récurrent, la quasi-totalité des fermes a opté pour une production saisonnière centrée autour des mois d'été, abandonnant le cycle de production hivernal. Ceci a des répercussions négatives sur l'organisation de la production : fourniture de post-larves pour toutes les fermes au même moment et mise saisonnière sur le marché.

- **Une vibriose de saison chaude** : plus récemment, au cours de l'été 1997, une nouvelle pathologie bactérienne est apparue dans une ferme de production au cours de la saison chaude. Elle est associée à un autre germe proche du précédent, *Vibrio nigripulchritudo*. Elle s'y est reproduite chaque année depuis, affectant tous les bassins ensemencés, et se soldant par des survies de l'ordre de 25 à 40 % seulement contre 60 à 80 % pour les autres sites. Elle n'a été observée à ce jour dans aucune autre ferme, bien que la présence de *V. nigripulchritudo* ait été mise en évidence sur certains sites (Goarant *et al.*, 2003).

## **Le programme Désans : Défi Santé *Stylostris***

### **Constat de départ**

Des recherches menées au laboratoire aquacole de Calédonie depuis plusieurs années, on peut dresser le constat suivant.

- Il n'apparaît pas d'explication simple aux phénomènes observés : si les études de pathologie expérimentale ont confirmé le caractère pathogène des deux germes incriminés (Goarant *et al.*, 2000), il est apparu que les approches restaient trop cloisonnées et ne permettaient pas une compréhension globale de la dynamique des phénomènes observés. Or, cette compréhension est nécessaire pour tenter d'apporter des solutions de « sortie de crise » utilisables pour la production.
- L'environnement des bassins d'élevage se caractérise par de fortes variations, constituant de probables sources de stress pour la crevette. En hiver, l'effondrement brutal des températures et les fortes fluctuations enregistrées, souvent associés à des fortes variations de blooms phytoplanctoniques, liées à des variations nyctémérales importantes de l'oxygène dissous et du pH, sont susceptibles d'affecter la résistance des animaux (Lefèvre, 1997 ; Lemonnier *et al.*, 2003b). Lors des mois d'été, la montée des températures, associée à un enrichissement du milieu en matière organique du fait des charges croissantes des animaux en élevage, est susceptible de créer des conditions favorables à la prolifération bactérienne. Mais l'appréciation de l'impact des pratiques culturales (renouvellement, gestion des blooms, oxygénation) reste encore empirique.
- Un pathogène virulent a été observé pour chaque mortalité saisonnière, mais les raisons de l'expression de la virulence restent peu documentées. Pour les mortalités de saison chaude, le même *Vibrio* a été observé - avec une faible prévalence - dans plusieurs autres sites sans qu'il y soit associé au déclenchement de mortalités anormales. La reproductibilité des crises sur un même site pose le problème de la rémanence de la souche, dans lequel le sédiment joue probablement un rôle important.
- Les réponses physiologiques de la crevette aux fluctuations amples et brusques de leur environnement sont mal connues, en particulier lors des périodes de mue (Le Moullac *et al.*, 1998 ; Mugnier & Soyez, 2001). Par exemple, il est probable que les besoins nutritionnels de *L. stylostris* varient au cours de l'année et qu'ils puissent être critiques en saison froide (Chim *et al.*, 2001). Enfin, on ne peut exclure une possible perte d'adaptabilité de la souche « calédonienne » due à la domestication sur une longue période à partir d'un effectif fondateur restreint (Goyard *et al.*, 2003).

Seule une approche coordonnée de l'ensemble des composantes de « l'écosystème aquacole » est susceptible de mieux cerner les interactions entre le milieu, la crevette et le pathogène, pour formuler de nouvelles hypothèses qui puissent être validées par une approche expérimentale, avant de pouvoir apporter des solutions concrètes. C'est cette démarche qui a prévalu dans la conception d'un programme d'une durée de quatre ans, intitulé Désans (Défi Santé *Stylostris*). L'ambition de ce programme est de fédérer les compétences existantes en Nouvelle-Calédonie, celle des laboratoires thématiques de l'Ifremer ainsi que des collaborations avec les équipes d'autres instituts de recherche.



### **Le contenu du programme**

Il a été conçu autour de cinq actions dépendantes les unes des autres et complémentaires dans la durée.

### **Mise au point et optimisation d'outils et méthodes**

Les points suivants ont été identifiés et mis en œuvre :

- établissement et entretien d'une banque de bactéries observées sur les sites d'élevage. Identification de souches de *Vibrio* ;
- standardisation de tests de pathogénicité et caractérisation expérimentale du pouvoir pathogène des souches ;
- acquisition de descripteurs de l'état physiologique et immunitaire des crevettes ;
- adaptation de dispositifs d'enregistrement en continu des paramètres du milieu.

### **Caractérisation du phénomène *in situ***

Un effort particulier sera dévolu à la description d'apparition des dynamiques de mortalités dans les bassins, en saison chaude comme en saison froide, en intégrant une approche pluridisciplinaire sur les points suivants :

- état de santé des crevettes (paramètres sanguins et nutritionnels, intégrité corporelle), par le biais d'échantillonnages réguliers en plusieurs points du bassin ;
- quantification de la dynamique d'apparition des pathogènes, dans l'eau d'arrivée, la colonne d'eau, l'eau interstitielle du sédiment, les crevettes (y compris les moribondes) ;
- étude des paramètres biotiques (plancton, méiofaune) et abiotiques (physico-chimie) du milieu d'élevage, avec enregistrement automatique et manuel de nombreux paramètres ;
- recensement détaillé de tous les éléments de la gestion technique de l'élevage : enrichissement, renouvellement, apport d'oxygène, alimentation, mortalité, etc.

**Syndrome d'été :** en accord avec les fermes, la première opération de suivi *in situ* a été consacrée à l'étude comparative de deux sites entre octobre 2002 et janvier 2003 : la ferme (A) subissant des mortalités récurrentes depuis 1997 et une autre proche (ferme B), utilisant des pratiques d'élevage et d'intensification comparables, mais n'ayant pas subi de mortalités. L'ensemencement des fermes a eu lieu le même jour avec des post-larves de même origine, et le même aliment du commerce a été utilisé. Chaque ferme a été suivie tous les deux jours en alternance avec intervention matin et soir de deux équipes du LAC. Le suivi s'est déroulé sans aucune interruption du 16 octobre 2002 au 7 janvier 2003.

**Syndrome 93 :** une opération du même type, enrichie de l'expérience de la première campagne et réduite aux paramètres les plus discriminants, est programmée de mars à juin 2004 à la station de Saint-Vincent où le Syndrome 93 apparaît régulièrement, comme dans toutes les fermes de Nouvelle-Calédonie. Elle pourra également faire intervenir des expérimentations sur le rôle et les effets de l'alimentation (productivité naturelle et aliments fonctionnels de saison froide), ainsi que l'observation comparative des performances de souches sélectionnées pour la résistance au syndrome et de témoins.

### Validation expérimentale des hypothèses

Cette phase du programme fera appel à des approches expérimentales, de type recherche agronomique, menées dans des bassins à fond de terre (comparaison de traitements entre bassins, en enclos ou en cages de petites dimensions) ou dans des bacs de petits volumes en conditions contrôlées.

Les objectifs de cette phase seront de décrire les réponses immédiates ou différées de l'hôte et des pathogènes aux variations qualitatives et quantitatives du milieu elles-mêmes liées aux variations climatiques au sens large et aux pratiques culturales. Il s'agira d'étudier les réponses physiologiques, immunitaires et métaboliques à l'effet des pathogènes, de l'alimentation et des variations d'environnement. Des analyses relevant de la bactériologie, de la biochimie, de la biologie moléculaire et de l'histopathologie permettront d'établir des relations avec les variables environnementales au cours de l'élevage.

### « Tâches » identifiées

- *Virulence des pathogènes*: support génétique de la virulence; organisation du génome des souches pathogènes; épidémiologie des gènes de virulence; pathogénie, dynamique d'infection et latence; conditions d'expression de la virulence et de la croissance.
- *Interactions entre paramètres environnementaux et crevettes*: effets de l'environnement sur l'état physiologique et la réponse immunitaire; quantification des réactions dues aux variations de l'environnement du bassin.
- *Bases génétiques du caractère de sensibilité des crevettes*: recherche de la variabilité individuelle ou familiale de résistance sur la souche calédonienne, ainsi que sur la future souche introduite et sur le produit du croisement des deux souches.

### Étude des solutions de sortie de crise

- *Pratiques culturales et gestion du bassin*: gestion de la densité, des déchets et des blooms; effet de l'alimentation: dopage des proies vivantes en saison froide, ou aliments fonctionnels de saison froide.
- *Génétique*: gestion de la variabilité résiduelle de la souche calédonienne; importation de « sang neuf », résistance individuelle ou familiale aux stress et à l'infection, sélection pour résistance au *Vibrio*; tests.
- *Évaluation des risques de mortalité en élevage*: synthèse des différents facteurs de risque; analyse des données environnementales et culturelles « historiques »; mise en place d'une base de données de suivi et diagnostic des « fermes » pour une meilleure gestion des crises.

### Valorisation des résultats

Un soin particulier sera apporté à la valorisation des résultats par :

- de fréquentes restitutions des résultats partiels et finaux lors de séminaires destinés aux utilisateurs;
- la publication dans des revues à comité de lecture;
- la confrontation avec la communauté scientifique internationale dans le cadre de colloques ou séminaires spécialisés;
- la stimulation d'actions de transfert et de validation à l'échelle de la production dans les domaines où les résultats le permettent.

## **Les conditions de réalisation**

### **Un dispositif rénové**

Sur la base du programme proposé, l'Ifremer a consenti un effort substantiel, permettant de compléter les compétences existantes en Nouvelle-Calédonie par l'affectation de personnel supplémentaire (passant de 17 à 28 personnes) et l'organisation du **laboratoire aquacole de Calédonie** autour de deux pôles, créés ou réhabilités à l'aide des financements du contrat de développement réunissant l'État français et les provinces de Nouvelle-Calédonie :

- l'unité de recherche du **LAC Saint-Vincent**, qui bénéficiera à l'échéance de 2005 d'installations totalement rénovées avec éclosérie expérimentale, halls d'aquaculture, salles d'infection expérimentale et laboratoires de physico-chimie et microbiologie ;

- l'unité de terrain du **LAC Koné** qui entrera en service en 2004. Sa fonction sera d'assurer l'interface avec les structures de production et les partenaires institutionnels (écoute, transfert, conseil, formation). Elle facilitera également les interventions rapides avec un laboratoire de pré-diagnostic et d'analyses physico-chimiques de base (cellule d'intervention). Elle aura également pour mission d'établir, en relation avec les utilisateurs, une base de données fonctionnelle permettant une meilleure réactivité en cas de problèmes ponctuels ou lors des périodes de crise.

### **Un accroissement des collaborations et partenariats de recherche**

La mise en œuvre de ce programme pluridisciplinaire rendra indispensable un élargissement des collaborations de recherche déjà existantes en Nouvelle-Calédonie : Institut Pasteur, Davar, IRD, UNC.

Mais il nécessitera également une implication accrue des laboratoires thématiques de recherche de l'Ifremer de France métropolitaine et de Tahiti en matière de connaissance des écosystèmes aquacoles (unité mixte CNRS/Ifremer du Crema L'Houmeau), de génétique et de pathologie (laboratoire de génétique et pathologie de La Tremblade), d'immunologie (unité mixte CNRS/Ifremer de la Drim Montpellier), de physiologie des Invertébrés (laboratoire de physiologie des Invertébrés de Brest), de nutrition (unité mixte Ifremer/Inra de nutrition de Brest) ainsi que d'élaboration-gestion de bases de données ou d'automatisation de saisie des paramètres d'environnement (TMSI Brest).

Au-delà du réseau Ifremer, il sera essentiel :

- de développer les collaborations avec un certain nombre de laboratoires universitaires métropolitains et, notamment, les universités et les laboratoires rattachés de Bordeaux-Arcachon, Paris VI-Banyuls, Grenoble, Bretagne occidentale, Caen ainsi qu'avec le Muséum national d'histoire naturelle ;

- d'établir ou de renforcer les relations avec les partenaires de recherche « régionaux » et, en particulier, avec l'Australie (CSIRO, AIMS, James Cook University, DPI Queensland...).

C'était l'un des buts recherchés de ce colloque Styli 2003.

## Physiological response to stress and health implications in Crustacea

M.R. Hall, E. de la Vega

Australian Institute of Marine Science, PMB No. 3, Townsville Mail Centre, Qld 4810, Australian Institute of Marine Science & University of Queensland, Department of Zoology and Entomology, Brisbane, Australia  
m.hall@aims.gov.au

### Abstract

Intensive aquaculture production systems greatly exceed the normal biological carrying capacity of natural ecosystems and can readily result in sub-optimal stressful environmental conditions, which in turn can induce physiological stress and the development of disease outbreaks with consequential production losses. In general terms stress generates variations in either the organism's external or internal environment with a resultant series of adaptive physiological changes to maintain or establish a preferential homeostasis. A "stressor" is any event requiring homeostatic processes beyond normal limits the activation of which may result in impaired long-term survival. Acute stress is typically overtly identifiable as it may lead to severe distress or death. In contrast, chronic, or sublethal stress, and the stressor, may be sufficiently subtle as to be only identifiable after sometime *via* reduced growth, impaired reproduction and predisposition to disease. For aquaculturists it is highly desirable to have quantifiable indicators (biomarkers) of chronic stress in order to implement appropriate management practices to minimize or eliminate the stressor and hence improve production efficiency. Although our knowledge of the interaction between stress, general physiological and immunological competence and disease is incomplete, present evidence indicates that exposure to chronic stress results in an increased susceptibility to disease. Once some individuals in a population are stressed and diseased there can be significant consequences for the whole population. To fully appreciate the importance of stress and health, a holistic approach is required. Nevertheless, stress biomarkers must be initially considered at the level of the smallest whole unit of homeostasis: the cell. In this review the cellular physiology of temperature, oxidative and osmotic stress is briefly examined followed by a review of cellular and higher order stress biomarker studies in Crustacea. This information is further examined in relation to stress and health and pathogenesis biomarkers, with emphasis on the immune system. Finally, the implications of stress on other organisms within the pond environment are also examined in relation to prawn health and survival and include the physiological consequences of both acute and chronic stresses of the microbial community and the "knock on" effect and impacts on the prawn population.

### Résumé

Les systèmes de production intensive en aquaculture excèdent largement la capacité biologique normale des écosystèmes naturels et peuvent facilement conduire à des conditions environnementales stressantes. De tels environnements peuvent induire un stress physiologique et le développement de maladies conduisant à des

perdes de production. En termes généraux, le stress provoque des variations dans l'environnement externe ou interne de l'organisme, et une série d'adaptations physiologiques pour maintenir ou établir une homéostasie préférentielle. Un agent stressant peut être défini comme tout événement requérant des processus homéostatiques au-delà des limites normales, et qui peut entraîner à long terme une baisse de la survie. Un stress aigu est typiquement identifiable car il peut conduire à une détresse sévère ou à la mort. Au contraire, un stress chronique ou subléthal, et l'agent stressant, peuvent être suffisamment subtiles pour n'être identifiés qu'après un certain temps à travers une croissance réduite, une reproduction diminuée et une prédisposition aux maladies. Pour les aquaculteurs, il est hautement souhaitable d'avoir des indicateurs quantifiables (biomarqueurs) de stress chronique pour pouvoir appliquer des pratiques de gestion adaptées afin de minimiser ou éliminer l'agent stressant et de fait améliorer la productivité. Bien que notre connaissance des interactions entre le stress jouant sur les compétences générales physiologique et immunologique et les maladies soit incomplète, les résultats actuels indiquent que l'exposition à un stress chronique résulte en une sensibilité accrue aux maladies. Lorsque des individus sont stressés et malades dans une population, il peut y avoir des conséquences significatives pour l'ensemble de la population. Pour apprécier pleinement l'importance du stress et de la santé, une approche holistique est nécessaire. Par exemple, si des organismes non cultivés dans un écosystème (bassin) deviennent stressés, cela peut induire une cascade d'événements conduisant à des mortalités accrues de l'organisme élevé (la crevette). Malgré tout, les marqueurs de stress doivent être initialement considérés au niveau de la plus petite unité entière d'homéostasie, la cellule. Le bioindicateur de stress idéal pour les aquaculteurs devrait avoir un temps de réponse court par rapport à l'action de l'agent stressant sur le système. L'éventail des biomarqueurs disponibles pour l'aquaculture de crevette sera revu, incluant la réponse transcriptionnelle, les transporteurs solutés, les molécules signal, les protéines du stress (heat shock proteins, osmotic shock proteins) et d'autres molécules. L'interaction entre stress et réplication virale sera brièvement examinée, en relation avec le virus ARN (Gill Associated Virus) supposé pathogène en Australie. Finalement, les implications du stress sur les autres organismes et cellules dans l'environnement du bassin seront aussi examinées en relation avec la santé des crevettes et leur survie. Seront incluses les conséquences physiologiques des stress aigu et chronique de la communauté microbienne, l'effet « coup de poing » et les impacts sur la population de crevettes.

## Introduction

---

A few species of penaeid prawns account for the majority of crustacean aquaculture production. Other groups under cultivation include freshwater crayfish and freshwater and marine crabs. Whereas there are commonalities, each species has its own unique evolutionary and life history and ideally should be cultivated under specific optimised environmental conditions. Economic factors, however, drive production systems to minimise production costs resulting in progressive development towards high-density production systems that have limited environmental configurations. Under high-density production systems, perturbation of factors such as dissolved gases, especially oxygen and carbon dioxide, and expo-



sure to dissolved and particulate metabolic wastes, can rapidly lead to a deterioration in the environment resulting in stress to the individuals, so compromising their health. Individuals that are compromised by stress may be at an increased risk from opportunistic parasites or pathogens and become diseased. Although a prawn farm is typically a monoculture with respect to the crop organism, it has a high degree of biodiversity in the water column and benthos, especially at the microscopic level. As it has been estimated that over half of the world's biodiversity is represented by either parasites or pathogens, the majority of which is microscopic, it is essential that measures be taken to manage stress to minimise the "periods of opportunity" for these organisms. To optimise production from anyone crop, aquaculturists need to manage the farm environment to maintain stress below levels that compromise the health of crop organisms and predispose them to disease or lower food conversion ratios (FCR) or growth. The management of the production environment can partially arise from the experience of the managers themselves, but for more extensive knowledge-based management, the development of quantifiable molecular and physiological biomarkers of stress to monitor the production environment is desirable (Adams, 1990).

Stress can be defined as any situation that changes the intracellular solute milieu of the cell so as to challenge macromolecular tertiary structure. Stress is level dependent and can be viewed as a cascade from molecular stress to physiological, organismal, population and environmental stress (Bijlsma & Loeschke, 1997). The original unit of response to a stressor is the cell that responds with changes in membrane trafficking (heat or thermodynamic stress), perturbations of cellular membrane integrity (oxidative stress) or ionic flux (osmotic stress). Specific stress can be due to factors which compromise the functionality of a limited subset of molecular processes within the cell. This results in the activation of cellular responses in an attempt to maintain homeostasis requiring energy expenditure over and above that necessary for normal metabolic activity, the orderly and programmed dismantling of the cell (apoptosis) or the decay, degradation and death of the cell (necrosis).

Organisms have evolved, to varying degrees, integrated and sophisticated mechanisms to cope with environmental stress. The development of stress biomarkers offers the potential to observe molecular and physiological alterations at the cellular or tissue level. Stress biomarkers can be highly specific and potentially allow the identification of the stressor or be more universal, integrating the spectrum of adverse effects. Nevertheless, general and specific stress responses are not necessarily mutually exclusive, as a complex interplay occurs between them resulting in a sophisticated coordination of the suite of stress responses available to the cell. It is this complexity that results in the difficulty of readily identifying the causative relationship between stress and its consequences, such as health, in organisms.

A major proportion of this review will address the known molecular responses to three specific classes of stress: temperature, oxidative and osmotic stress. Knowledge of these processes is fundamental for the basic understanding of the cellular responses and consequences involved in the response to stress. As most of the knowledge about stress physiology is from prokaryotes and eukaryotic cell cultures and/or mammals, it has necessitated reference to these organisms and literature. However, comparison with crustaceans must be made with caution as

much of our knowledge on molecular stress physiology is based on research that has been done with cell lines, most of which were undifferentiated and cancerous, while other studies used primary cultures of differentiated cells. Nevertheless, basic underlying cellular metabolic pathways exist and many of the molecular mechanisms that are activated at the time of stress are highly conserved in microbes, plants and animals and it may be assumed that similar mechanisms are operational in crustaceans.

### **Cellular stress physiology**

---

Cellular homeostasis involves maintaining the constancy of the internal environment. Due to their essential nature and role, proteins, which include all enzymes and many structural, contractile, transport, defence molecules as well as hormones, occupy a major proportion of the cellular volume. Their biological activity largely depends on the maintenance of the specific tertiary structure of the molecule that is maintained by hydrogen bonding, ionic and hydrophobic interactions and disulfide covalent bonds. Ribosomes produce proteins in a vectorial linear amino acid sequence with the resultant polypeptide chain obtaining a well-defined three-dimensional conformation before it is functional. *In vitro*, proteins linearized by a denaturant will, upon removal of the denaturant, collapse within milliseconds resulting in the burial of hydrophobic residues forming a secondary structure. Within seconds to minutes, the secondary structure folds further to form a tertiary structure with the major rate-limiting step being close to the final formation of the native tertiary state and attainment of functionality. Protein tertiary structure typically requires an amino acid domain of 100-200 residues. It was thought that proteins could obtain their tertiary structure, and form functional oligomers, in the same spontaneous manner within cells. However, the total concentration of proteins and other macromolecules in cells is on the order of 340 grams per litre (Hartl, 1996). This high concentration of macromolecules leads to molecular crowding and results in macromolecular associations that can lead to the collapse of cellular metabolic activity and death. During either protein synthesis or denaturation, the critical hydrophobic centers, which result in stable tertiary structure, are exposed to the immediate environment and tend to aggregate. Aggregation out competes correct folding and results in the loss of protein functionality. Nevertheless, newly synthesized proteins form functional tertiary and oligomer units within the confines of the cell. The binding of molecular chaperones prevents aggregation of the unfolded protein.

The eukaryotic cell is a highly organised compartmentalised system of organelles and membranes where most metabolic enzymes, even the so-called soluble ones, are bound and precisely located within the cell, with the enzymes operating within a specific microenvironment. Increases of ionic flux across cell membranes are particularly disruptive to protein tertiary structure and hence enzymatic activity and cellular activity. Upon sudden environmental changes and stress, cells respond by altering gene transcription with increased production of specific proteins. Under such conditions, inappropriate inter- and intra-molecular interactions may occur which may lead to protein denaturation, misfolding and aggregation. During the period of disruption, molecular chaperones are activated to protect the pro-

tein functionality in an attempt to return to homeostasis. Molecular chaperones are highly conserved in function and structure across evolution from prokaryotes to eukaryotes. Although they have an essential role during periods of stress, they are also essential for various stages of protein biogenesis and the regulation of their structure and function under normal physiological conditions. The molecular chaperones for proteins occur ubiquitously and although they were originally discovered in cells responding to stress, as selected chaperone expression was more dominant, they are essential for normal function throughout the cell cycle. They are a group of unrelated classes of proteins that, by controlled binding and release, facilitate folding, oligomeric assembly, and transport to a sub-cellular compartment or to disposal by degradation but are not part of the final functional protein structure. They play a key role in returning the cell to a homeostasis state upon exposure to stress.

### **Temperature stress**

---

Temperature is one of the most common causes of stress. Even with minor environmental changes, temperature can fluctuate rapidly, resulting in dramatic ecological alterations, or more gradually as it does on a daily and seasonal basis. Due to the high specific heat and thermal conductivity of water, the body temperature of marine invertebrates is equivalent to that of the surrounding environment. Variation in water temperature is a major cause of cellular disruption due to increased permeability of cell membranes. Although the most studied aspect of thermal stress is that of temperature shock due to increased temperature, there are also specific responses to cold shocks (Phadtare *et al.*, 2000).

After a sudden increase in temperature, a rapid, but transient activation of a number of genes with the production of specific proteins occurs with a concurrent repression of other pre-existing messages (Lindquist, 1986). This response is a ubiquitous protective and homeostatic cellular response to neutralise potential damage to proteins. In prokaryotes, approximately 50 heat-inducible proteins have been described (Yura *et al.*, 2000). Heat shock proteins (Hsps) are ubiquitous in prokaryotic and eukaryotic cells and are among the most well-conserved proteins known (Lindquist, 1986; McLennan & Miller, 1990). Amino acid sequences of some Hsps are 50% identical between *E. coli* and man. The primary functions of Hsps are to act as molecular chaperones, regulating protein homeostasis, directing the initial folding of other proteins at the ribosome and play an important role in protein-protein interactions, including folding and assisting in establishing proper protein conformation, and preventing inappropriate protein aggregation. Heat shock proteins are also essential in all eukaryotes in the refolding of unfolded proteins when they are partially denatured (Hartl, 1996; Cardenas *et al.*, 2000; Choresh *et al.*, 2001; Spees *et al.*, 2002). Other functions include tagging of proteins for rapid degradation, which is an indication of irreversible protein damage. Usually they are cytoplasmic proteins and they function in various intracellular processes. Multiple environmental stresses including trace metal exposure, organic pollutants, changes in temperature or osmolarity, hypoxia, anoxia, and exposure to ultraviolet radiation, have been shown to induce the expression of these proteins (Lewis *et al.*, 1999). Furthermore heat shock proteins are also synthesized during inflammation,

infection and malignant transformation. Nevertheless, heat shock proteins also play a role in normal growth and development (Lindquist, 1986). There are several families of heat shock proteins all of which are structurally unrelated (Young *et al.*, 2001), and largely classified by molecular weight. These include: Hsp60, Hsp70, Hsp90, and Hsp110 and those with small molecular weights (Lewis *et al.*, 1999). Heat shock protein 60 (Hsp60), also known as chaperonin, is one of the ubiquitous molecular chaperones involved in the regulation of protein structure and function under normal conditions and stress in all phyla (Downs *et al.*, 2001). It is known to bind target proteins to facilitate folding and assembly under normal conditions. Under stressful conditions, there is an increase in the production of damaged proteins, followed by the upregulation of Hsp60 (Choresh *et al.*, 2001). These functional characteristics make it a good potential biomarker to evaluate stress levels in many organisms.

Heat shock protein 70 (Hsps70) are the most highly conserved family of the Hsps (Lindquist, 1986; Lewis *et al.*, 1999). Hsps70 appear to have a general protective function of stress, acting as molecular chaperones and being involved in the refolding of partially denatured proteins (Chang *et al.*, 1999a; Choresh *et al.*, 2001; Spees *et al.*, 2002). Because Hsp70 is not usually detectable under normal conditions but accounts for a majority of the translational activity in cells exposed to environmental perturbations (Spees *et al.*, 2002), it has considerable potential as a stress biomarker.

Heat shock protein 90 (Hsp90), is approximately 90 kDa and is also known as Hsp82, Hsp83, or Hsp89. Hsp90 is the most abundant protein in the cytosolic fraction. Even though Hsp90 expression is induced by stress, its constitutive level in many cells may be as high as one or two percent of the extractable cellular protein (Lindquist, 1986) and it is often found in association with several cellular proteins, either enhancing or inhibiting their normal function (Lewis *et al.*, 1999). In virtually all cells, Hsp90 is abundant at normal temperatures and is further induced by stress such as heat (Lindquist & Craig, 1988), which also makes it a potential stress biomarker.

Heat shock protein 110 (Hsp110) is a member of the Hsp110/SSE subfamily of stress proteins whose members are structurally related to the Hsp70/BiP gene superfamily and include ATP-binding domains (Foltz *et al.*, 1993). Other members include the Osmotic stress protein 94 (Osp94) and isoforms of Hsp70. The Hsp110 family, also known as the Clp family, is composed of both constitutive and stress inducible members, which are essential for the disassembly of protein oligomers and aggregates. Hsp110 proteins have also been shown to have functions in stress tolerance, including temperature, osmotic stress, cadmium, and proteolysis. Hsp110 and Osp94 behave as heat shock proteins though they are regulated differently than Hsp70.

Small heat shock proteins (sHsps) are a small heterogenous family of ubiquitous and evolutionary conserved proteins. In most cases, sHsps are not present under normal conditions, and are only elicited in response to stress (Lewis *et al.*, 1999; Downs *et al.*, 2001). As in the case for Hsps, the sHsps are also named by their respective molecular weight and have molecular masses of between 15-30 kDa. As sHsps expression is temperature dependent they may be useful biomarkers of stress (Downs *et al.*, 2001).



Alpha-crystallin is composed of two types of between 15-30 kDa polypeptides, aA and aB, and is normally found as large heteropolymers with complexes ranging in size from 280 to > 10,000 kDa (de Jong *et al.*, 1993). During periods of stress and heat shock, the size of the aggregates may increase and redistribute from their normal cytoplasmic location to become associated with the nucleus, followed by their return to the cytoplasm during recovery (Voorter *et al.*, 1992). aB-crystallin is a stress inducible molecular chaperone and behaves in similar ways to small heat shock proteins.

Ubiquitin is a 76-residue protein found in most phyla and used in a process for marking proteins for rapid degradation (Downs *et al.*, 2001). This protein is induced by heat (Lindquist & Craig, 1988) and other forms of stress (Lewis *et al.*, 1999), and is involved in the non-lysosomal degradation of intracellular proteins in all eukaryotes. Ubiquitin production and conjugation are considered signs of irreversible protein damage since it is covalently bound to damaged or regulatory proteins (Spees *et al.*, 2002). Increased levels of ubiquitin indicate that a protein-denaturing stress is occurring, thus acting as a biomarker for individual stress (Downs *et al.*, 2001).

### **Oxidative stress**

---

Oxidative stress is not readily defined but in essence can be described as the development of an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS) and antioxidant defence mechanisms. Oxidative stress can cause damage to all the main molecular cellular components: DNA, proteins, carbohydrates and lipids. Whereas temperature stress mainly impacts on proteins, oxidative stress can severely disrupt cellular membrane integrity and hence is a particularly important form of stress.

Lipids are a major component of the membranes in eukaryotic cells and cell organelles. Membrane lipids contain large amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), containing two or more carbon-carbon double bonds, which are prone to oxidative deterioration by a process known as lipid peroxidation. Lipid hydroperoxides (LOOHs) are predominantly non-radical intermediates of lipid peroxidation and due to them being more polar than their parent lipids, they may disrupt cell membrane structure and function. Cholesterol derived hydroperoxides (ChOOHs), are useful biomarkers of oxidative stress to distinguish whether a primary reaction is due to oxyradicals or singlet oxygen.

Normal oxidase action of electron transfer in mitochondria or endoplasmic reticulum in eukaryotic cells may produce reactive oxygen species (ROS) that are potentially toxic. For example, the "oxidative burst" in phagocytic cells results from the rapid activation of NADP oxidase and the production of  $H_2O_2$ . In combination with one another or other reactive species there can be a dramatic toxic effect due to the reduction of  $H_2O_2$  by  $O_2^-$  and the production of the hydroxyl radical (HO). The superoxide radical ( $O_2^-$ ) can also oxidize biological substrates by near instantaneous reaction with the nitric oxide (NO) radical producing peroxynitrous acid (ONOOH) which is diagnostically indistinguishable from HO. Macrophages, neutrophils and endothelial cells produce peroxynitrous acid resulting in an equivalent reaction to the "oxidative burst" and may be important in

chronic inflammation. Ozone ( $O_3$ ) is a powerful non-radical oxidant that can produce free radicals and cellular damage, inducing cell membrane lipid peroxidation and enzyme inactivation as well as the induction of cytoprotective antioxidant enzymes (see below). There are no known enzymatic scavengers for ozone or singlet oxygen in certain molecular states but these may be neutralised by a variety of low molecular weight antioxidants, capable of donating an electron (hydrogen) to oxidize radicals into stable molecular products, and the antioxidant itself, into a radical of low reactivity.

Low molecular weight antioxidants whose exact role is less defined, include compounds produced *in vivo*, such as oestrogens, melatonin, melanins, histidine-containing dipeptides, coenzyme Q, lipoic acid and uric acid (Halliwell & Gutteridge, 2001). Others may be obtained in the diet and include ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and plant phenols. Additional antioxidants include butylated hydroxytoluene (BHT) and, paradoxically, nitric oxide, but only by itself and not after reaction with superoxide radicals and peroxyntrous acid formation when it is an extremely potent prooxidant.

Although oxygen is essential for aerobic organisms to survive, it is a toxic mutagenic gas and organisms can only survive in its presence if they possess antioxidant defences. The toxicity of oxygen is also managed by compartmentalisation in eukaryotic cells. The vast majority of oxygen, approximately 85-90%, is used by the mitochondria to produce over 80% of the ATP required by cells through a highly energy efficient electron-transport chain that utilises oxygen as the terminal electron acceptor. The sequestration of partially reduced oxygen is achieved by the terminal oxidase enzyme, cytochrome oxidase that has an affinity for oxygen that is so high that it can still function at an intercellular partial pressure of oxygen of less than 1 mm Hg. The low oxygen concentration reduces the likelihood of oxidative damage to the critical enzymes in the electron transport chain. Nevertheless approximately 1-3% of the reduced oxygen results in the formation of superoxide radicals that can damage and stress cells.

Oxidative stress can be induced solely by injury, which may then set off a cascade of events that induce disease. Injury can activate phagocytes resulting in "oxidative burst", the release of metal ions from storage sites stimulating ROS production, mitochondrial damage and superoxide radicals, stimulation of nitric oxide production, decomposition of peroxides and loss of antioxidant defence enzymes by cell leakage. If disease is induced, then the original agent was the injury with oxidative stress being secondary. On the other hand, oxidative stress may be the cause of tissue injury, in which case the ROS should always be present at the site of injury, the ROS formation time course should parallel tissue injury and direct application of the suspected agent should reproduce the injury. The challenge for the researcher is to discriminate which is the causative agent. Once the agent is identified, steps can be taken to manage or eliminate it.

Exogenous or endogenous peroxides can trigger a cellular apoptotic reaction. Apoptosis, also known as programmed cell death, is characterized by cell shrinkage, loss of plasma membrane asymmetry, protease and endonuclease activation and internucleosomal fragmentation of nuclear DNA. Cells that go through apoptosis do not elicit inflammation and are typically removed by phagocytosis. Mitochondrial events rather than nuclear ones mediate apoptosis. In contrast, necrosis (non-

programmed death) is characterised by cell swelling, lysis, random DNA fragmentation and elicit inflammation. Whether a cell survives or dies *via* apoptosis or necrosis depends on whether there is sufficient antioxidant capacity to prevent peroxide lesions or whether the cell can induce sufficient cytoprotective responses. There is no universal biomarker of oxidative stress, partially due to the diverse multiple pathways involved, although perhaps the most appropriate biomarker is the up-regulation of the antioxidant defence systems. Cells are protected from oxidative stress by a number of inducible systems that are, in the first instance, preventative but also include repair/excision of any lesions that may occur if the system is temporarily overwhelmed. For the most part, the systems depend on scavenging or inactivation of ROS or redox metal ions before lipid peroxidation occurs. Such processes are performed by a family of specific hydroxyl radical enzymatic scavengers and includes the superoxide dismutases (SODs), the mitochondrial manganese-dependent superoxide dismutases (Mn-SODs) and the cytosolic copper/zinc superoxide dismutases (Cu/Zn-SODs). Some Crustacea are an exception to the cellular localisation of these SODs as the blue crab (*Callinectes sapidus*) contains Mn-SOD in both the cytosol and mitochondria and does not possess any Cu/Zn-SODs (Brouwer *et al.*, 1997). Other SODs include the hydrogen peroxide scavenging mitochondrial/cytosolic glutathione peroxidases (GPXs) and peroxisomal catalases (CATs). Although the antibodies for SODs are typically raised against mammalian enzymes they cross-react to a significant degree so as to be useful in studies in marine species, including prawns (Downs *et al.*, 2001).

The main anti-oxidative enzymes are catalases which convert  $H_2O_2$  to  $O_2$  and  $H_2O$ , glutathione peroxidase which converts  $H_2O_2$  to  $H_2O$ , that is coupled to the oxidation of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), and superoxide dismutase, which converts  $O_2^-$  to  $H_2O_2$  (Dorval *et al.*, 2003). These enzyme systems are often used as an overall measure of oxidative stress even though they may only reflect that the normal oxidative stress mechanisms have been successful in protecting the animals from ROS and RNS damage and not that physiological damage has occurred.

Other measures of oxidative stress damage by ROSS and their by-products are based on DNA strand breakage (Collins *et al.*, 1996). A range of assays are available for the measurement of oxidative damage to lipids, specifically membrane lipids, lipoproteins or fatty acids, although no one method is an accurate measure of overall lipid peroxidation. The most direct method measures the loss of unsaturated fatty-acid side chains by HPLC or gas-liquid chromatography (GLC) (Rikans & Hornbrook, 1997). However, the most widely adopted methods measure total peroxides.

### **Osmotic stress**

The maintenance of intracellular osmotic pressure is of fundamental importance to all living organisms. Osmoregulatory processes are essential for solute transport in cells and ultimately control the stability of macromolecules, the rate of biochemical reactions and cell function as a whole (Timasheff, 1993; Somero & Yancey, 1997). Cells may respond to osmotic stress by regulating cell volume which can lead to an increase in intracellular crowding or a dilution effect; in either case, there is an attempt to restore homeostasis of cellular osmolarity to maintain

optimal functionality of macromolecular function (Hoffman & Dunham, 1995; Burg *et al.*, 1996). Osmotically stressed cells increase expression of between 100-200 genes which either act as molecular chaperones, ion pumps and transporters, regulators of intracellular levels of compatible organic osmolytes, DNA-damage inducible genes, cell cycle regulators, or as signal inducers of immediate early genes (Kultz, 2000). Some of these genes are also expressed during exposure to other stressors.

Changes in the osmotic environment surrounding cells result in fluxes of water along the osmotic gradient that must be compensated for to avoid potentially lethal cell volume swelling and eventual bursting or dehydration and cell shrinkage. The total concentration of osmolytes within a cell is generally higher than that in the surrounding environment resulting in a net flow of water into the cell that can occur either by simple diffusion or rapidly through water-selective channels or aquaporins. A cell initially stabilizes osmotic pressure largely with inorganic ions. The flux of inorganic ions across cell membranes is essential for maintaining polarization, with the inside of the cell being electronegative with respect to the outside, which is maintained by an unequal distribution of sodium and potassium ions across the membrane. However, only a few Archaea and bacteria adjust osmolarity by varying the concentration of the cations  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  and the anions  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$  and  $CO_3^{2-}$  in their cytoplasm. These microbes accumulate molar concentrations of  $K^+$  and  $Cl^-$  with active extrusion of  $Na^+$ . However, high concentrations of inorganic ions enhance hydrophobic interactions of macromolecules and aggregation.

The most commonest osmolarity adjustment mechanism is the accumulation of large concentrations of compatible organic osmolytes that do not interfere with molecular interactions and biochemical functions. These balance osmotic pressure and also assist in stabilizing intracellular protein-protein interactions that would otherwise be disrupted by inorganic ions and urea. The organic osmolytes can be synthesised or accumulated up to molar concentrations in the cytoplasm, even though their concentration in water is usually very low, in nanomolar to micromolar range. Upon perturbations in the surrounding ionic environment, cells rapidly respond by inducing solute transport genes, signal transduction, stress proteins and accumulating organic osmolytes through enhanced expression of genes either as transporters of osmolytes or for synthesis of them. The organic osmolytes includes the amino acids glutamate, taurine and glycine. Some cells can synthesize taurine while other cells store it.

Nitrogenous compounds can cause stress in aquatic animals and ammonia is the commonest toxicant in intensive aquaculture systems and originates from excreted products from the cultured animals and ammonification of unconsumed feed (Chen *et al.*, 1994). Ammonia toxicity is partially due to a general pH effect. Some enzyme systems release ammonia in the unprotonated form,  $NH_3$ . However, at physiological pH within most cells, about 7.0 to 7.4, most ammonia takes on a proton to become  $NH_4^+$  removing hydrogen ions from the cytosol thus increasing pH. The pH change may inhibit enzyme activity and membrane function. The main effects of ammonia are probably their direct action on membrane biology affecting the active transport of sodium and chloride and inhibition of water resorption. In addition to general membrane effects, ionised ammonia



directly inhibits the formation of ATP by the electron transport chain within mitochondria since ammonia moves across the mitochondrial membrane abolishing the hydrogen ion gradient necessary for ATP formation. Exposure of *Penaeus stylirostris* to 1.5 and 3.0 mg/ml ammonia resulted in a reduction of haemocytes by 15% and 50% respectively with a concurrent decrease in the amount of transcript encoding prophenoloxidase (proPO) and peroxinectin by 60% and 50% respectively (Le Moullac & Haffner, 2000).

### Cellular stress biomarkers studies in Crustacea

One of the earliest molecular changes in a cell after exposure to stress is the expression of mRNA for the production of specific stress proteins. Although determination of mRNA expression can form the basis for an excellent model for *in vitro* studies, it is of limited use for *in vivo* ones as mRNA changes can be transient, the frequency of sampling is not optimised and any changes due to stress may not be observed. In contrast, heat shock proteins, once induced, may remain elevated over longer periods of time and are more likely to be observed. Heat shock proteins may be determined by immunological methods. As the heat shock proteins are so highly conserved across taxa, heterologous immunological assays, using polyclonal and monoclonal antibodies are often used, as cross-reactivity is significant enough to yield meaningful results (Dunlap & Matsumura, 1997). Isoforms of Hsp60 and Hsp70 have been found in crayfish (*Procambarus clarkii*), *artemia* and amphipods (McLennan & Miller, 1990; Rochelle *et al.*, 1991; Werner & Nagel, 1997; Clegg *et al.*, 2000; Frankenberg *et al.*, 2000). The immunological methods used in these studies included western blots that did not allow quantification. The work on *Artemia franciscana* indicated a genetic basis for temperature tolerance in two populations but was not reflected in constitutive levels of Hsp70 expression nor in differences in Hsp70 response to a 37°C temperature shock for 30 minutes. The Hsp90 gene has been partially cloned from the lobster (*Homarus americanus*) and used in northern blot analysis (Chang *et al.*, 1999b). An acute heat shock for 2 hours from 15°C to 28°C resulted in an increased expression by 5.5, 6.0 and 1.8 fold after 2, 6 and 24 hours respectively. In another study on *H. americanus*, cold-acclimated (4°C) and ambient-acclimated (13.6°C) groups were exposed to a temperature shock of 13°C above acclimatisation conditions (Spees *et al.*, 2002). Significant inductions in Hsp70, Hsp90 and polyubiquitin mRNA occurred in the 13.6°C but not the 4°C group. The temperature shock in the 13.6°C group resulted in significant irreversible protein damage in the hepatopancreas but not muscle tissue. Cimino and colleagues (2003) reported protein profiles from SDS-PAGE separations that indicated heat shock proteins with molecular weights of 35, 43, 86 and 100 kDa in *Penaeus monodon* and 25, 86 and 97 kDa in *Cherax quadricarinatus*. An ELISA was developed using a mouse Hsp70 monoclonal antibody, for which only the Hsp86 band cross-reacted. An increased in Hsp86 of 1.5 fold was observed after a temperature shock of 24°C to 33°C for 1 hour and sampled after 6 hours in *P. monodon* and *C. quadricarinatus*. A similar increase of 1.4 fold occurred in *P. monodon* after an osmotic shock of 31ppt to 15ppt for 45 minutes and sampled after 6 hours (Cimino *et al.*, 2003). The sHsp26 has also been examined in *Artemia* (Jackson & Clegg, 1996). It was not found in adult *Artemia* but

was in high concentrations in cysts and is believed to reflect some aspect of metabolic activity status (Downs *et al.*, 2001). Downs and colleagues (2001) assessed the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors. Overall, the data available from Crustacea add further support to the knowledge that heat shock protein expression is increased upon temperature stress and is probably involved in cellular recovery and homeostasis. Whether heat shock proteins are valuable and sensitive indicators of stress in aquaculture production systems remains to be demonstrated consistently (Zarate & Bradley, 2003).

### Higher order stress biomarkers

---

Although the biological impact of stress is first manifested at the cellular level, it can lead to structural and functional impairment that can then progress up to higher levels of biological organization, from cell to tissue to organ to organism. These may result in impaired higher order or physiological function and impact on metabolism, growth, the immune system and reproduction, all of which are under some form of neuroendocrine and endocrine control. One of the most studied neuroendocrine responses to stress is the vertebrate hypothalamus-pituitary-adrenal axis. In response to stress, corticotropin-releasing hormone is released from the hypothalamus resulting in the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and its release into the blood stream. The target organ for ACTH is the adrenal that releases glucocorticoids. After exposure to stress there is a surge in the release of ACTH and shortly thereafter blood glucose levels. The Crustacea have a partial equivalent of the vertebrate hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the X-organ-sinus-gland-hepatopancreas axis, although the final target organ is not as specific as in vertebrates. Upon stress, there is an immediate release of biogenic amines, which in Crustacea may include acetylcholine, glutamate, gamma-aminobutyric acid, dopamine, histamine, 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, octopamine, enkephalin and FMRFamide (Fingerman & Nagabhushanam, 1992). The surge of biogenic amine results in release of crustacean hypoglycaemic hormone (CHH) from the X-organ-sinus gland complex and into the blood that in turn interacts with target tissues, such as the hepatopancreas, and the release of glucose from glycogen stores. This rapid mobilization of energy reserves allows the animal to meet the increased energy demands to cope with the exposure to stress. Blood glucose concentration is correlated with stress in *P. monodon* (Hall & Van Ham, 1998a,b). Juvenile prawns held in water in which the oxygen concentration was reduced from 6.5 to 2.5 mg/l exhibited a significant increase in blood glucose levels. When dissolved oxygen was reduced from 6.6 to 5.9 mg/l with carbon dioxide, with a resultant decrease in seawater pH from 8.5 to 5.9, there was a rapid and significant increase in blood glucose from 1.1 to 2.3 mmol/l. In contrast, and as a partial control, when seawater pH was decreased from 8.3 to 5.9 with sulphuric acid there was no change in blood glucose concentration. Other stressors, such as prophylactic baths of formalin to treat ectoparasites, only increased blood glucose levels when prawns were exposed to concentrations of formalin exceeding 1,000 ppm (Van Ham & Hall, 1998). Although blood glucose concentrations are a biomarker for stress, they require carefully controlled conditions and prawns must be

starved for sometime, usually 18-24 hours, before challenge, to obtain meaningful results (Hall & Van Ham, 1998a, b). The use of blood glucose as a biomarker of stress appears limited to controlled experimental situations.

Other studies on crustaceans have looked for stress biomarkers in the blood. Blood ions, including magnesium, calcium, sodium, potassium and chloride, as well as glucose, lactate, blood osmolarity and pH have been examined as possible stress biomarkers in *P. monodon* (Boglio, 1995). In that study the only variable that consistently associated with stress was magnesium, with a 3-fold increase during severe stress. High extracellular levels of magnesium block neurotransmission in Crustacea and blood magnesium is usually inversely correlated with periods of activity (Sartoris & Portner, 1997). High blood magnesium concentrations may protect intracellular pH perturbations and ATP concentrations. Other biomarkers include the major osmolytes, such as betaine, glycine, b-alanine, taurine, trehalose, urea and N-trimethylamine oxide (TMAO) and the inorganic ions. It has been proposed that trehalose is partly responsible for thermotolerance in *Artemia* (McLennan & Miller, 1990). Stress responses can induce significant changes in the cellular composition of osmolytes and changes in the blood may also be a reflection of stress (Yancey, 2001; Caridi, 2002).

The number of circulating haemocytes has been claimed to be a potential indicator of stress in Crustacea (Smith & Johnston, 1992). However, the haemocyte population varies during the molt cycle so that this is not a very robust measure for stress (Perazzolo *et al.*, 2002). Another blood-based potential indicator of stress is clotting time. Blood clotting is a complex biochemical process in Crustacea caused by substances originating from the haemocytes (Aono & Mori, 1996; Jussila *et al.*, 2001). As is the case for haemocyte counts, clotting time is sufficiently variable as to make it of limited value as a stress biomarker (Perazzolo *et al.*, 2002). Transglutaminase is believed to be involved in the clotting process and is activated after major disruption of cellular homeostasis (Griffin *et al.*, 2002). During periods of stress and pathological conditions, intracellular calcium, which activates transglutaminase, is increased and may favour cross-linking of  $\alpha$ B-crystallin and sHsps to other cellular proteins. Transglutaminase is involved in a number of human diseases and as it is found throughout the prokaryotes and eukaryotes, it may be a useful biomarker of stress (Griffin *et al.*, 2002).

It may be possible to develop genetically faster growing organisms by selecting those individuals who more rapidly regain homeostasis after stress (Weil *et al.*, 2001). In fish, a close association exists between corticosteroids and immunosuppression, with increased susceptibility to disease, although a causal relationship is not firmly established (Thomas *et al.*, 1990). Nevertheless, fish that rapidly adjusted to stress compared to those which do not readily adapt, have better growth characteristics (Weil *et al.*, 2001). Similarly, a correlative relationship between stress and disease has also been established for crustaceans, opening up the possibility of selectively breeding for stress resistance, although a definitive causal relationship is not as well established (Fuxa, 1993; Le Moullac & Haffner, 2000).

## Stress and health

---

Disease is an end result of an interaction between the host, its environment and the pathogen (Lightner & Redman, 1998a). Under normal conditions, the host and the pathogen may co-exist with no significant adverse effect. Stress is assumed to make an organism more susceptible to infections and disease, reducing its capacity to resist the otherwise normal surrounding pathogenic biodiversity and hence, under stressful conditions, disease generally occurs (Lee & Wickins, 1992). For the aquaculture industry, therefore, recognising that a stock is infected with a pathogen is not sufficient to make useful and effective decisions concerning the management of a particular crop. In prawn production systems there are multiple examples that pathogens co-exist in the same environment without causing any clear negative impact on production (Flegel & Pasharawipas, 1998; Spann *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). For example, many prawn stocks are infected with viral infections that may only transform into an acute disease state if prawns become stressed due to sub-optimal environmental conditions resulting in significant losses to the industry. (Cowley *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001). The implication is that, even when a pathogen is present in a prawn, environmental conditions can be the decisive factor for an outcome of either mortality or survival (Hall & Van Ham, 1998a,b; Le Moullac *et al.*, 1998; Lightner & Redman, 1998a; Sanchez *et al.*, 2001). A better understanding of the effect of the environment on the prawn's health, and particularly on its immunological vigour is required to determine the conditions in which a non-pathogenic infection will start causing adverse effects in production. In other aquatic species, such as fish and molluscs, there is considerable evidence linking environmental changes to diseases and a depression of the immune system (Le Moullac & Haffner, 2000). In marine crustaceans, information on the relationship between environmental stress and a modification of the immune system, leading to an enhanced susceptibility to infectious disease agents is limited but is a growing field of research in recent years (Direkbusarakom & Danayadol, 1998; Hall & Van Ham, 1998a,b; Le Moullac *et al.*, 1998; Le Moullac & Haffner, 2000; Perazzolo *et al.*, 2002). There have been multiple studies describing the effects of water temperature, salinity, oxygen, ammonia and nitrite levels on immuno-parameters such as differential haemocyte counts, antibacterial and phagocytic activity, the release of reactive oxygen intermediates and the modulation of the prophenoloxidase activity among others (Le Moullac & Haffner, 2000).

Of the environmental conditions that might affect prawns, salinity and temperature are likely to have the greatest impact due to direct effects on their metabolism, growth, molting and survival (Le Moullac & Haffner, 2000). Juvenile and adult prawns are potent osmoregulators. However, salinity changes may cause stress when associated with inadequate handling procedures and poor water quality, which favour opportunistic infections (Perazzolo *et al.*, 2002). Cheng and colleagues observed variations in the total haemocyte counts and prophenoloxidase (proPO) enzyme activity in the freshwater prawn *Machrobrachium rosenbergii* exposed to different salinities (Cheng & Chen, 2000). Bray *et al.* (1994) described a relationship between salinity and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Bray *et al.*, 1994). Dean & Vernberg (1966) determined that temperature had an effect



on clotting times and total haemocyte number in the hermit crab *Uca pugilator*. Fluctuations in water temperature have been shown to affect the antibacterial activity of *Carcinus maenas* (Chisolm & Smith, 1994). In *P. stylirostris*, the total haemocyte count (THC) dropped by 40% whereas phenoloxidase (PO) activity increased significantly following a temperature drop (Le Moullac & Haffner, 2000). An increase in temperature from 18°C to 32°C affected haemocyte number and phagocytic activity in *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1998). More recently, Vidal *et al.* (2001) found a significant effect of hyperthermia on the survival of *L. vannamei* experimentally infected with white spot syndrome virus (WSSV). We have observed significant differences in survival of gill-associated virus (GAV) infected *P. monodon* exposed to 25, 29, 30 and 35°C treatments. Survival ranged from 40% at 35° to 100% at 25°C (de la Vega *et al.*, unpublished).

Low oxygen levels are commonly found in intensive or poorly managed cultured ponds and can affect the immune system of prawns. In *P. stylirostris* an increase in PO activity and a decrease in THC exposed to hypoxic stress were observed (Le Moullac *et al.*, 1998). In *P. monodon*, a decrease in phagocytic activity and bacterial clearance efficiency in animals exposed to oxygen depletion was reported. An experimental infection with virulent *Vibrio alginolyticus*, resulted in significant survival differences in stressed shrimp compared to the control (Direkbusarakom & Danayadol, 1998).

Ammonia, and its intermediate product of oxidation, nitrite, are the most common toxicants in culture systems and are toxic to fish, molluscs and crustaceans (Chen *et al.*, 1990a,b). In intensive aquaculture, ammonia and nitrite may accumulate reaching high levels especially during the last part of the culture cycle. Chen and colleagues (1990a,b) have reported toxic effects of ammonia and nitrite in *Penaeus chinensis* and *P. monodon*. Toxic levels of these compounds resulted in mortalities for the two species. Le Moullac & Haffner (2000) observed a decrease in proPO and peroxinectin gene expression in prawns exposed to elevated ammonia levels. The effect of ammonia on other aspects of the prawn immune response has yet to be investigated.

### **Pathogenesis markers**

The initial interactions between pathogen and host cell are critical in determining the outcome of infection. The majority of infections do not lead to overt disease and pathogens are usually repelled by the organism's defence mechanisms (Staskawicz *et al.*, 2001). Bacterial pathogens interact with the host cell surface through a vast array of appendage-like structures, which may be composed of a single protein, and are known as pili or fimbriae and serve to display ligands that are recognised by cognate receptors of host cells (Staskawicz *et al.*, 2001). The interaction of the bacteria with the host cells often leads to the activation of signalling pathways that are critical to the outcome of the infection. Some of these interactions lead to pro-inflammatory production of specific molecules.

The toll and the toll-like receptor family encodes transmembrane proteins containing extracellular leucine-rich repeat (LRR) and an intracellular motif that is homologous to the interleukin-1 receptor and is capable of inducing antimicrobial peptides (Anderson, 2000). The LRR domain of the toll-like receptors is

involved in the recognition of conserved pathogen components such as bacterial lipoprotein, lipopolysaccharide, unmethylated DNA and flagellin (Gomez-Gomez & Boller, 2000). The recognition of these pathogen components induces expression of antimicrobial proteins and peptides that are a fundamental part of the innate immune response both in Vertebrates and Invertebrates.

Cytokines are soluble polypeptides and glycopeptides from multiple cellular sources that act as paracrines and autocrines. They are a heterogeneous family of regulatory proteins involved in coordinated local and systemic responses to infection and tissue damage in Vertebrates (Beck *et al.*, 2000; Engelsma, 2002). Cytokines include tumor necrosis factor, the interferons (IFNs), and the members of the interleukin family (Beck *et al.*, 2000). The interleukin-1 family is an expanding family of pro-inflammatory cytokines. It is composed of three related proteins IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-1ra, and was one of the first cytokines to be discovered (Beck *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000). IL-1 is a key immunoregulatory protein in Vertebrates, but it also has critical properties as a mediator of non-specific host defence mechanisms through a cascade of effects mediated through the regulation of other cytokines (Beck *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000). Whereas they have not yet been reported in crustaceans, cytokines or cytokine-like molecules have been found in several Invertebrates such as molluscs, insects, annelids, echinoderms and tunicates (Ottaviani *et al.*, 1995; Beschin *et al.*, 2001). Beck & Habicht (1996) reported the isolation of IL-1 in coelomic fluid of an Echinoderm, *Asterias forbesi*, and have since then found IL-1 activity in tunicates, and annelid worms (Beck & Habicht, 1996). Ottaviani and colleagues (1995) showed that IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are involved in cell migration, phagocytosis and nitric oxide synthase of haemocytes in two species of molluscs. Since then, many reports on invertebrate cytokines have been published (for a review refer to (Ottaviani *et al.*, 1995; Beck & Habicht, 1996; Beck, 1998; Beschin *et al.*, 1999, 2001)), suggesting that they are wide spread through the Invertebrates. The function and direct involvement of these invertebrate cytokine-like molecules in the immune response remain to be further clarified with further studies.

Interferons are a family of proteins involved in the inhibition of viral replication in neighbouring uninfected cells, possibly by reducing the rate of transcription of DNA into mRNA. IFNs are also involved in activation of macrophages, proliferation of cell growth and apoptosis, making them the first line of defence against viral infections in mammals (Sen, 2001). The majority of interferon research has been done with mammals. Although there are no reports describing the presence of interferon in Crustacea, there has been recent evidence of interferon-like particles being present in various invertebrate species. Wiens and colleagues (1999) cloned the first putative invertebrate (2-5) oligoadenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*. Parker & Ourth (1999) detected specific binding of human IFN- $\gamma$  to the hornworm (*Manduca sexta*) larva tissues, indicating the presence of a putative IFN- $\gamma$  receptor in insects. More recently, Miyazaki and colleagues (2000), found that the administration of recombinant feline interferon- $\omega$  to pearl oysters *Pinctada fucata* infected with Akoya virus conferred some degree of protection against this virus. In a later experiment, this same group found receptors for this type of interferon in the pearl oyster using a direct immunofluorescence technique with an anti-recombinant interferon rabbit serum (Miy-

zaki *et al.*, 2002). Due to the importance of these molecules in the antiviral immune response in other species, and the impact of viral diseases in crustacean aquaculture, studies design to identify its presence and possible functions in crustaceans are desirable.

Various biological markers of pathological stress, inflammation and disease have been developed which have applications in human and pathology research. The determination of lysosomal damage, for which a neutral red dye is used to determine lysosome integrity has been used to demonstrate differences between non-stressed and stressed crabs (*Carcinus maenas*) (Wedderburn *et al.*, 1998). Lysosomal destabilization indices have also been used in other marine Invertebrates, including oysters (*Crassostrea virginica*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) (Ringwood *et al.*, 1998; Domouhtsidou & Dimitriadis, 2001). One of the active processes during apoptosis includes a calcium-dependent nuclease which cuts double-strand DNA at the linkage regions between the nucleosomes resulting in DNA fragments of multiples of 180-200 base pairs (bp) which can be separated by electrophoresis producing a ladder-like fingerprint (Arends *et al.*, 1990). Under normal physiological conditions there is a balance between cell division and death by apoptosis. The TUNEL assay detects double or single strand breaks originating from apoptosis as well as from necrosis in tissues (Gold *et al.*, 1994). A shift in the balance between apoptosis and necrosis can be used as a biomarker of stress and disease (Piechotta *et al.*, 1999). In prawns,  $\beta$ -1,3-glucan binding protein and proPO gene expression patterns were determined by Quantitative RT-PCR and used as a pathogenic biomarker in White Spot Syndrome Virus infected *P. stylirostris* (Roux *et al.*, 2002). In *Drosophila* the Turandot A (TotA) gene family encodes a humoral factor as an acidic highly charged 12kDa peptide that accumulates in the body fluids (Ekengren & Hultmark, 2001). The TotA genes respond to a wider range of stimuli than the heat shock genes and have a strong response to bacterial infection. It is likely that many other pathogenic-related gene products remain to be discovered and will be of benefit as pathogenic biomarkers.

### **Ecosystem stress and health**

The biological impacts of stress can have a cascade effect transcending molecular, cellular, tissue, organ, organism, population and community levels. This is especially true for high-density aquaculture production systems. The physiological impairment or death of the crop organism may have little to do with its own health status. Even though the primary objective of high-density farming is the production of a single crop, the production system contains a multitude of biodiversity. Viruses, for example, are the most abundant microorganisms in seawater and their density readily exceeds over  $10^8$  virions per millilitre (Thingstad *et al.*, 1993). Viruses are dynamic members of the marine microbial community and play an important role in controlling bacteria and phytoplankton mortality (Jiang & Paul, 1996). Between 2% to 16% of bacteria contain mature virions and can be a major source of production and release of viruses into the marine environment (Heldal & Bratbak, 1991). A stressed environment typically results in a decrease of the diversity of the microbial community and an increase in the numbers of functionally specific microbial groups (Sung *et al.*, 2001). Such conditions



may lead to the dominance of microbial groups that can be virulent. For example, the environmental change of salinity from 27 ppt to 15 ppt in prawn ponds, presumably stressing the biological community, increased the virulence of bacteria to prawns (Prayitno & Latchford, 1995). Environmental stress could increase bacteriophage release from their hosts leading to increased rates of infectivity and the activation of virulent factor gene pathways in their host (Oakey & Owens, 2000; Boyd & Brussow, 2002). Stress could lead to an increase in prophage induction and the release of toxic extracellular products, such as cysteine proteases, which impacts on the entire ecosystem due to the general toxicity of the exotoxin (Lee *et al.*, 1999a; Montero & Austin, 1999). Such examples suggest that the relationship between stress and disease is not necessarily due to direct effects of stress on the crop organism but rather to other species within the environment.

### **Conclusion and future directions**

---

While there is a wide range of data available on physiological and immune response mechanisms in response to stress for many model organisms, the information available for crustaceans is limited to a small number of genes or pathways. There needs to be significantly more generation of knowledge on the fundamental immune capabilities of Crustacea and especially the differential responses to viral as opposed to bacterial challenges. Functional genomics approaches such as expressed sequence tags (ESTs), suppression subtractive hybridisation libraries (SSH) and DNA microarrays could allow for the simultaneous detection of thousands of known and unknown genes offering the possibility of transcriptional profiling (Duggan *et al.*, 1999). The employment of genomic technologies will provide a plethora of data into the cellular response to stress and enable the differentiation between viral and bacterial infections. Such approaches would allow the identification of the consequences of specific stressors as well as multi-component regulatory pathways and the identification of unknown genes that play a role in stress physiology and maintenance of homeostasis and disease resistance. Transgenic technology using heterologous reporter genes under the control of specific promoters, such as stress-inducible Hsp gene promoters, offers the possibility of custom designed stress biomarkers (Candido & Jones, 1996). Due to the close relation between environmental stress and the fate of crustacean culture, the implementation of a biomarker analysis system that enables the identification of specific stressors and its implications in crustacean physiology is desirable.



## Immunité anti-infectieuse et indicateurs de santé chez les crevettes pénéides

É. Bachère, J. de Lorgeril, D. Saulnier, Y. Guéguen, M. Muñoz

Drim Ifremer/CNRS/Univ. Montpellier 2, 34095 Montpellier, France  
Evelyne.Bachere@ifremer.fr

### Résumé

La compréhension des mécanismes de défense des crevettes pénéides au niveau cellulaire et moléculaire peut contribuer à la mise en œuvre de stratégies de contrôle des maladies en aquaculture. Chez les Invertébrés, le système de défense, de type inné, ne repose pas sur une réponse immunitaire spécifique et à mémoire faisant intervenir la production d'anticorps. Un ensemble complexe de mécanismes cellulaires et humoraux coopèrent pour limiter et éliminer les invasions microbiennes. En particulier, la réponse immunitaire innée se caractérise par la production de peptides antimicrobiens. Nous avons isolé et caractérisé, dans l'hémolymphe de crevettes pénéides, une famille de peptides nommée pénaeidines. Présentant une activité microbicide vis-à-vis de champignons filamenteux et de bactéries à Gram (+), les pénaeidines sont constitutivement synthétisées et stockées dans les hémocytes granuleux. Sur la base d'infections expérimentales de crevettes, deux phases distinctes dans la réponse immunitaire peuvent être mises en évidence : (i) une migration des hémocytes vers les sites d'infection durant les premières heures après l'infection microbienne, s'accompagnant d'une libération locale et massive de peptides ; puis, (ii) une augmentation, dans la circulation sanguine et les tissus, d'une population d'hémocytes présentant des taux d'expression de peptides accrus, correspondant à une réaction systémique impliquant des processus de prolifération hémocytaire. Au cours de la réponse immunitaire, les peptides libérés dans la circulation sanguine se fixent sur les surfaces cuticulaires grâce à leur propriété de liaison à la chitine, pouvant ainsi contribuer à une protection de l'animal au cours des cycles de mue. Par ailleurs, les pénaeidines présentent une activité agglutinante pour *Vibrio penaeicida* et sont observées recouvrant la surface des bactéries, suggérant une activité d'opsonisation. Les peptides antimicrobiens présentent un double intérêt pour une application au contrôle des maladies en aquaculture. Tout d'abord, ces molécules bioactives naturelles, adaptées aux conditions marines, représentent des agents thérapeutiques potentiels utilisables en larviculture. Par ailleurs, l'expression des gènes codant pour des effecteurs composés antimicrobiens est un critère à considérer pour un suivi de l'état de santé des animaux en élevage mais également dans le cadre de programmes alternatifs de sélection génétique, basés sur des critères de plus grande résistance non spécifique vis-à-vis de pathogènes. Dans cet objectif, une approche génomique a consisté en l'identification d'effecteurs différentiellement exprimés et produits chez des crevettes ayant survécu à une infection à *V. penaeicida*. Des analyses sur la modulation de l'expression de leur gène dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques sont entreprises afin de développer des tests de quantification adaptés au suivi des capacités immunitaires et de la santé des crevettes à l'échelle des élevages.

## Abstract

---

Understanding of penaeid shrimp immune response should help in the design of efficient strategies for disease control. As for others Invertebrates, cellular and humoral mechanisms contribute to the shrimp defence reaction by limiting microbial invasions or by helping the clearance/killing of the invading microbes from the blood and tissues. In particular, part of the innate immune response relies on the production of cationic antimicrobial peptides. We have isolated and characterized from penaeid shrimp hemolymph, a family of antimicrobial peptides named penaeidins. Active against fungi and Gram-positive bacteria, penaeidins are constitutively synthesized and stored in granular hemocytes. By analyzing penaeidin gene expression and peptide distribution in shrimp tissues, progress has been done in understanding of shrimp immune response to infections. Two distinct phases in the immune reactions were evidenced: (i) a migration of hemocytes towards the infection sites within the first hours following microbial infection, with a local and massive release of peptides, then (ii) an increase into blood circulation and tissues, of hemocyte population displaying increased penaeidin-transcriptional activity, which may correspond to a systemic reaction involving hemocyte proliferation process. In response to microbial stimulations, peptides are partly released from hemocytes into the blood circulation. They further attach to shrimp cuticle surfaces through a chitin-binding property that could confer to the shrimp a protection during molting stages. Penaeidins present *Vibrio penaeicida* agglutinating activity; they were evidenced covering bacteria surface suggesting an opsonising activity. Knowledge acquired on antimicrobial peptide expression and distribution in animals appears to be useful for further development of assays for monitoring the shrimp immune response. Antimicrobial peptides, effectors of innate, non-specific immunity, remain a vast domain to be explored. They present dual potential interest for application in the control of diseases in aquaculture. First, these natural bioactive compounds are good candidates as therapeutic agents for larvae production, adapted to marine environmental conditions. Second, expression of their encoding genes represents criteria to be investigated for monitoring health status of animals in aquaculture and for developing alternative selective breeding programmes, based on criteria of non-specific resistance to pathogens. In this prospect, a genomic scale investigation of shrimp immune functions has been initiated which will permit to analyse global response of the shrimp defence reactions. This approach has consisted in the characterization of immune effectors that are differentially expressed and produced in shrimps that have survived to a *V. penaeicida* infections. Analyses of the expression regulation or modulation of these genes are undertaken for further development of quantitative assays adapted to the evaluation of the immune capability and health at shrimp population levels.

## Introduction

---

Les maladies infectieuses représentent une limitation majeure au développement et à la pérennité des élevages aquacoles pour la majorité des pays producteurs et particulièrement pour l'industrie crevettière. Les virus et les bactéries du genre

*Vibrionaceae* sont les agents étiologiques les plus fréquemment associés à des mortalités massives de larves et/ou de juvéniles. Les crevettes pénéides, comme tous autres invertébrés marins, vivent dans un milieu naturellement riche en micro-organismes, de type protozoaires, microalgues, champignons, levures ou bactéries, certains d'entre eux constituant leur microflore naturelle ou étant commensaux. Il peut être supposé que les crevettes ont développé des systèmes pour détecter et discriminer les micro-organismes bénéfiques pour leur équilibre physiologique de ceux potentiellement pathogènes. Avec l'évolution, les animaux en milieu sauvage vivent en équilibre dans leur environnement et leur système immunitaire est efficace et naturellement adapté pour contrôler les maladies. Cependant, dans le contexte de l'aquaculture, cet équilibre est mis à mal et les animaux sont soumis à des conditions environnementales et écologiques qui fragilisent le maintien de leur homéostasie et favorisent l'apparition de maladies. Au regard des problèmes rencontrés dans l'industrie aquacole, les connaissances sur la physiologie des animaux d'élevage sont encore trop limitées. Les recherches souffrent d'un manque de connaissances sur l'immunité mais également sur l'organisation génétique de ces organismes. Pendant longtemps, la plupart des travaux sur les crevettes pénéides ont concerné la mise en évidence d'activités biologiques ou la caractérisation d'effecteurs immunitaires déjà connus chez d'autres organismes. Les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des effecteurs immunitaires ont été peu considérées et leur implication *in vivo* dans la réponse aux infections a été peu étudiée. Par ailleurs, alors que les *Vibrios* sont reportés comme commensaux ou probiotiques (Vandenberghe *et al.*, 1999; Hernandez & Olmos, 2003), ces bactéries sont également considérées comme opportunistes, associées à des cas de mortalités, voire pathogènes comme *Vibrio penaeicida* chez *Litopenaeus stylirostris* (Goarant *et al.*, cet ouvrage). Les relations entre les *Vibrios* et la crevette restent largement inconnues. Il faut ajouter que l'utilisation intensive d'antibiotiques dans les écloséries à but préventif ou curatif a largement contribué à la sélection de souches de bactéries résistantes et potentiellement pathogènes. La caractérisation moléculaire des *Vibrios* (Gay *et al.*, cet ouvrage) devrait faciliter la différenciation entre les souches probiotiques, commensales *versus* les souches pathogènes qui expriment, dans certaines conditions, des facteurs de virulence. Dans ce contexte, la compréhension et le suivi de la réponse immunitaire des crevettes vis-à-vis des *Vibrios* sont particulièrement importants à considérer.

Comme il l'a été formulé par Snieszko (1973), les maladies résulteraient de perturbations de l'équilibre fragile qui existe entre la physiologie des animaux, la qualité du milieu et les pathogènes potentiels, naturellement présents ou introduits. Les pratiques culturales doivent être reconsidérées; le contrôle des maladies et la mise en œuvre de mesures prophylactiques adaptées au contrôle de la santé des animaux sont aujourd'hui une priorité et nécessitent d'être vus d'un point de vue multidisciplinaire (Bachère, 2000). Les connaissances sur la physiologie et la génétique des crevettes doivent être approfondies afin de pouvoir étudier et évaluer l'impact de critères écologiques et environnementaux ainsi que nutritionnels et zootechniques sur la santé des animaux en élevage.

L'établissement de suivis de la santé des crevettes mais également la sélection d'animaux présentant une meilleure capacité de résistance aux maladies reposent sur la caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'effecteurs immunitaires, mais

également sur la compréhension des réactions de défense mises en œuvre face à des pathogènes et des conditions de stress.

### **Généralités sur l'immunité des crevettes pénéides**

---

Le système immunitaire des Invertébrés, par opposition à l'immunité adaptative des Vertébrés, se caractérise par l'absence de réponse immunitaire à mémoire et à haute spécificité faisant intervenir des anticorps ou immunoglobulines. Cette première caractéristique rend toute forme de vaccination impossible à envisager chez les Invertébrés. La défense des Invertébrés repose sur une réponse rapide et assez peu spécifique comparable à l'immunité innée des Vertébrés. Cette immunité fait intervenir des mécanismes complexes de réactions cellulaires et humorales coordonnées.

Comme chez tous les arthropodes, la cuticule des crevettes pénéides représente une première barrière physique contre l'invasion de micro-organismes. Les principaux effecteurs cellulaires de l'immunité sont les hémocytes, cellules immunocompétentes reconnues à ce jour. Toutefois, d'autres tissus comme l'hépatopancreas et probablement les épithélia sont également impliqués dans la production d'effecteurs immunitaires. Les hémocytes sont activés au cours de la réponse immunitaire par des molécules de reconnaissance circulant dans l'hémolymphe qui permettent d'identifier des motifs moléculaires spécifiques des polysaccharides microbiens (Janeway, 1994). Des protéines liant des lipo-polysaccharides et des  $\beta$ -glucans ont été caractérisées chez diverses espèces de crevettes pénéides (Vargas-Albores *et al.*, 1993; Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000), ainsi que des lectines (Marques & Barracco, 2000). Les hémocytes activés interviennent dans diverses réactions incluant la phagocytose, la formation de nodules ou l'encapsulation (revue dans Bachère *et al.*, 1995) ou par la libération dans la circulation de molécules déclenchant les phénomènes de coagulation et le système prophénoxidase (Sritunyalucksana & Soderhall, 2000). Enfin, les hémocytes sont également impliqués dans des phénomènes de communication et signalisation cellulaire intervenant dans le contrôle de la réponse immunitaire, ainsi que dans la production de molécules antimicrobiennes (cet article).

Alors que les hémocytes jouent un rôle-clé dans l'immunité des crevettes, ces cellules sont paradoxalement très mal connues en termes de classification de types hémocytaires et ce, en dépit de nombreux travaux. Trois populations hémocytaires sont communément identifiées sur la base de caractéristiques morphologiques et parfois fonctionnelles, *i.e.* des cellules hyalines ou agranuleuses, des semi-granuleuses (à petits granules cytoplasmiques) et des granuleuses (à gros granules). Cependant, cette classification n'apparaît pas satisfaisante et d'autres critères comme des marqueurs moléculaires sont nécessaires pour réellement identifier les types cellulaires distincts et établir les lignages hémocytaires.

### **Les peptides antimicrobiens**

---

La réponse immunitaire innée repose sur la production de peptides antimicrobiens, ubiquitairement représentés dans le règne vivant et conservés dans l'évolution, chez les procaryotes et eucaryotes, des plantes jusqu'aux Invertébrés et Vertébrés. Ces



effecteurs présentent une grande diversité en termes de caractéristiques structurales, de propriétés biologiques et de fonctions mais également en termes de localisation tissulaire et de régulation de leur expression. Ces molécules actives vis-à-vis d'un large spectre de micro-organismes, présentent une faible spécificité et sont généralement non toxiques pour les cellules eucaryotes. Les peptides antimicrobiens sont généralement décrits comme molécules cationiques et amphipatiques, codées par un gène et plus de 700 molécules ont été décrites à ce jour (Tossi & Sandri, 2002). Par commodité, les peptides antimicrobiens sont classés dans différents groupes ou familles sur la base de leurs structures primaire et secondaire (Bulet *et al.*, 1999). Cependant, des peptides anioniques à activité antimicrobienne ont été décrits, issus de l'hydrolyse de protéines de fonctions diverses (revue dans Bachère *et al.*, soumis). Tel est le cas, chez les crevettes *Litopenaeus vannamei* et *L. stylirostris*, de la génération d'un peptide antifongique issu du clivage de la partie C-terminale de l'hémocyanine en réponse à une infection microbienne (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001).

Chez les crevettes pénaïdes, la mise en évidence de ces effecteurs de l'immunité innée est relativement récente. Nous avons caractérisé pour la première fois chez un crustacé une nouvelle famille de peptides antimicrobiens dénommés pénaïdines. Trois peptides ont été initialement caractérisés par voie biochimique et par clonage de leurs ADN complémentaires (ADNc) à partir des hémocytes et du plasma de la crevette *Litopenaeus vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997). Il est maintenant établi que la famille des pénaïdines est représentée chez différentes espèces de crevettes et nous avons isolé notamment de nouveaux membres de la famille chez *L. stylirostris* (Muñoz *et al.*, soumis). Par ailleurs, sur la base d'approches de séquençage de gènes exprimés, EST (Expressed Sequence Tag) et de recherche d'homologies, des pénaïdines ont été caractérisées chez *L. setiferus* (Gross *et al.*, 2001), *P. japonicus* (Rojtnakorn *et al.*, 2002) ou encore *P. monodon* (Supungul *et al.*, 2002). Compte tenu du grand nombre et de la diversité des séquences de pénaïdines caractérisées à ce jour, il est apparu nécessaire d'établir une nomenclature internationale et une classification de ces peptides en sous-groupes, les PEN2, les PEN3 et PEN4. Une base de données PenBase est en cours d'élaboration (Guéguen, comm. pers.).

Les pénaïdines représentent une famille de peptides antimicrobiens originale car elles combinent dans leur structure deux domaines distincts, un domaine N-terminal riche en résidus proline (similaire à la classe des peptides riches en proline) et un domaine C-terminal renfermant six cystéines engagées dans 3 ponts disulfure (présentant des caractéristiques de la classe des peptides riches en cystéines représentés par les défensines). La structure tridimensionnelle de la PEN3 de *L. vannamei* a été récemment établie, confirmant le caractère original de cette famille de peptides (Yang *et al.*, 2003).

Les propriétés biologiques des pénaïdines ont été établies grâce à la production de peptides recombinants en système levure. Ces peptides antimicrobiens ont une activité antimicrobienne dirigée *in vitro* essentiellement vis-à-vis de bactéries à Gram(+) ainsi que vis-à-vis de champignons filamenteux (Destoumieux *et al.*, 1999). Comparativement, les pénaïdines sont moins actives sur les bactéries à Gram (-) mais une propriété agglutinante et opsonisante a été montrée notamment pour des *Vibrios* à la fois *in vitro* et *in vivo* chez des crevettes infectées par cette bactérie (Muñoz *et al.*, soumis). Dans ces agrégats de *Vibrios*, des concentrations de

pénaeidines compatibles avec une activité microbicide peuvent être atteintes. Ces observations nous permettent de proposer que, *via* les pénaeidines, les crevettes ont développé un système discriminant les micro-organismes. Les bactéries ou champignons « étrangers » à la crevette tels les bactéries Gram (+) et les champignons seraient tués à faible concentration de pénaeidines. Les bactéries constituant potentiellement la flore naturelle des crevettes seraient agglutinées, tuées et éliminées lorsque des concentrations élevées sont atteintes dans l'animal. Enfin, les pénaeidines ont une activité de liaison à la chitine (Destoumieux *et al.*, 2000a). Les pénaeidines sont synthétisées et stockées dans les granules cytoplasmiques des hémocytes granuleux, et semi-granuleux, représentant environ 40 % des hémocytes circulants chez des crevettes en conditions normales. Par ailleurs, des hémocytes exprimant des pénaeidines sont observés, infiltrant tous les tissus des crevettes ou circulant dans les vaisseaux sanguins (Muñoz *et al.*, 2002). La distribution et l'expression des pénaeidines ont été étudiées, d'une part, en réponse à une stimulation par injection de micro-organismes tués et, d'autre part, chez *L. stylirostris* en réponse à une infection par *Vibrio penaeicida* (Muñoz *et al.*, soumis). Ces études nous ont permis de définir différentes phases caractéristiques de la réponse immunitaire des crevettes dans lesquelles les hémocytes jouent un rôle prépondérant, à savoir une réaction précoce de type local puis une réaction systémique reposant sur l'activation de processus d'hématopoïèse (fig. 1).

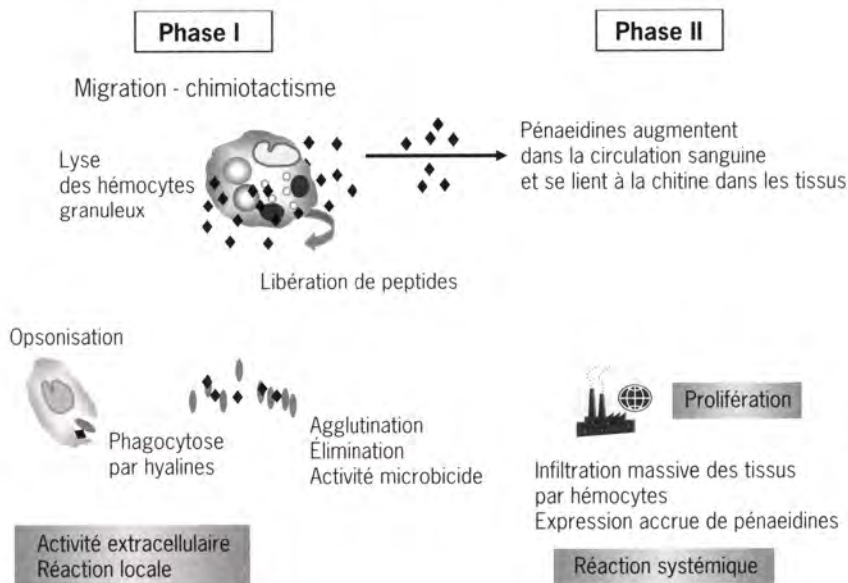


Figure 1 - Un modèle pour la réponse immunitaire chez les crevettes pénaeïdes. Dans des conditions normales, les hémocytes granuleux producteurs de pénaeidines sont localisés dans la circulation sanguine et infiltrent les tissus des crevettes. La réponse à des infections se traduit par une première phase ou réaction locale caractérisée par la migration des hémocytes granuleux vers les sites d'infection où ils libèrent leur contenu dont les pénaeidines. Les peptides agissent localement en opsonisant et agglutinant les bactéries à Gram (-) et en tuant à faible concentration les bactéries à Gram (+). Une deuxième phase ou réaction systémique est caractérisée par des phénomènes d'hématopoïèse et une accumulation et invasion d'hémocytes producteurs de pénaeidines dans tous les tissus de la crevette.

La stimulation par les micro-organismes se traduit dans un premier temps par une chute du nombre d'hémocytes circulants et une migration des hémocytes granuleux producteurs de pénaéidines vers les sites d'infection. Ces hémocytes libèrent leur contenu granuleux par un phénomène original de dégranulation intracellulaire suivi de la lyse des hémocytes (Muñoz *et al.*, 2002). Les pénaéidines sont massivement libérées dans les tissus, leur concentration augmente dans la circulation sanguine et ces peptides se fixent sur les surfaces cuticulaires de la crevette (Destoumieux *et al.*, 2000a). De par leurs propriétés duelles, antimicrobiennes et de liaison à la chitine, les pénaéidines pourraient être impliquées dans la protection des crevettes au cours du cycle de mue mais elles pourraient également participer aux phénomènes de cicatrisation et de remodelage de la cuticule. Des travaux sont en cours pour définir le caractère multifonctionnel des pénaéidines. Au niveau des sites d'infection, les pénaéidines seraient impliquées dans l'opsonisation des *Vibrios* et leur phagocytose par les hémocytes hyalins, mais également dans l'agglutination des bactéries et la formation de nodules. Chez des crevettes *L. stylirostris* ayant survécu à une infection à *V. penaeicida*, de nombreux nodules renfermant des pénaéidines sont observés au niveau de l'organe lymphoïde (Muñoz *et al.*, soumis). Ce tissu serait en effet impliqué dans l'élimination de micro-organismes (Van de Braak *et al.*, 2002). Dans les premières heures suivant une infection à *Vibrio*, des pénaéidines sont nettement localisées au niveau des branchies où des bactéries sont co-localisées, suggérant que ce tissu serait une des voies d'entrée du pathogène.

La seconde phase de la réponse immunitaire correspond à une réaction systémique se traduisant par une augmentation du nombre d'hémocytes exprimant des pénaéidines, à la fois dans la circulation sanguine et dans les tissus des crevettes. Des hémocytes caractérisés par une activité transcriptionnelle accrue de pénaéidines sont en effet observés, résultant probablement de l'activation de processus d'hématopoïèse (Muñoz *et al.*, 2002, soumis). De l'ensemble de ces résultats, il ressort que la capacité des crevettes à surmonter une infection peut dépendre de leur compétence à maîtriser le développement bactérien puis à rétablir leur homéostasie par activation de l'hématopoïèse.

Les pénaéidines apparaissent comme des éléments majeurs de la réponse immunitaire des crevettes du fait de leur abondance dans les hémocytes et de leur multifonctionnalité. L'étude de ces peptides menée à un niveau global, expression des gènes, distribution tissulaire, structurale ainsi que fonctionnelle, a permis de mieux comprendre la réponse des crevettes à des infections. Ces travaux ont révélé l'importance des hémocytes qui représentent un tissu hétérogène et mobile. La distribution relative des populations hémocytaires entre la circulation sanguine et les tissus dépend de la réaction. Ainsi, la diminution du nombre d'hémocytes circulants observée à l'issue d'une infection révélerait chez les animaux une immuno-compétence plutôt qu'une déficience comme cela a été parfois proposé. Une attention particulière doit être portée à la caractérisation des types et lignages hémocytaires. La caractérisation d'effecteurs exprimés spécifiquement dans les différentes populations morphologiques devrait permettre de progresser dans ce domaine.



## Évaluation de la réponse immunitaire

Outre la compréhension de la réponse immunitaire, l'accès à des données génomiques est particulièrement important pour établir des méthodes d'évaluation des capacités de défense des animaux en élevage, soit à des fins de prophylaxie, soit pour la mise en œuvre de plans de sélection d'animaux. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne les problèmes rencontrés dans les élevages de *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie. Un travail de caractérisation des gènes différentiellement exprimés chez des crevettes *L. stylirostris* ayant survécu à une infection à *V. penaeicida* a été entrepris par une approche d'hybridation soustractive (SSH, Suppression Subtractive Hybridization) entre les ADNc exprimés dans les hémocytes avant infection et après infection chez les mêmes individus ayant survécu à la vibriose (fig. 2). Environ 300 séquences hémocytaires ont été obtenues par SSH, pouvant être classées en trois groupes fonctionnels majeurs : des gènes impliqués dans la régulation de la transcription de gènes, des gènes impliqués dans le remodelage cellulaire et la phagocytose et enfin des gènes impliqués dans l'hématopoïèse (J. de Lorgeril, comm. pers.). Ces résultats confirment bien que l'hématopoïèse est une composante essentielle de la réponse antimicrobienne chez les crevettes pénéides. Par ailleurs, la haute représentativité de gènes de remodelage cellulaire souligne le rôle des réactions cellulaires vis-à-vis des *Vibrios*.

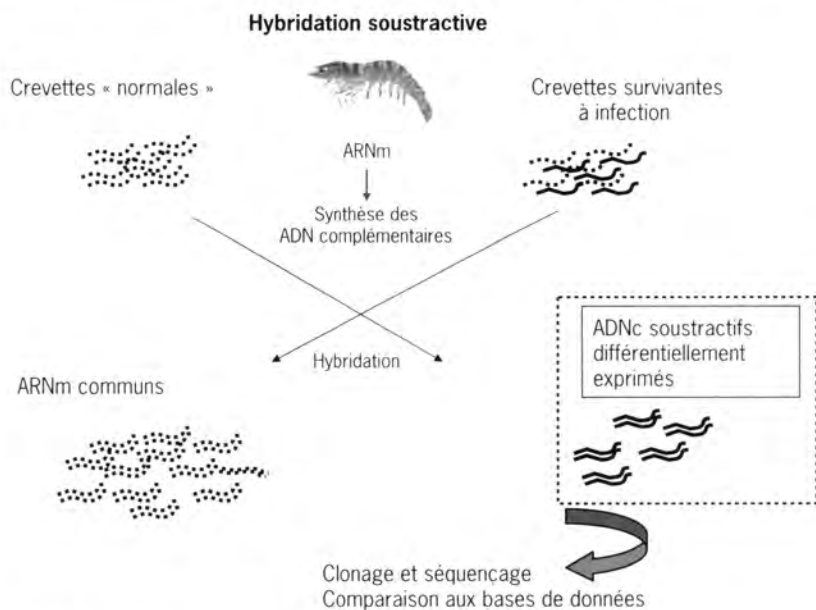


Figure 2 - Principe d'identification de gènes différentiellement exprimés chez des crevettes *Litopenaeus stylirostris* survivantes à une infection à *Vibrio penaeicida*.

Ces gènes identifiés sont de bons candidats pour des analyses globales d'expression génique qui permettront de quantifier la réponse immunitaire des crevettes. Les applications sont multiples : en pathologie, comparaison de la réponse des



crevettes à divers types de pathogènes bactériens ou viraux ; en écophysiologie, analyse de l'effet de différents paramètres physico-chimiques ou nutritionnels ; en sélection génétique, identification de marqueurs immunitaires potentiellement impliqués dans une meilleure réactivité aux infections. Par ailleurs, il est essentiel de déterminer les capacités immunitaires des crevettes aux différents stades de leur développement. Les approches de génomique fonctionnelle permettent d'étudier l'ontogenèse du système immunitaire et, à terme, de mieux appréhender les différences de susceptibilité observées entre les crevettes aux stades larvaires et les juvéniles.

### **Réponse immunitaire et contrôle des maladies**

---

L'étude de la réponse antimicrobienne chez les invertébrés marins offre de multiples applications en aquaculture qui sont actuellement explorées au travers d'un projet de collaboration (<http://www.ifremer.fr/immunaqua>). La recherche sur les peptides antimicrobiens chez les crevettes reste encore un vaste domaine à explorer. Ces effecteurs de l'immunité innée sont particulièrement attractifs pour leur utilisation potentielle en tant qu'agents thérapeutiques utilisables en éclosion, mais également en tant que marqueurs de sélection potentiels de résistance non spécifique à des pathogènes ou marqueurs de l'état de santé des crevettes. Les progrès réalisés dans la connaissance des mécanismes de défense des crevettes pénéides devraient permettre à terme de reconsidérer les pratiques culturales aux différents niveaux de la filière aquacole, depuis l'éclosion jusqu'à la production de juvéniles ou de géniteurs (Bachère, 2003).

### **Remerciements**

Les travaux résumés ici sont en partie financés par l'Ifremer, le CNRS et l'université de Montpellier 2. Ils font également partie d'un projet européen dans le programme INCO-DEV, Immunaqua, n° ICA4-CT-2001-10023. Les auteurs remercient Julie Fievet et Julien Garnier pour leur participation active aux travaux réalisés sur les crevettes pénéides.

## La gestion du flux d'oxygène chez les animaux aquatiques. Application au cas des crevettes pénéides

J.C. Massabuau, C. Soyez

Université Bordeaux 1-CNRS, UMR 5805, laboratoire d'écophysiologie et écotoxicologie des systèmes aquatiques, place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France  
jc.massabuau@epoc.u-bordeaux1.fr

### Résumé

Comprendre comment l'approvisionnement en oxygène est géré chez les animaux aquatiques, indépendamment des variations d'oxygénation de l'eau, est un vieux problème qui intéresse autant les aquaculteurs que les physiologistes. Dans cette revue, nous discutons dans un contexte large de la stratégie utilisée par les animaux aquatiques pour résoudre ce problème en incluant le cas des crevettes pénéides. Un des concepts de base élaboré, durant ces 20 dernières années, partiellement grâce aux crustacés, est basé sur le principe de constance de l'oxygénation du sang et des tissus quelle que soit l'oxygénation ambiante, au moyen d'une ventilation en permanence minimale. En bref, chez de très nombreux animaux aquatiques appartenant aussi bien aux crustacés, aux poissons qu'aux mollusques, on a démontré qu'indépendamment de la température et du niveau métabolique, la pression partielle d'oxygène ( $PO_2$ ) dans le sang artériel est réglée à une valeur faible et constante (1-3 kPa), largement indépendante de  $PO_2$  dans l'eau ambiante variant de 3 à 40 kPa (*i.e.*  $\approx 1$  à 12 mg/l à 28 °C). À partir de mesures faites chez *P. japonicus* et *L. stylirostris*, nous montrons que chez les pénéides la stratégie est comparable: ils ventilent de toute évidence au minimum pour avoir un sang le moins oxygéné possible.

Pourquoi une telle stratégie? L'atmosphère terrestre primitive dans laquelle est apparue la vie aérobie était pauvre en oxygène. Nos tissus de mammifère aérien à 37 °C fonctionnent toujours dans un milieu extracellulaire aussi pauvre en oxygène. En partant du postulat que la machinerie cellulaire a été mise en place dès les premières étapes de l'évolution et que les animaux aquatiques sont un intermédiaire évolutif entre les premiers unicellulaires et les mammifères modernes, nous avons proposé (Massabuau, 2001, 2002) que cette similarité est la conséquence d'un processus évolutif au cours duquel l'état d'oxygénation primitif a été conservé indépendamment de l'augmentation de l'oxygénation dans l'atmosphère terrestre et de l'évolution animale. Le résultat est que l'approvisionnement en oxygène de la cellule oscille en permanence entre, d'une part, le manque d'oxygène, à la limite du seuil d'anaérobiose et, d'autre part, l'excès, associé à la production de radicaux libres.

### Abstract

How oxygen is supply independently of water oxygenation in water breathers is an age-old problem of great interest to fish farmers and physiologist alike. This review paper will summarize the strategy used by water breathers to deal with

this problem and also considers the case of *Peneaus japonicus* and *Litopenaeus stylirostris* within a general framework. One of the basic concepts elaborated during the past 20 years, partly thanks to the crustacean model, deals with the notion of  $O_2$  homeostasis in the internal medium (Massabuau, 2001). It has been demonstrated that, in a wide range of physiologically different water-breathers studied at various activity levels, a low partial pressure of oxygen ( $PO_2 = 1-3$  kPa) provides a sufficient pressure head to ensure an adequate  $O_2$  supply at the cellular level. This is largely independent of  $PO_2$  changes in the environment in the range 3-40 kPa ( $\approx 1-12$  mg/l at 28°C). For reference, whatever the temperature,  $PO_2 = 21$  kPa in any air-equilibrated water. In addition, we present here experimental data performed in *P. japonicus* and *L. stylirostris* showing that despite an exceptionally high metabolic levels (see Wabete *et al.*, this volume), these shrimps also adjust their ventilatory activity to maintain a blood oxygenation status as low as possible whatever the water oxygenation level and their feeding status. *P. japonicus* is able to maintain its  $O_2$ -consumption constant down to water  $PO_2 \approx 3$  kPa at 20 and 28°C (corresponding  $O_2$  concentrations  $\approx 1-1.2$  mg/l).

What about the reasons for such an astonishing strategy? The primitive atmosphere where aerobic life started on earth was poorly oxygenated. Remarkably, not only in the modern water-breathers cited above, but also in mammalian tissues, including brain at 37°C, the most frequently measured  $PO_2$  is in the same low range. Based on the postulate that basic cellular machinery has been established since the early stages of evolution, it has been proposed that this similarity in oxygenation status is the consequence of an early adaptation strategy which, subsequently throughout the course of evolution, maintained cellular oxygenation in the same low and primitive range independent of environmental changes (Massabuau, 2001). The rationale for such an evolutionary theory is discussed in terms of an equilibrium between physiological and pathological reactions associated with  $O_2$  excess vs  $O_2$  lack and emerging concepts about the importance of cellular  $O_2$ -dependent mechanisms in the low but physiological  $PO_2$  range.

## Introduction

D'un point de vue évolutionniste, on a maintenant une idée de plus en plus claire de l'atmosphère primitive dans laquelle la vie aérobie a commencé à évoluer sur terre. Alors que notre planète a environ 4,6 milliards d'années, on pense que la pression partielle d'oxygène,  $PO_2$ , a augmenté de  $\approx 0,2$  à  $\geq 3$  kPa il y a à peu près 2,2 à 1,9 milliard d'années (Holland, 1994; Canfield, 1998). Des traces d'animaux unicellulaires suggèrent que la vie aérobie existait alors (Han & Runnegar, 1992), ce qui montre que la vie primitive est apparue dans un milieu extracellulaire très peu oxygéné. On pense que la pression partielle d'oxygène dans l'air a atteint l'état actuel, c'est-à-dire 21 kPa, il y a 1 à 0,5 milliard d'années (Canfield & Teske, 1996; Canfield, 1998). Dans cette revue, nous montrerons que chez un très vaste ensemble d'animaux à respiration aquatique, incluant les crevettes péneïdes, la pression partielle d' $O_2$ ,  $PO_2$ , dans le sang artériel, *i.e.* quittant les branchies, est réglée à ces mêmes  $PO_2$  basses. Plus encore, on rappellera que les cellules de mammifères à respiration aérienne fonctionnent aussi à ces niveaux d'oxygénation faibles.

Pour référence, 1 kPa = 7,5 Torr ou mm Hg ;  $PO_2 = 1$  kPa correspond à une fraction d' $O_2$  de  $\approx 1$  % de la pression barométrique ( $\approx 100$  kPa) au niveau de la mer. Dans l'eau, l'état de l'oxygène peut être décrit par la loi de Henry ( $CO_2 = \alpha_w O_2 \times PO_2$  avec  $CO_2$ , la concentration d' $O_2$  dans l'eau ;  $\alpha_w O_2$  sa solubilité et  $PO_2$  sa pression partielle). Une eau de mer équilibrée avec les 21 % d' $O_2$  contenus dans l'air a une pression partielle de 21 kPa, contient à 20 °C, 7,4 mg d' $O_2$ /l et à 28 °C, 6,4 mg d' $O_2$ /l.

### **La gestion du flux d'oxygène chez les animaux aquatiques**

Comment les échanges gazeux sont réglés chez les animaux aquatiques est un vieux problème qui a fait l'objet de très nombreux travaux et de multiples revues (Randall, 1970 ; Dejours, 1981, 1988 ; Taylor, 1982 ; Shelton *et al.*, 1986 ; Burggren & Roberts, 1991 ; Truchot, 1992). D'une façon générale, on sait parfaitement que les animaux aquatiques régulent leur ventilation de façon inversement proportionnelle à l'état d'oxygénation de l'eau. Comment cette régulation a pour résultat d'assurer la prise d'oxygène a été par contre très débattu et on a longtemps parlé « d'oxyconformeurs » (animaux dont la consommation d' $O_2$  suivait passivement les variations d'oxygénation du milieu) et « d'oxyrégulateurs » (animaux capables de maintenir leur consommation d' $O_2$  indépendamment de ces variations). On sait aujourd'hui que la différence de comportement était souvent basée sur des conditions expérimentales très différentes. La majorité des auteurs acceptent aujourd'hui l'idée que la plupart des animaux aquatiques étudiés sont capables de maintenir leur consommation d'oxygène indépendante des variations d'oxygénation dans le milieu. L'idée que la ventilation est une étape fondamentale est aussi largement acceptée.

Par contre, le fait que des animaux aquatiques régulent l'état d'oxygénation de leur sang et donc de leur milieu extracellulaire à des niveaux d'oxygénation semblables à celui qu'on attribue à l'atmosphère primitive, dans une large gamme de variation de  $PO_2$  dans l'eau, a été découvert il y a un peu moins de 20 ans chez l'écrevisse (Massabuau & Burtin, 1984). C'est en effet chez cet animal qu'on a montré pour la première fois l'existence d'une stratégie d'adaptation ventilatoire basée sur la maintenance de faibles  $PO_2$  dans le sang artériel qui irrigue les cellules. On sait maintenant que la vie avec des faibles  $PO_2$  dans le sang est quelque chose de très répandu et fait partie du répertoire physiologique normal d'un animal à respiration aquatique (Massabuau, 2001, 2002).

La nature de cette relation entre  $PO_2$  dans le sang artériel et l'eau ambiante au repos et à jeun est présentée sur la figure 1A (Massabuau, 2001). Notez que, parmi ces animaux, on trouve des mollusques, crustacés, poissons et annélides. Il est clair que ces valeurs sont faibles, que ce soit dans une eau normoxique c'est-à-dire équilibrée à l'air ( $PO_2 = 21$  kPa), hyperoxique (jusqu'à 40 kPa) ou fortement hypoxique (4-5 kPa). L'ensemble de ces données est donc une double démonstration montrant : (i) que la maintenance de faibles  $PO_2$  dans le sang qui va « oxygéner » les cellules est du même ordre de grandeur (1-3 kPa) que dans l'atmosphère primitive dont nous parlions plus haut ; (ii) une caractéristique forte de la physiologie respiratoire d'animaux physiologiquement très différents. Pour résumer, on peut rappeler que cette « stratégie des faibles  $PO_2$  » est indépendante de l'espèce et du phylum, du



milieu (marin ou eau douce), de l'organisation des animaux et de leur appareil respiratoire (type de branchie, de pompe ventilatoire, de système circulatoire ouvert ou fermé), de l'absence ou la présence de pigment respiratoire (hémoglobine, hémocyanine...) et de sa concentration dans le sang (Forgue *et al.*, 1992).

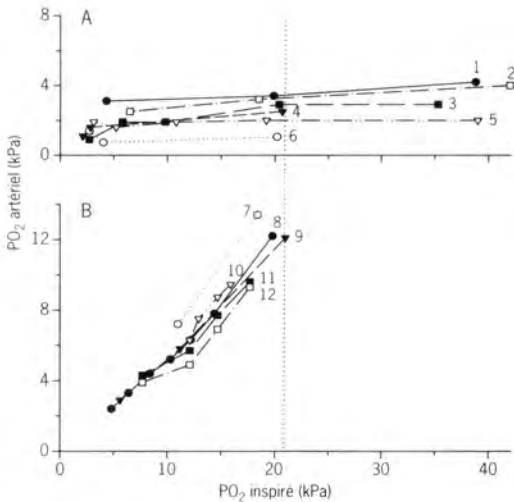


Figure 1 - Relation entre la pression partielle d'O<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, dans le sang artériel et dans le milieu inspiré chez divers animaux à respiration aquatique (A) et à respiration aérienne (B). Chez les animaux aquatiques, PO<sub>2</sub> est faible et constant quel que soit l'état d'oxygénation du milieu. Chez les animaux aériens, la relation est totalement différente. PO<sub>2</sub> est élevé en normoxie (i.e. dans l'air au niveau de la mer) et diminue progressivement en hypoxie. La ligne pointillée verticale indique la valeur normoxie, PO<sub>2</sub> = 21 kPa.

(1) Corbicule, Tran *et al.*, 2000; (2) carpe, Itazawa & Takeda, 1978 and Takeda, 1990; (3) écrevisse, Massabuau & Burtin, 1984; (4) crabe chinois, Forgue *et al.*, 1992; (5) silure, Forgue *et al.*, 1989; (6) crabe vert, Legeay & Massabuau, 1999 and Forgue *et al.*, 1992; (7) canard, Bouverot, 1985; (8) rat, Turek *et al.*, 1978; (9) homme, Dejours, 1981; (10) homme, Chiodi, 1963; (11) lama et (12) mouton, Bancharo & Grover, 1972. Pour la clarté, les valeurs moyennes sont présentées sans erreur standard, n = 5-12 animaux par point expérimental.

### Validité du concept sur le terrain

Toutes les données présentées sur la figure 1A ont été mesurées à 15 °C chez des animaux au repos dans les conditions particulières d'un laboratoire où tout était fait pour isoler les animaux des bruits et vibrations usuels liés à l'activité humaine. Que se passe-t-il sur le terrain, c'est-à-dire dans des conditions écologiquement réalistes? Le problème a été étudié dans le bassin d'Arcachon, à différentes saisons et donc températures, chez l'exemple de crustacé le plus étudié dans le monde, *Carcinus maenas*. Les mesures ont été réalisées au bout de la jetée qui se trouve devant la station marine d'Arcachon (Massabuau & Forgue, 1996). L'échantillonnage a été réalisé en février (T = 10-11 °C) octobre (T = 14-15 °C) et juin (T = 20 °C). Les résultats sont présentés sur la figure 2, non plus par des moyennes comme sur la figure 1, mais sur des histogrammes de fréquence montrant les valeurs les plus fréquemment observées ainsi que les extrêmes. On voit bien que, comme au laboratoire, les valeurs les plus fréquemment mesurées (i.e. les modes), sont toujours dans la gamme 1-3 kPa. Il est aussi très clair que leur distribution est indépendante de la saison et de la température (valeurs moyennes: 2,7 ± 0,8 kPa à 10 °C en février, n = 26; 3,0 ± 0,8 kPa à 15 °C en octobre, n = 24; 3,2 ± 0,8 kPa à 20 °C en juin, n = 9). Le fonctionnement avec de faibles pressions partielles d'O<sub>2</sub>

dans le sang est donc bien une réalité chez l'animal aquatique en condition de terrain. C'est aussi un mode de fonctionnement qui paraît indépendant du niveau métabolique basal puisque *Carcinus maenas*, le crabe vert, est un animal à sang « froid » i.e. un poïkilotherme dont le niveau métabolique varie en fonction de la température. Nous verrons plus loin que cette indépendance se confirme dans les cas de *P. japonicus* et *L. stylirostris* puisqu'à 28 °C, malgré un métabolisme exceptionnellement élevé (jusqu'à 10 fois celui d'un crabe comme *Carcinus maenas*), les valeurs de PO<sub>2</sub> dans le sang de ces crevettes sont aussi très faibles.

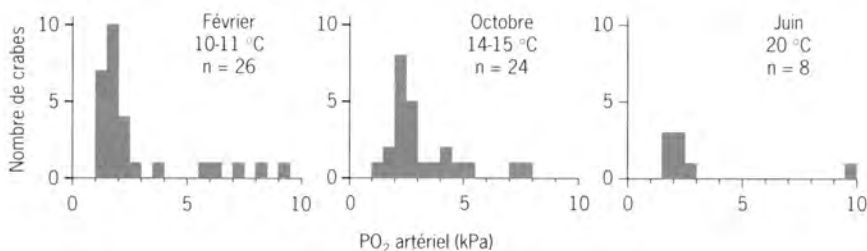


Figure 2 - Distribution des valeurs de PO<sub>2</sub> artériel les plus fréquemment mesurées chez le crabe vert *Carcinus maenas* échantillonné *in situ* dans le bassin d'Arcachon à différentes saisons de l'année et températures de l'eau. Ces valeurs sont faibles et semblables, indépendamment de la température et la saison, et donc du niveau métabolique (Massabuau & Forgue, 1996).

### Que se passe-t-il chez les animaux aériens ?

Chez les animaux aériens, oiseaux et mammifères, la gestion des flux d'oxygène est aussi organisée, comme chez l'animal aquatique, pour maintenir l'approvisionnement d'oxygène au flux nécessaire et suffisant au fonctionnement cellulaire. Cependant, la figure 1B montre que deux différences fondamentales existent en ce qui concerne le réglage de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel. D'une part, alors que dans un milieu normoxique (21 kPa, ligne pointillée verticale), PO<sub>2</sub> artériel est faible chez l'animal à respiration aquatique, sa valeur est beaucoup plus élevée chez les oiseaux et les mammifères. La totalité des mesures est dans la gamme 10-14 kPa. D'autre part, et en corollaire, alors que dans un milieu peu oxygéné PO<sub>2</sub> artériel peut rester faible et constant chez l'animal aquatique, PO<sub>2</sub> artériel diminue rapidement chez les animaux aériens.

En termes de physiologie respiratoire comparée et d'évolution, il existe donc une différence fondamentale entre les crustacés, poissons, mollusques et annélides et les oiseaux et mammifères. On peut cependant se demander pourquoi les animaux à respiration aérienne, qui dérivent tous d'organismes aquatiques, n'ont pas gardé cette possibilité de régulation ? Plongés dans un milieu 30 fois plus riche en oxygène que le milieu aquatique (c'est le rapport entre les coefficients de solubilité d'O<sub>2</sub> dans l'air et dans l'eau, voir Dejours, 1981), ils pourraient au contraire, comme les animaux aquatiques, avoir non seulement conservé mais accentué la stratégie des PO<sub>2</sub> artériels faibles. Dejours (1981) a d'ailleurs parfaitement bien montré que, pour extraire une quantité unitaire d'oxygène du milieu dans lequel il vit, l'animal aquatique doit ventiler beaucoup plus d'eau que l'animal aérien

ne doit ventiler d'air. En fait, la première question à se poser est de savoir si le phénomène est dû à la différence drastique existant entre les deux milieux (eau/air) ou, à la différence d'intensité du métabolisme oxydatif existant entre poïkilothermes aquatiques et homéothermes aériens. Pour éclaircir ce point, on peut analyser le fonctionnement des poïkilothermes aériens, comme les araignées par exemple ou les crabes des cocotiers, et rechercher dans la littérature des exemples montrant s'ils suivent la stratégie des faibles  $PO_2$ . Ces poïkilothermes aériens sont, d'un point de vue évolutif, des intermédiaires entre poïkilothermes à respiration aquatique et homéothermes aériens. Un exemple très clair est celui de la tarentule *Eurytelma californicum* (Angersbach, 1978). La figure 3 présente la distribution des valeurs de  $PO_2$  artériel chez des tarentules respirant dans une ambiance normoxique ( $PO_2$  dans l'air = 21 kPa comme dans une eau bien aérée). La valeur moyenne de  $PO_2$  artériel est 4 kPa avec des minima à 1,3 kPa et des maximums à 5,6 kPa. Ce poïkilotherme aérien présente donc clairement des  $PO_2$  artérielles semblables à celles du crabe *Carcinus maenas* et d'autres animaux aquatiques (comparer avec les fig. 1A et 2), franchement plus basses que les 10-14 kPa caractéristiques des homéothermes aériens. La différence de milieu eau/air n'est donc pas l'explication. On peut plutôt suggérer que la solution doit être recherchée dans la différence de niveau métabolique, acquise plus tard dans l'évolution, avec la capacité au fonctionnement cellulaire à 37-40 °C. Il faut certainement chez les homéothermes une tête de pression plus élevée dans le sang artériel pour assurer le flux entrant d'oxygène, purement diffusif, du sang artériel dans la cellule. Notons finalement que, chez ces homéothermes, lorsqu'on mesure  $PO_2$  dans les tissus avec des microélectrodes à  $O_2$  ou d'autres techniques, on s'aperçoit que les valeurs obtenues sont parfaitement comparables à ce qui est décrit sur les figures 2 et 3 (Massabuau, 2001). Il semble donc que la notion de stratégie des faibles  $PO_2$  décrite depuis le début de ce texte dans le cas du sang artériel des animaux aquatiques s'applique en fait pour l'état d'oxygénation cellulaire d'un très grand nombre d'animaux en général, incluant poïkilothermes et homéothermes.

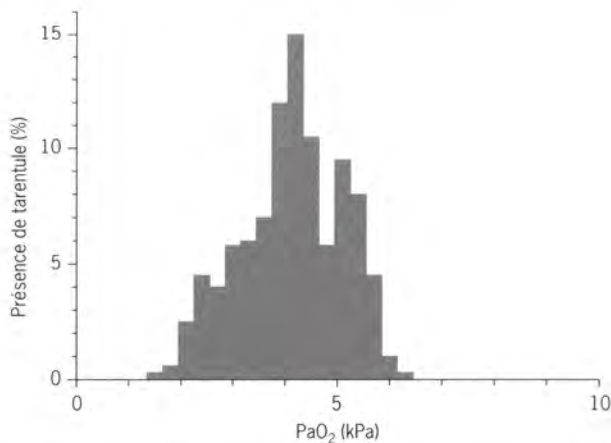


Figure 3 - Distribution des valeurs de  $PO_2$  artériel les plus fréquemment mesurées chez un poïkilotherme à respiration aérienne, la tarentule *Eurytelma californicum* à 22-24 °C. Noter la similitude avec les données de la figure 2, obtenues chez le crabe, malgré la différence de milieu inspirée (Angersbach, 1978).

### **Pourquoi maintenir des cellules à un niveau peu oxygéné ? Non pas une, mais plusieurs raisons (Massabuau, 2001)**

Comme on l'a déjà largement évoqué, la première raison est probablement liée à un problème évolutif. La pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang des poikilothermes à respiration aquatique puis aérienne, intermédiaires évolutifs entre les premiers unicellulaires et les mammifères et oiseaux modernes, serait réglée à la valeur à laquelle les premières cellules nucléées sont apparues il y a environ 2 milliards d'années. On ne changerait pas une formule qui marche.

La deuxième raison pour laquelle on doit maintenir des cellules à une valeur de PO<sub>2</sub> faible est que la demande d'oxygène au niveau cellulaire n'est pas uniquement liée au problème de la production d'ATP. On connaît à ce jour une centaine de réactions, utilisant l'oxygène comme substrat, qui présente des KmO<sub>2</sub> supérieurs aux valeurs de PO<sub>2</sub> comprises dans la gamme 1-3 kPa. Changer les valeurs de PO<sub>2</sub> cellulaire veut donc dire changer leur vitesse de réaction (Vanderkooi *et al.*, 1991). On sait aussi qu'O<sub>2</sub> et ses formes radicalaires dérivées jouent un rôle comme second messager (Sauer *et al.*, 2001), et neuromodulateur (Clemens *et al.*, 2001). Par exemple, Fandrey *et al.* (1994) ont clairement montré que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est PO<sub>2</sub> dépendante au-dessus de 4 kPa. Le réglage de PO<sub>2</sub> extra- et intracellulaire à une valeur faible et précise apparaît donc, d'une façon qu'on ne fait qu'entrevoir encore, comme une des multiples clefs du fonctionnement et de la communication cellulaire.

La troisième raison est probablement liée aux problèmes de toxicité de l'oxygène et des radicaux libres. Les pressions partielles d'O<sub>2</sub> élevées aboutissent à la production de ROS (Reactive Oxygen Species) qui sont des composés excessivement toxiques pour la cellule (Finkel & Holbrook, 2000; Kirkwood & Austad, 2000). À ce sujet, il est remarquable de constater que les animaux à respiration aquatique possèdent, comme les animaux à respiration aérienne, pratiquement tous les mécanismes enzymatiques permettant de neutraliser ces radicaux libres (catalases, superoxyde dismutase, etc.) et de réparer les dégâts provoqués par l'oxygène au niveau cellulaire. L'observation suggère donc très fortement que chez l'animal aquatique le problème que représentent ces radicaux libres doit être tout aussi important que chez le mammifère. En fait, bien qu'on ne connaisse pas les valeurs de PO<sub>2</sub> cellulaire chez l'animal aquatique, on sait qu'elles sont en valeurs absolues légèrement inférieures à celles mesurées chez les mammifères aériens. Les valeurs de PO<sub>2</sub> dans le sang veineux mêlé chez le crabe *Carcinus maenas* (0,54 ± 0,04 kPa à 15 °C; Legeay & Massabuau, 1999), le silure *Silurus glanis* (0,6 kPa à 15 °C; Forgue *et al.*, 1989) et le bivalve *Corbicula fluminea* (2,1 ± 0,2 kPa à 15 °C; Tran *et al.*, 2000) comparées à celles du sang artériel (voir fig. 1) montrent qu'elles sont dans cette fourchette d'ordre de grandeur.

### **Le cas des crevettes pénéides**

En ce qui concerne le cas des crevettes pénéides, à notre connaissance il n'y avait pas de données disponibles dans la littérature sur leur capacité à maintenir leur consommation d'O<sub>2</sub> en hypoxie en préservant l'état d'oxygénation de leur milieu intérieur. Seuls des travaux qui ont été réalisés dans notre groupe montrent clairement que ces animaux aussi règlent l'état d'oxygénation de leur sang à des



valeurs faibles et constantes. La figure 4A présente la capacité à maintenir une consommation d'O<sub>2</sub> constante, indépendamment de variations d'oxygénation dans la gamme hypoxique à 28 et 20 °C chez *L. stylirostris* à Tahiti. Ce n'est qu'à partir de ≈ 3 kPa (≈1-1,2 mg/l) que la consommation d'O<sub>2</sub> ne peut plus être maintenue. Ce résultat illustre et caractérise le potentiel de l'espèce face à des eaux peu oxygénées. Il est important de remarquer que ces données correspondent au métabolisme « basal », *i.e.* de repos, qui sont les valeurs minimales mesurées dans un respiromètre (voir Wabete *et al.*, même volume, fig 1). Notons également qu'elles sont parfaitement cohérentes avec ce qui a été rapporté dans des conditions expérimentales semblables pour de nombreux autres types d'animaux aquatiques (voir fig. 4 *in* Massabuau, 2001). Cette analogie de comportement chez les pénéides est confirmée sur la figure 4B qui présente la relation existant entre PO<sub>2</sub> artériel et PO<sub>2</sub> dans l'eau inspirée chez *Peneaus japonicus* à 20 °C. Les mesures ont été réalisées à Arcachon sur des animaux issus d'élevages du Médoc (sud-ouest de la France). Elles ont été faites chez des individus à jeun. On voit clairement que les valeurs sont faibles en normoxie (PO<sub>2</sub> artériel ≈ 1 kPa alors que dans l'eau PO<sub>2</sub> = 21 kPa). Elles n'augmentent pas en hyperoxie dans une situation où la saturation est multipliée par un facteur 2. Remarquablement aussi, elles ne diminuent pas largement en hypoxie dans une eau où PO<sub>2</sub> ≈ 3 kPa, ce qui représente 15 % de la saturation à l'air. Cette capacité à maintenir une valeur de PO<sub>2</sub> artériel proche des valeurs normales dans des conditions d'oxygénation très variables est certainement une des explications de la résistance des pénéides à des hypoxies profondes durant quelques heures en bassin d'élevage. On sait cependant que cette valeur faible, et bloquée (elle ne peut augmenter à cause de la limitation ambiante),

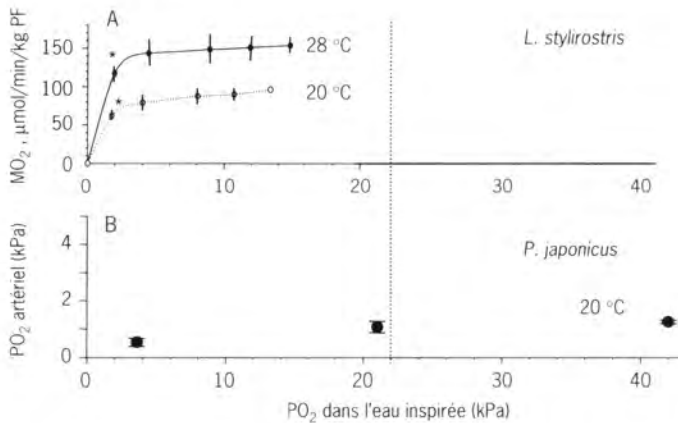


Figure 4 - Capacité à maintenir la consommation d'O<sub>2</sub> et l'état d'oxygénation du sang artériel chez les crevettes pénéides. (A) Relation entre la consommation d'oxygène et la pression partielle d'O<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>, dans l'eau inspirée chez *L. stylirostris* à 20 et 28 °C (mesures faites à Tahiti, Polynésie française après 12 h d'acclimatation dans le respiromètre; chaque valeur correspond à un plateau de 8-12 h et chaque changement de plateau [réalisé dans un ordre décroissant] était effectué en 1 h, BM = 10-12 g PF). (B) Relation entre la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel et dans l'eau inspirée chez *P. japonicus* (mesures faites à Arcachon, France). Chaque valeur correspond à un plateau de 24 h, BM = 20 g PF. Comme chez un grand nombre d'animaux aquatiques physiologiquement différents (Massabuau, 2001), les crevettes pénéides sont capables de maintenir leur consommation d'O<sub>2</sub> et l'état d'oxygénation de leur sang jusqu'aux environs de 3 kPa, c'est-à-dire jusqu'à ≈ 15 % de la saturation à l'air. Ligne pointillée, valeur de PO<sub>2</sub> normoxique correspondant à 7,8 mg/l à 20 °C et 6,7 mg/l à 28 °C. N = 7-14 animaux par point. \*, significativement différent de la valeur immédiatement supérieure. Aucune mortalité n'a été observée pendant et à la suite de ces expériences.

est incompatible avec un cycle de vie normale. Des augmentations transitoires fréquentes, bien que de faible amplitude en valeur absolue, ont été décrites chez les crustacés dans différentes phases d'activité (Forgue *et al.*, 1989; Gannon & Wheatly, 1995; Clemens *et al.*, 2001; Mente *et al.*, 2003).

L'évolution de  $PO_2$  artériel après un repas en condition normoxique à 20 °C est présentée sur la figure 5. Des *Peneaus japonicus* étaient nourries avec des morceaux de manteau de seiche, un aliment hautement énergétique. Il est à nouveau très clair que, dans ces conditions, ces animaux continuent de suivre la stratégie des faibles  $PO_2$ . Le phénomène est particulièrement intéressant car il est à opposer à ce qu'on avait décrit chez le homard breton *Gammarus homarus* (Clemens *et al.*, 1998) et le crabe vert *Carcinus maenas* (Mente *et al.*, 2003). Chez ces deux espèces, on observe une augmentation transitoire de  $PO_2$  artériel de 1-2 à 3-4 kPa pendant la première partie de la digestion. Les raisons de cette particularité restent donc à être confirmées et éventuellement étudiées chez *L. stylirostris*.

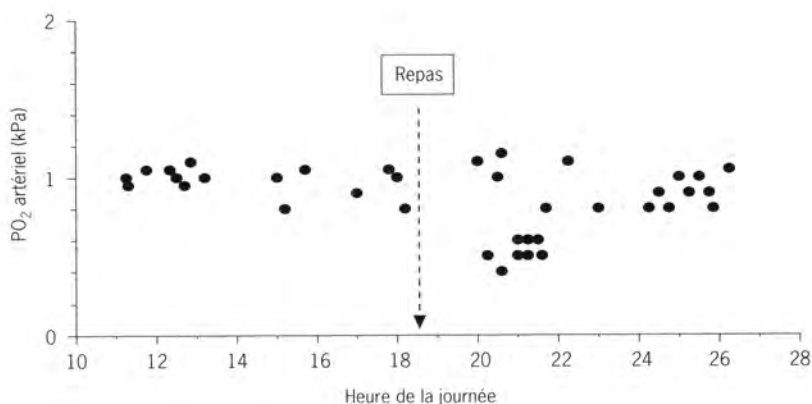


Figure 5 - Évolution de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel de *P. japonicus* en fonction du temps avant et après un repas constitué par des morceaux de manteau de seiche (T = 20 °C). Bien que le métabolisme aérobie soit très probablement multiplié par un facteur 2-3 comme chez les autres animaux aquatiques déjà étudiés, la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel n'augmente à aucun moment. Chaque point est une mesure individuelle chez un animal.  $PO_2$  dans l'eau = 20,5 kPa (7,8 mg/l), n = 40 animaux, BM = 20 g PF.

## Conclusion

En conclusion, si, dans les grands principes, les problèmes liés à la respiration et à l'adaptation aux variations d'oxygénation du milieu paraissent connus chez les animaux aquatiques, de nouvelles données de la physiologie ou écophysiologie récente doivent être intégrées. En particulier, le fait que les animaux aquatiques règlent l'état d'oxygénation de leur milieu intérieur à des valeurs faibles, voire très faibles, indépendamment des variations d'oxygénation du milieu doit être pris en compte dans une gestion raisonnée d'un biotope et/ou d'un cheptel. Comme on l'a montré ici en mettant le phénomène en perspective dans le règne animal, les crevettes pénéides suivent aussi la stratégie des faibles  $PO_2$  sanguines et tissulaires. Intégrer ces notions et développer nos connaissances dans ce domaine ne peut que permettre de mieux comprendre comment réagissent ces crevettes très particulières alors que l'oxymètre reste un des outils fondamentaux de l'aquaculteur.

## Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* à 20 °C

N. Wabete, L. Chim, P. Lemaire, J.C. Massabuau

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Nelly.Wabete@ifremer.fr

### Résumé

En Nouvelle-Calédonie, les taux élevés de mortalité associés à une fragilité excessive des crevettes sont un problème majeur des élevages pendant l'hiver et les périodes de transition saisonnière. La conséquence de ce problème spécifique, qui se rajoute aux faibles taux de croissance en hiver, est un arrêt de la production pendant environ 3 mois, ce qui constitue un frein au développement de l'industrie. Le but de cette étude est de documenter quelques aspects des dérèglements physiologiques liés à une manipulation et un transfert rapide de crevettes vers des enceintes expérimentales maintenues à des températures comprises entre 20 et 28 °C. Des crevettes ont été pêchées dans un bassin d'élevage ( $T = 23-25$  °C) de la ferme expérimentale de Saint-Vincent (Nouvelle-Calédonie), entre septembre et octobre 2002, en utilisant une procédure standard, et transférées, dans un délai de 10 minutes, dans un bassin en béton extérieur ou en laboratoire dans des bacs en PVC à la même température. L'intensité du métabolisme aérobie, la capacité osmorégulatrice (CO) et la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel ( $PaO_2$ ) ont été mesurées en fonction du temps après la manipulation. Les résultats sont comparés aux données de référence obtenues au centre océanologique du Pacifique (Tahiti), où les conditions d'élevage sont extrêmement stables tout au long de l'année, avec des températures comprises entre 26 et 28 °C. Le métabolisme oxydatif de repos de *L. stylirostris* est exceptionnellement élevé. Les troubles majeurs associés à une manipulation sont une stimulation transitoire de ce métabolisme, une suroxygénation du sang et un effondrement de CO. Le phénomène se produit dans les premières heures (1 à 6 h). La chute de la capacité osmorégulatrice jusqu'à 160-170 mosm/kg est indépendante de la température et du site d'étude, ce qui suggère que la phase initiale de rupture est principalement liée au stress de la manipulation. La phase de récupération semble température dépendante : elle est de l'ordre de 6 à 7 jours à 20 °C et de 24 h à 28 °C à Tahiti. L'évolution de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel de *L. stylirostris* est comparable à ce qui avait déjà été rapporté pour le crabe vert *Carcinus maenas* suite à un transfert en laboratoire (Massabuau & Fougue, 1996) bien que, pour la crevette à 22 °C, le retour à des valeurs de 1-2 kPa soit réalisé en uniquement 30 heures. Pour référence, dans une eau équilibrée à l'air,  $PO_2 = 21$  kPa. La manipulation entraîne donc en hiver des perturbations physiologiques plus profondes que prévues qui pourraient expliquer partiellement l'exceptionnelle fragilité hivernale.

## Abstract

---

High mortality rates associated with excessive fragility are a severe problem in shrimp farms during winter and seasonal transition periods in New Caledonia. The consequence of this specific problem (associated with low winter growth rates), is a stop of production for about 3 months, which is a bottleneck for the development of the industry.

The aim of the present report was to document some aspects of the physiological disturbance and time constant involved, following standard catching test and rapid transfer of the shrimp from the pond to experimental tanks held at temperature ranging from 20-28°C. First, we showed that even at 20°C, their O<sub>2</sub>-consumption is exceptionally high and comparable to tuna. Second, shrimps (weighing 38 g) were caught in a pond (T = 23-25°C) of the experimental shrimp farm of St-Vincent (New Caledonia), from September to October 2002 using standard procedures and transferred within 10 minutes in either outdoor concrete tanks or indoor plastic tanks (20-28°C). Osmoregulatory Capacity (OC), partial pressure of oxygen (PO<sub>2</sub>) in the arterial blood and whole body water content were then measured as a function of time after fishing. Results are compared to reference data from the shrimp farm of Taravao, Tahiti, where temperature stays constant all year round (26-28 °C).

The major trouble associated to shrimp catch, either in Tahiti or New Caledonia, was a large change in OC associated to an outward water shift. Both phenomena occurred within the 1st hour of handling. The maximum drop was reached by one hour. The drop of OC was ≈ 60 mosm/kg and was independent of temperature change and field location, which suggests that the major drive was the initial stress itself. Importantly, the recovery was temperature dependent and took as long as 6-7 days at 20°C in comparison with 24 h in Tahiti at 28°C. Despite these costly ionoregulatory disturbances, the arterial PO<sub>2</sub> increased within the first hour but recovered at only 1-2 kPa by 30 h as previously described for the green crab *C. maenas* following transfer from the field to the laboratory (Massabuau & Forgue, 1996). For reference, PO<sub>2</sub> = 21 kPa in air-equilibrated water. Due to the low shrimp blood O<sub>2</sub>-carrying capacity and its excessively high O<sub>2</sub>-demand, the whole data set suggests an important heart work overload. It is concluded that handling represents a dramatic event with unexpected long-term physiological disturbances. It may partly explain excessive winter fragility.

## Introduction

---

La crevette péneïde *Litopenaeus stylirostris*, espèce cultivée en Nouvelle-Calédonie, est originaire du Pacifique. Son aire de répartition originelle va du nord du Mexique, où la température maximale peut atteindre 30 °C, au nord du Pérou où les minima passent rarement en dessous de 20 °C, ce qui illustre les limites thermiques de l'espèce. Dans les fermes de Nouvelle-Calédonie, c'est en 1993, à l'époque de la saison fraîche où les températures nocturnes peuvent être significativement inférieures à 20 °C, qu'une pathologie saisonnière à caractère épizootique a fait son apparition. Cette maladie, qui a reçu le nom de « Syndrome 93 » a été attribuée à une bactérie, *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998a). Les contraintes induites, principalement l'abandon des élevages de saison fraîche comme princi-



pale parade sanitaire, ont entraîné une baisse de la production néo-calédonienne. Le « Syndrome 93 », qui touche la majorité de la filière, est aujourd'hui un problème majeur à résoudre en termes de finalité économique et une piste centrale est l'aspect pathologie. La présence de *Vibrio penaeicida* (Mermoud *et al.*, 1998) toute l'année dans tous les élevages (y compris ceux où le syndrome ne se déclenche pas) et le synchronisme de son apparition aux saisons de fortes variations thermiques ont cependant conforté l'idée que la seule présence de la bactérie n'était pas suffisante pour rendre compte des mortalités. Un effort important a donc été fait par le laboratoire aquacole de Calédonie (LAC) à Saint-Vincent sur la description de l'état des bassins et leur gestion globale. L'observation a fait apparaître entre autres une forte relation entre le déclenchement du syndrome et le régime de température quand il atteint des minima en saison hivernale entre 18 et 22 °C. On sait maintenant que les périodes hivernales ainsi que d'entrée et de sortie de l'hiver cumulent les déficits dans les élevages, et qu'on assiste alors à une véritable « pénurie trophique » (Della Patrona *et al.*, en préparation). Cette « pénurie trophique », qui n'est pas compensée par l'aliment commercial, pourrait être à l'origine de carences nutritionnelles des animaux qui deviendraient ainsi plus sensibles au régime thermique typique de cette période (Chim *et al.*, 2001 ; Lemaire *et al.*, 2002).

D'un point de vue physiologique, ce qui caractérise certainement le plus les *L. stylirostris* sélectionnées pour l'aquaculture est une croissance rapide et une fragilité importante face aux stress. Un des buts de notre travail a été de caractériser les variations de leur niveau métabolique dans ces conditions et d'aborder les principes de la gestion des besoins en oxygène dans le cadre de la théorie des faibles niveaux d'oxygénation. L'idée globale est que *L. stylirostris*, avant et après un repas en normoxie et indépendamment de la température, devrait fonctionner avec des pressions partielles d'oxygène, PO<sub>2</sub>, dans le sang artériel exceptionnellement basses comme de très nombreux animaux aquatiques ( $\approx$  1-2 kPa ; pour comparaison, PO<sub>2</sub> dans le sang artériel humain est 10-14 kPa et dans l'air ou dans une eau aérée, 21 kPa ; Massabuau, 2001, 2002). Le fonctionnement avec d'aussi faibles PO<sub>2</sub> dans le sang pose bien sûr de nombreux problèmes puisque les animaux qui suivent cette stratégie fonctionnent à la limite du seuil d'anaérobiose (0,7-0,8 kPa), c'est-à-dire du manque d'oxygène au niveau cellulaire (Forgue *et al.*, 1992 ; Legeay & Massabuau, 2000). Tout problème venant interférer avec les processus de transfert des gaz du milieu ambiant jusqu'à la cellule peut alors avoir des implications fatales.

Pour aborder ces problèmes, nous avons étudié les mécanismes mis en jeu au moment de la phase de rupture d'équilibre qui suit une manutention représentative de celles qu'on impose dans les fermes d'élevage. Nous avons, d'une part, étudié l'intensité et l'évolution du métabolisme après une manipulation de quelques minutes en laboratoire et, d'autre part, nous avons analysé les mécanismes de régulation des échanges ioniques et respiratoires suite à un transfert du terrain au laboratoire (Massabuau & Forgue, 1996). En Nouvelle-Calédonie, cet acte s'accompagne d'une très forte mortalité en hiver, atteignant un maximum après 2-3 jours. Le même geste est sans conséquence en été. Tout au long de ce travail, l'état des animaux à Tahiti est pris comme référence. Deux raisons expliquent ce choix. La première est que *L. stylirostris* produite en Nouvelle-Calédonie provient de la souche qui avait été d'abord implantée à Tahiti, où elle ne fait pas l'objet d'exploitation intensive. La seconde raison concerne les conditions d'élevage à Tahiti, extrêmement stables tout au long de l'année, sans variation notable de température en

dehors de la plage 26-28 °C. Les premiers résultats présentés ici font partie d'une thèse en cours (thèse Nelly Wabete).

### Matériel et méthodes

Les expériences rapportées ont été réalisées au LAC, laboratoire aquacole de Calédonie à Saint-Vincent (Nouvelle-Calédonie) à la fin de l'hiver 2002. Les animaux ( $38,5 \pm 0,6$  g) utilisés proviennent principalement des élevages extensifs de la station de Saint-Vincent (0,5 à 2 animaux par mètre carré, dans des bassins de 1 200 m<sup>2</sup>). Ces élevages sont exclusivement orientés vers la production de géniteurs. Des animaux juvéniles provenant de la ferme Sodacal ont également été utilisés. Le prélèvement des animaux dans les bassins était fait à l'épervier, ils étaient ensuite transférés au laboratoire dans des bailles en plastique d'environ 50 litres. Une fois au laboratoire, la destination des animaux était fonction de l'expérimentation ; ils étaient mis soit dans un bassin en béton (15 m<sup>3</sup>), soit dans des bacs en plastique (250 l) thermorégulés. Quel que soit le système de bac considéré, l'eau était oxygénée en continu par injection d'air surpressé. Au cours de cette phase de stabulation, les crevettes étaient nourries avec un aliment expérimental complet (farine de poisson et de crustacés, huile de poisson, blé, soja, vitamines, oligo-éléments, gluten) à 5 % de leur biomasse totale.

### Analyses

**Détermination du stade de mue.** La détermination des stades de mue est basée sur les travaux de Drach & Tchernigovtzeff (1967). On observe, sous loupe binoculaire, la base des soies des écailles antennaires ou de l'uropode.

**Mesure de la consommation d'oxygène.** En bref, la consommation d'oxygène,  $\dot{M}O_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ , rapportée au poids frais, PF), était mesurée dans un respiromètre en circuit ouvert ( $V = 850$  ml) placé sur une table antivibratoire. Un schéma de principe du dispositif est présenté dans la section Matériel et méthodes dans Massabuau *et al.* (1984). La chambre à métabolisme et l'électrode étaient maintenues à la température étudiée (18 ou 20 °C). La chambre était alimentée en continu (débit de renouvellement,  $V_w$ ) par une eau de mer saturée en oxygène par bullage d'air ( $PO_2 = 21$  kPa). Un système de vannes commandées à distance permettait de mesurer successivement la valeur de  $PO_2$  de l'eau entrant ( $P_{in} O_2$ ) et sortant ( $P_{out} O_2$ ) de la chambre du respiromètre et ainsi d'effectuer un étalonnage journalier de l'électrode. Une hélice ( $\phi$  55 mm, vitesse de rotation 1 tour.sec<sup>-1</sup>) assurait une homogénéisation au sein du respiromètre de telle sorte que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau sortant de la chambre soient les mêmes que celles de l'eau inspirée par l'animal. Ces valeurs étaient mesurées en continu par une électrode polarographique à oxygène. Cette électrode était reliée à un système informatique permettant l'enregistrement en continu de la valeur de  $PO_2$  par le logiciel SHRIMP (développé par Gaël Guillou et Hervé Chartois, Crema L'Houmeau, Ifremer-CNRS).

La consommation d'oxygène,  $\dot{M}O_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), était calculée en appliquant le principe de Fick à l'état stationnaire :

$$\dot{M}O_2 = V_w \cdot \alpha_{O_2} \cdot (P_{in} O_2 - P_{out} O_2)$$

**Prélèvements sanguins.** Les prélèvements de sang artériel (100 à 150  $\mu$ l), destinés à la mesure de  $PO_2$  artériel, étaient réalisés à l'aide d'un capillaire en verre équipé d'une aiguille hypodermique introduite dans la cavité cardiaque, directement à travers la cuticule. Le sang artériel monte alors spontanément et par à-coups dans le capillaire et l'observation de ces battements permet de vérifier l'origine artérielle du sang ponctionné. La fiabilité de cette technique a été discutée dans des publications antérieures (Forgue *et al.*, 1992; Massabuau & Forgue, 1996). Le sang veineux était ponctionné au niveau du sinus infrabranchial (sang prébranchial) à l'aide d'un second capillaire en verre que l'on piquait ventralement sous le céphalothorax au niveau de la première paire de pléopodes. Les temps de prélèvement (sortie de l'animal de l'eau sans perturber les congénères et prélèvement d'hémolymphe) n'excédaient pas la minute. Après le prélèvement, le capillaire était bouché et déposé sur la glace pour ralentir le métabolisme et les phénomènes de coagulation. Le début des analyses était effectué dans la minute qui suivait.

**Oxygénation du sang.** La  $PO_2$  artériel était déterminée dans les 3 minutes qui suivaient le prélèvement sur 100  $\mu$ l d'échantillon avec une électrode polarographique à oxygène (Radiometer E5046) thermostatée à la température des bacs d'élevage et de maintenance. L'électrode était préalablement étalonnée avec des solutions à  $PO_2 = 0$  et 21 kPa.

**Pression osmotique.** La mesure était effectuée au moyen d'un osmomètre Wescor 5520 à tension de vapeur. La capacité osmorégulatrice (CO) correspond à la différence entre la pression osmotique de l'hémolymphe et celle du milieu d'élevage (Charmantier *et al.*, 1989).

## Résultats

### Mesures de $O_2$ préprandial après une manipulation à 20 °C

L'évolution du métabolisme aérobie de *L. stylirostris* après une manipulation est caractérisée par des enregistrements très instables avec une alternance activité-repos présentant un rythme confus comme le montre l'enregistrement typique de la figure 1A. Les phases d'activité sont fréquentes, correspondant à un animal qui bouge constamment avec un métabolisme de repos difficile à appréhender. La figure 1B présente les valeurs moyennes obtenues chez les animaux en normoxie qui correspondent aux minima mesurés. On arrive à un plateau environ en 24 heures. La valeur moyenne de repos déterminée dans ces conditions est  $86,8 \pm 2,8$   $\mu$ mol/min/kg PF (n = 10 animaux). Dans les 2-3 premières heures après le transfert, elle atteignait  $163,7 \pm 10,2$   $\mu$ mol/min/kg PF. La figure 2 permet la comparaison avec une sélection de données représentatives de mesures publiées chez divers crustacés et poissons. On voit que, d'une façon globale, le métabolisme « de repos » mesuré chez *L. stylirostris* est parmi les plus élevés. Il est le double de celui de la truite *Oncorhynchus mykiss* et du saumon *Salmo salar* et se compare à celui de tunidés. Ces données confirment les mesures faites par C. Soyez au COP à Tahiti (voir Massabuau & Soyez, même volume) dans des conditions expérimentales comparables. Le métabolisme oxydatif de *L. stylirostris* est donc exceptionnellement important par rapport à celui des autres crustacés. Le phénomène est probablement à mettre en relation avec la croissance rapide de l'espèce.

### Dérèglement des échanges ioniques et respiratoires

Les figures 3A et 3B montrent l'évolution de la capacité osmorégulatrice (CO), et de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel (PaO<sub>2</sub>), d'animaux capturés à l'épervier en bassin d'élevage à t<sub>0</sub> (22 °C) et transférés en bac en béton de stabulation à la même température.

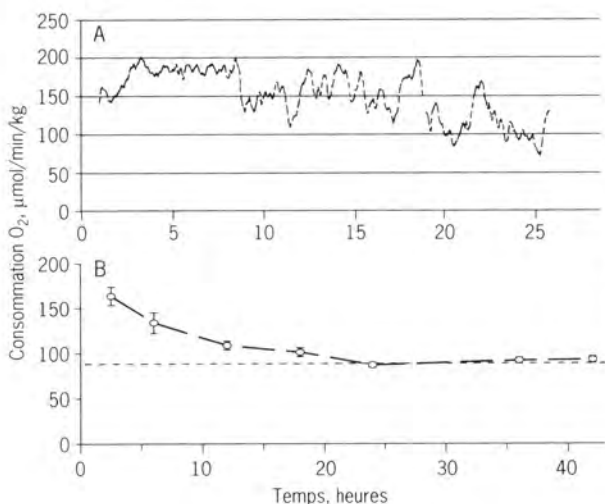


Figure 1 A et B  
Évolution de la consommation d'oxygène chez la crevette *L. stylirostris* après une manipulation de quelques minutes pour un transfert dans un respiromètre. (A) enregistrement typique d'un individu. (B) évolution moyenne chez 7 animaux. En B, seuls les minima, représentatifs d'un métabolisme basal, ont été pris en considération.

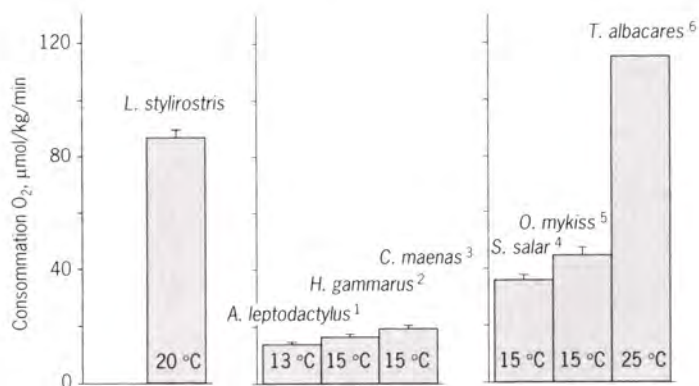


Figure 2 - Valeurs de consommation d'oxygène « au repos » (Mo<sub>2</sub>, moyenne ± 1 ES) chez quelques espèces d'animaux aquatiques (normoxie, salinité > 25 ‰). <sup>1</sup> Massabuau & Burtin, 1984; <sup>2</sup> Butler et al., 1978; <sup>3</sup> Taylor & Butler, 1978; <sup>4</sup> Maxime et al., 1990; <sup>5</sup> Ott et al., 1980; <sup>6</sup> Korsmeyer et al., 1996. La valeur chez *L. stylirostris* est supérieure à celles des salmonidés et approche celle de tunidiés.

Les résultats de Nouvelle-Calédonie pour la CO (fig. 3A; symboles foncés) sont comparés à ceux des analyses réalisées en référence à Tahiti (symboles clairs; Lignot, 1995). Il est remarquable de constater que, dans les conditions « optimales » de Tahiti (à 28 °C), la chute de CO est de la même amplitude qu'en Nouvelle-Calédonie mais que la récupération liée au transfert est réalisée en 24 h alors que, dans les conditions hivernales néo-calédoniennes (20-22 °C), la perturbation se prolonge pendant 6-7 jours. L'évolution des valeurs moyennes de PO<sub>2</sub> artériel est présentée sur la figure 3B. Ces valeurs culminent à 4-5 kPa juste après la manipulation et



diminuent progressivement pour atteindre un niveau stable et faible à partir de 24 à 48 heures. La figure 4 présente les valeurs les plus fréquemment mesurées (correspondant aux modes) et leur distribution en fonction du temps. Elles sont, dès le début, dans la gamme 1-3 kPa mais on voit bien que la diminution de la moyenne observée sur la figure 3B correspond à la disparition des valeurs élevées. Le phénomène est caractéristique d'animaux perturbés, présentant une activité instable (voir l'enregistrement de la fig. 1A) et hyperventilant de façon transitoire avec des phases de repos. Il est intéressant de voir que ces perturbations de l'oxygénation du sang sont tout à fait comparables à celles qui avaient été rapportées chez le crabe *Carcinus maenas* à la suite d'une pêche et de transferts entre le bassin d'Arcachon et la station marine d'Arcachon (Massabuau & Forgue, 1996).

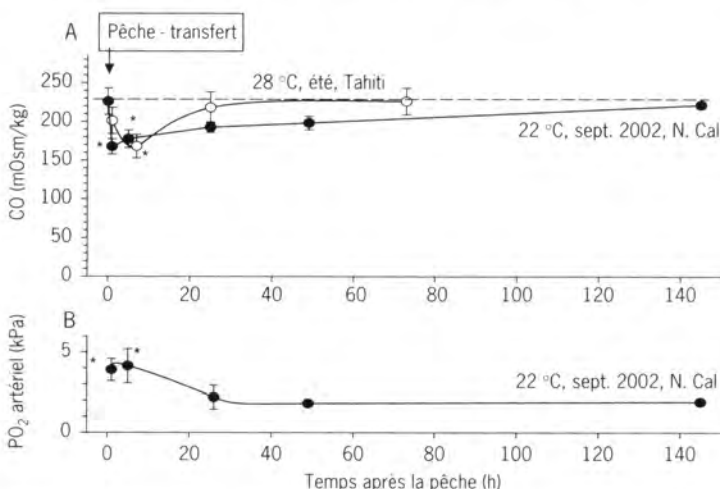


Figure 3 - Caractérisation du stress chez *L. stylirostris* en saison fraîche lors d'une pêche et d'un transfert à 22-23 °C en septembre (symboles noirs) et comparaison avec la référence de Tahiti à 28 °C (symboles clairs). (A) Impact sur la capacité osmorégulatrice et (B) sur la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel (moyenne  $\pm$  1 ES; n = 10-12 par point expérimental).

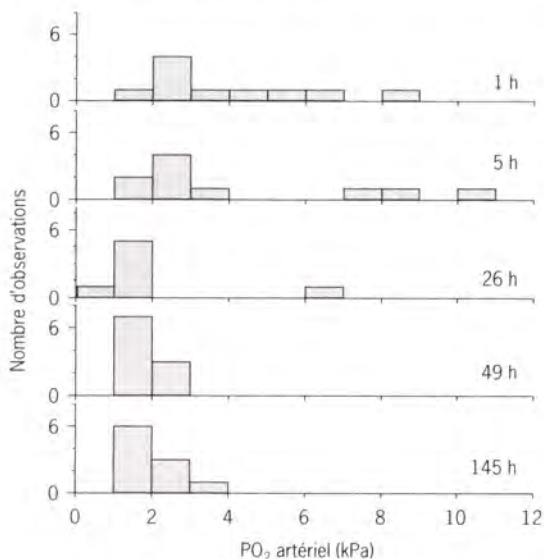


Figure 4  
Évolution de la distribution des valeurs de PO<sub>2</sub> dans le sang artériel de *L. stylirostris* après la pêche en bassin décrite sur la fig. 3. Transfert à 22-23 °C. La diminution des moyennes correspond à la disparition des valeurs les plus élevées. À comparer avec la cinétique décrite chez *Carcinus maenas* pour une manipulation semblable (Massabuau & Forgue, 1996).

## Discussion

Ce travail rapporte les résultats préliminaires d'une étude de physiologie respiratoire et des échanges ioniques sur les mécanismes de mortalité hivernale associés aux manipulations chez la crevette pénéide d'élevage, *Litopenaeus stylirostris*, implantée en Nouvelle-Calédonie depuis plus de 20 ans.

En bref, nous montrons que *L. stylirostris* a un métabolisme oxydatif de repos exceptionnellement élevé et comparable, lorsqu'il est exprimé par unité de poids, à celui d'un tunidé. Nous montrons, de plus, que toute manipulation du type pêche et transfert entraîne une forte stimulation du métabolisme, de profonds désordres de la balance hydrominérale et des changements significatifs de l'état d'oxygénation du sang qui prennent un à plusieurs jours pour être compensés. Ces résultats illustrent les perturbations physiologiques que subissent les animaux soumis à des perturbations liées à la manipulation et l'expérimentation en hiver. On sait qu'à cette période des mortalités très importantes accompagnent toute manipulation et transfert en Nouvelle-Calédonie. Par exemple, en ce qui concerne les mesures de métabolisme, nous montrons que, suite à une manipulation, le métabolisme est fortement stimulé pendant une période de 24 h avant d'atteindre un état stationnaire de repos dans nos conditions expérimentales. Pour bien évaluer l'importance du phénomène et la sensibilité des animaux, il est important de se rappeler que (i) l'aquarium de maintenance et le respiromètre étaient placés dans la même pièce et (ii) le temps de manipulation total était seulement de 1 à 3 minutes pour la mise en place des animaux. La manipulation agit donc de façon rapide (dès les premières minutes ou secondes) et importante. Cette question de la difficulté des mesures de métabolisme est peu discutée, car toujours embarrassante, mais a fait l'objet de revues occasionnelles (Herreid, 1980; Steffensen, 2002). Comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'évolution de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel observée est comparable à ce qui avait déjà été rapporté dans le cas d'un transfert laboratoire-terrain pour *Carcinus maenas* à Arcachon bien que, pour *L. stylirostris* à 22 °C, le retour à la normale soit réalisé en environ 30 h au lieu de 6 j à 15 °C pour *Carcinus*. Les causes de la différence sont bien sûr multiples. En plus de différences d'espèce et de température, il faut préciser qu'à Arcachon les crabes capturés par un pêcheur professionnel avaient fait un séjour à sec en chambre froide pendant environ 24 heures.

La chute initiale de capacité osmorégulatrice (pour rappel, l'animal régule une pression osmotique, PO, dans son sang largement inférieure à PO dans l'eau de mer et une chute de CO correspond donc à une diminution de  $\Delta PO$  entre eau et sang) correspond à une augmentation de la concentration ionique dans l'animal qui peut être expliquée par différents mécanismes. Elle peut être le résultat (1) d'une entrée nette d'ions ou (2), dans une optique dynamique, d'une entrée constante couplée à une extrusion qui aurait chuté. Par analogie avec des mécanismes qui ont déjà été décrits chez les poissons, le phénomène pourrait être consécutif à une décharge de type catécholinergique associée au stress et agissant à la fois sur les perméabilités branchiales et le contrôle urinaire.

Nos travaux montrent que toutes les perturbations de la balance hydrominérale que nous venons de décrire se déroulent alors que la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel évolue de 4-5 kPa après la manipulation jusqu'à une valeur plus faible et sensiblement constante. Dès 26 h, la valeur la plus fréquemment

mesurée est alors en permanence dans la gamme 1-3 kPa. Cette observation suggère, vu les troubles de pression osmotique et les effets que l'on connaît sur l'affinité de l'hémocyanine chez les crustacés (une augmentation de PO sanguine est associée à une diminution de l'affinité du pigment respiratoire pour O<sub>2</sub>, voir Truchot, 1987), que la concentration d'O<sub>2</sub> dans le sang devrait diminuer. Le phénomène correspond à une diminution de la capacité de transport d'O<sub>2</sub> par le sang et devrait impliquer une augmentation potentielle du débit cardiaque qui pourrait éventuellement se conclure par un accident cardiaque. On aurait peut-être ici une partie de l'explication des mortalités à court terme en période hivernale lors des manipulations d'animaux.

### **Application aux problèmes d'échantillonnage expérimental et de mortalité des pénéides en élevage**

L'ensemble des données présentées dans ce rapport montre donc l'impact insoupçonné, en termes d'amplitude et de durée (6-7 j), que peut prendre un geste qui pouvait paraître aussi anodin qu'une pêche et un transfert sur quelques centaines de mètres en hiver, et en quelques minutes, dans une ferme d'aquaculture. En termes pratiques, ce résultat devrait déjà intéresser la filière de production des animaux reproducteurs. En effet, une fois que les géniteurs ont atteint la taille de reproduction en bassin de terre, ils sont pêchés et transférés dans l'écloserie dans des conditions identiques à celles décrites pour nos expérimentations. Or, cette étude suggère deux choses qui nous paraissent dignes d'être considérées. La première est qu'en hiver le temps nécessaire à la récupération est excessivement long à 20 °C mais qu'un transfert dans un bac à 25-28 °C paraît favoriser une récupération rapide des animaux et diminuer les mortalités. La seconde est qu'après la pêche, si on considère le cas des femelles pubères par exemple, les perturbations rapportées sont parfaitement capables d'affecter la vitellogenèse secondaire, c'est-à-dire l'accumulation de vitellus exogène dans l'ovule. Des analyses complémentaires seraient bien sûr indispensables mais on peut sans doute d'ores et déjà reconsidérer la stimulation de la vitellogenèse et des pontes par épédonculation durant cette phase de récupération. On devine en tout cas clairement une partie de ce que doit entraîner cette manipulation classique sur leur physiologie.

**Méthode d'échantillonnage sanguin:** Du point de vue de la recherche et des expérimentations, nos résultats doivent clairement alerter sur les possibles biais des protocoles de mesure de l'état de stress des pénéides. Il est évident que le simple fait de manipuler l'animal, même avec le plus grand soin apparent, peut avoir un impact énorme sur sa réponse physiologique. De nombreuses analyses doivent être faites soit sur des prélèvements réalisés en quelques secondes, soit sur des animaux longuement acclimatés.

**Mortalité des pénéides en élevage:** Le Syndrome 93 qui atteint la Nouvelle-Calédonie se traduit par des mortalités importantes des élevages, regroupées en entrée et en sortie de saison froide. Ces périodes sont caractérisées par une descente importante de la température de l'eau et des variations nyctémérales importantes. Ces conditions particulièrement contraignantes, d'une part, affaiblissent l'animal qui n'arrive plus à maintenir son homéostasie ionique et, d'autre part, se traduisent notamment par un appauvrissement de l'apport trophique du bassin. L'ensemble de ces phénomènes est de toute évidence à l'origine de désordres du milieu d'élevage. Nos résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension



sur l'affaiblissement de l'animal durant les saisons de transition (entrée et sortie de saison froide) qui le rendrait plus sensible au pathogène, le *Vibrio penaeicida*. L'affaiblissement de l'animal peut être relié à un effet direct des variations thermiques ou à un effet secondaire au travers d'un stress nutritionnel. En effet, c'est durant ces périodes que l'animal est le plus exposé aux carences nutritionnelles. Les capacités d'apport trophique sont appauvries dans les bassins alors qu'il y a une moindre capacité de la crevette à utiliser l'aliment et qu'on assiste à une augmentation des besoins en acides gras polyinsaturés en réponse aux températures hivernales (Galois, comm. pers.).

Face au Syndrome 93, la solution, qui ne saurait être que provisoire, employée par la filière à ce jour est d'arrêter la production durant ces périodes à haut risque. Cette solution a pour conséquence la concentration de toute la production sur un seul cycle d'élevage au lieu de deux cycles normalement. Le groupement de la production sur 8 mois de l'année est à l'origine d'une désorganisation des activités amont et aval se traduisant par des périodes d'engorgement au niveau des écloséries et de l'usine de conditionnement. Ces deux activités se retrouvent alors pratiquement à produire en flux tendu, ce qui ne permet aucune marge d'erreur. C'est dans une telle circonstance que des difficultés rencontrées en élevage larvaire au cours de l'année 2001 ont été à l'origine d'un manque à gagner de l'ordre de 200 tonnes de crevettes.

Les outils mis en œuvre au cours de cette étude nous permettent d'évaluer de façon reproductible l'état physiologique de l'animal, notamment, sa capacité de réponse à un stress envisagé sous l'angle de l'amplitude des dérégulations et du temps nécessaire de son retour à un niveau de référence. Le couplage de ces outils avec des recherches en nutrition devrait nous permettre de mieux évaluer les besoins nutritionnels exprimés par les crevettes lors de stress occasionnés par leur environnement d'élevage. À moyen terme, on devrait donc ainsi aboutir à une amélioration des pratiques en élevage qui passent également par l'amélioration d'aliments permettant d'augmenter la tolérance aux contraintes du milieu et la résistance aux pathogènes.

## Conclusion

---

Les forts niveaux métaboliques qu'on mesure chez *L. stylirostris* demandent dans l'absolu deux choses : au niveau environnemental, des conditions d'oxygénation optimales, une physico-chimie de l'eau stable (température, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, salinité) et un apport trophique adapté et varié ; au niveau cellulaire, une gestion optimisée des apports d'O<sub>2</sub>, de l'élimination de CO<sub>2</sub> et de ce qui apparaît aujourd'hui comme un des « déchets » du métabolisme oxydatif les plus toxiques, les radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species). Or, chez les poïkilothermes, tout changement de température est associé à des changements de métabolisme, d'état acide-base du sang, des capacités de transport des gaz du sang et de régulation des échanges ioniques. Dans ce contexte, il est clair qu'une meilleure connaissance des particularités physiologiques de l'espèce (et sa fragilité face à divers stress) est une piste qui devrait permettre de mieux comprendre les raisons de la fragilisation de l'animal aux périodes critiques de l'élevage et *in fine* de l'expression des *Vibrios*.



## La crevette et le syndrome d'été en Nouvelle-Calédonie : quelles réponses physiologiques et immunitaires ? Résultats préliminaires du programme Désans

C. Mugnier, C. Justou et le personnel du LAC

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Chantal.Mugnier@ifremer.fr

### Résumé

Le syndrome d'été est une pathologie à caractère saisonnier et se caractérise par des mortalités dues à un *Vibrio*: *V. nigripulchritudo* dans les bassins de grossissement. Au cours de l'été austral 2002-2003, un suivi sur deux fermes, l'une présentant des problèmes de mortalité, l'autre non, a été entrepris pour la première fois en parallèle sur le pathogène, l'évolution de l'écosystème bassin et les caractéristiques biologiques (poids, aspect extérieur) et l'état physiologique et immunitaire des crevettes, incluant le stade de mue. L'hémolymphe et l'hépatopancréas ont été prélevés sur des animaux en inter-mue (stade C) et en pré-mue (stade D<sub>2</sub>), à partir du 32<sup>e</sup> jour d'élevage, alternativement sur les deux fermes, et dans les mêmes conditions. Des paramètres physiologiques tels que la capacité osmorégulatrice (CO), les concentrations en oxyhémocyanine (OH), protéines totales (PT), glucose (Glu), et magnésium (Mg) ont été mesurés sur le plasma. Le nombre total d'hémocytes (THC) a été compté à partir du 52<sup>e</sup> jour d'élevage lorsque les mortalités sont apparues sur la ferme A (et ont perduré pendant le reste du suivi). Des prélèvements ont également été réalisés sur des crevettes moribondes.

Aucune mortalité liée au syndrome d'été n'a été relevée dans la ferme B. Le poids moyen était supérieur sur la ferme B jusqu'à J44, puis similaire sur les deux fermes avant d'être supérieur sur la ferme A, probablement grâce à une densité beaucoup plus faible. Des différences physiologiques ont été observées entre les deux fermes, et entre les crevettes porteuses du *Vibrio* et celles qui ne l'étaient pas. Une diminution des niveaux plasmatiques de paramètres comme le Glu, les PT, l'OH ou le THC pendant la première partie des mortalités chez les crevettes non infectées par le *Vibrio* de la ferme A, comparée aux résultats de la ferme B, laisse penser que les animaux étaient affectés par les conditions environnementales. Les crevettes en pré-mue ont été les premières à être touchées par les mortalités. Les crevettes porteuses de *V. nigripulchritudo* présentaient des perturbations physiologiques et immunologiques, alors que les animaux moribonds ne présentaient plus de régulation.

### Abstract

The summer syndrome is a seasonal pathology which is characterized by mortalities due to a *Vibrio*: *V. nigripulchritudo*. It affects growout ponds. During the 2002-2003 austral summer, a field survey was conducted on two farms, one out of two being affected by mortalities. For the first time, evolutions of the pathogen, the

pond ecosystem and the biological characteristics (weight, external aspect) and the physiological and immunological status of the prawns, including molt stage, were studied together. Haemolymph and hepatopancreas were sampled in the same conditions on prawns in intermolt (stage C) and premolt (stage D<sub>2</sub>) from the 32nd rearing day, alternatively on one farm and the other. Physiological parameters like osmoregulatory capacity (OC), oxyhaemocyanin (OH), total proteins (TP), glucose (Glu), and magnesium (Mg) concentrations were assayed in the plasma. Total haemocyte count (THC) was measured from the 52nd rearing day when mortality started in farm A. Samples were also taken on weakened prawns.

No mortalities linked to the summer syndrome were recorded in farm B. Mean weight was higher in farm B till day 44, then similar in both farms and eventually higher in farm A from day 60, probably due to the benefit of a lower density. Physiological differences could be observed between shrimps of the two farms, and between shrimps infected by the *Vibrio* and the others. Decrease in the levels of some parameters like Glu, TP, OH or THC during the first period of mortalities in non-infected shrimps of farm A compared to farm B let think that animals were affected by environmental conditions. Premolt shrimps were the first to be affected by mortalities. Shrimps infected with *V. nigripulchritudo* showed physiological and immunological perturbations, and moribund animals did not regulate any more.

## Introduction

---

L'aquaculture de la crevette *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie est marquée par des mortalités saisonnières, soit pendant la saison froide (Syndrome 93) (Mermoud *et al.*, 1998), soit pendant la saison chaude (Goarant *et al.*, 2003). Dans les deux cas, ces mortalités correspondent à une vibriose septicémique. Cependant, l'origine de ces mortalités saisonnières ne peut s'expliquer par un seul facteur comme le *Vibrio*, et résulte plutôt de la combinaison de plusieurs facteurs et de l'interaction entre l'écosystème bassin, la crevette et le pathogène. Dans le cadre du programme pluridisciplinaire Désans (voir Harache & Herbland, cet ouvrage), qui vise à comprendre les mécanismes qui affectent la résistance des animaux et entraînent la mortalité d'une partie de la population, une étude de terrain a été menée en parallèle sur les trois compartiments : écosystème bassin, crevette et pathogène pour comprendre le syndrome d'été. Le suivi a été réalisé au cours de l'été austral 2002-2003. Concernant les crevettes, les caractéristiques biologiques (poids, aspect extérieur) et leur état physiologique et immunitaire, incluant le stade de mue, ont été étudiés à l'aide d'indicateurs de l'état de santé.

## Matériel et méthodes

---

Le suivi a été réalisé sur une période de trois mois, d'octobre 2002 à janvier 2003 sur deux fermes, l'une pour laquelle le syndrome est enzootique depuis plusieurs années (ferme A), l'autre (ferme B) sur laquelle le pathogène est présent sans observation de la maladie. Un bassin de chaque ferme a étéensemencé à la même date avec le même lot d'origine de post-larves. Les crevettes ont été prélevées tous les jours alternativement sur les deux fermes dès un poids moyen de 1 g (32<sup>e</sup> jour d'éle-

vage). Lorsque présentes, les crevettes moribondes et mortes ont été collectées à la main sur les bords du bassin.

Cent crevettes ont été prélevées à l'épervier et échantillonnées chaque jour pour le poids, l'aspect extérieur et le stade de mue. Parmi ces 100 animaux, l'hémolymphe et l'hépatopancréas de 15 crevettes en stade C et 15 en stade D<sub>2</sub> ont été prélevés. Les hépatopancréas ont été plongés dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80 °C dans l'attente de dosages. La pression osmotique a été mesurée directement sur 10 µl d'hémolymphe à l'aide d'un osmomètre à tension de vapeur. La pression osmotique de l'eau de mer a également été mesurée tous les jours pour le calcul de la capacité osmorégulatrice (CO), correspondant à la différence de pression osmotique entre l'eau de mer et l'hémolymphe des crevettes. Pour la mesure de l'oxyhémocyanine (OH), 10 µl d'hémolymphe ont été immédiatement dilués au 1/40 dans de l'eau distillée et l'absorbance mesurée à 335 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en OH a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction de 17,26 (Chen & Cheng, 1993a). Dix microlitres d'hémolymphe ont été placés dans 30 µl d'Alsever formolé pour le comptage du nombre total d'hémocytes. Le reste de l'hémolymphe a été mélangé avec de l'anticoagulant (1/10 du volume en citrate de sodium 10 %) et centrifugé 5 min à 300 g. Le plasma a été conservé à -80 °C dans l'attente des dosages. Le magnésium (Mg) et le glucose (Glu) ont été dosés à l'aide de kits (Biomérieux et Sigma) adaptés à la microplaque. Les protéines totales (PT) ont été dosées en microplaque par la méthode de Lowry *et al.* (1951) en utilisant la BSA comme standard. La présence de *V. nigripulchritudo* dans l'hémolymphe de ces 30 crevettes a été recherchée (voir Goarant *et al.*, cet ouvrage), permettant d'identifier les crevettes porteuses. Les crevettes pêchées à l'épervier et porteuses du *Vibrio* sont considérées comme porteuses saines, par opposition aux crevettes saines indemnes non porteuses.

Pour permettre la comparaison des poids sur les deux fermes par jour d'élevage, un poids corrigé de la croissance journalière (0,187 g) a été calculé pour la ferme B, correspondant à la pente de la régression linéaire du poids en fonction des jours d'élevage. Les données physiologiques et immunologiques ont été regroupées par périodes de 10 jours. Seules les données correspondant aux crevettes saines indemnes, stades C et D<sub>2</sub> confondus, ont été gardées pour la comparaison entre les deux fermes. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test *a posteriori* PLSD de Fisher (logiciel Statview) pour le poids et les données physiologiques et immunologiques, et par un test du Chi<sup>2</sup> pour les comparaisons entre stades de mue (mortes/vivantes et portage du *Vibrio*).

## Résultats

Toutes les analyses n'ayant pas encore été réalisées, les résultats présentés sont préliminaires.

### Caractéristiques biologiques

Entre J25 et J44, le poids moyen des animaux de la ferme B est supérieur à celui des animaux de la ferme A, à l'exception de J32 où il n'y a pas de différence, comme à J48, 50, 54, 58, 60 et 64. Pour les autres jours, le poids moyen est supérieur chez les animaux de la ferme A (fig. 1).



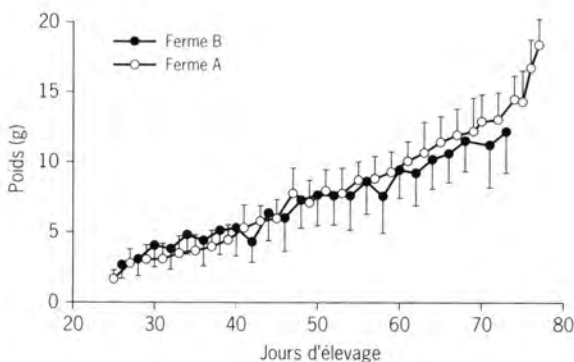


Figure 1 - Évolution du poids moyen des crevettes (en grammes) sur les deux fermes A et B au cours du suivi. Moyenne  $\pm$  SD.

### Mortalités et stades de mue

Les mortalités sont apparues à partir de J50 sur la ferme A (fig. 2), avec deux principales périodes : l'une entre J57 et J64, et l'autre autour de J75. La proportion de crevettes en mue et pré-mue avancée parmi les mortes et moribondes confondues au début du syndrome (J54, 56, et 58) est significativement plus élevée (60, 67 et 41 %) que celle observée pour la population du bassin (12, 25 et 24 %) ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ). Il n'y a pas de différence significative pour les crevettes en inter-mue. À J68 et 70, le pourcentage de crevettes en mue et pré-mue avancée est à nouveau supérieur chez les mortes et moribondes (50 et 64 %) par rapport à celui de la population (24 et 11 %) (fig. 2) ( $p < 0,05$ ).

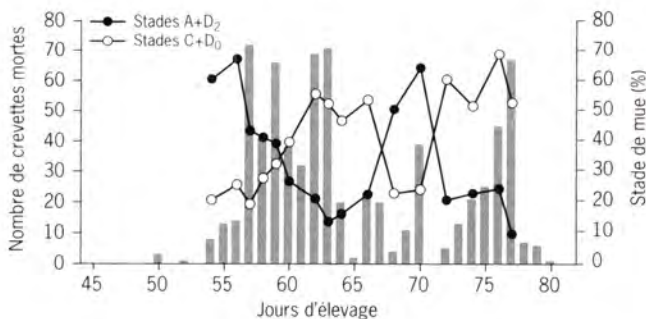


Figure 2 - Mortalités au cours de l'élevage de la ferme A et pourcentages d'individus en mue (stades A et D<sub>2</sub>) et inter-mue (stades C et D<sub>0</sub>) parmi les crevettes mortes.

### Réponses physiologique et immunitaire des crevettes saines indemnes : comparaison entre les deux fermes

Sur la première période (J32-40), les animaux de la ferme B se différencient de la ferme A par une glycémie significativement plus faible, alors que PT et OH présentent des valeurs non différentes entre les deux fermes. Pendant la seconde période (J41-50), il n'y a pas de différence significative entre les deux fermes, quel que soit le paramètre mesuré. Sur la troisième période (J51-60), qui corres-



pond au début des mortalités sur la ferme A, les crevettes de cette ferme présentent une baisse significative des taux de Glu, PT et OH, par rapport aux niveaux observés pendant les périodes précédentes ( $p < 0,05$ ), et par rapport à ceux des crevettes de la ferme B qui se maintiennent au même niveau que sur la période précédente (fig. 3a,b,c). Le THC des animaux n'est pas différent sur les deux fermes (fig. 3d). Bien qu'une augmentation significative des niveaux de Glu, OH et PT soit ensuite observée sur la période suivante (J61-70) pour la ferme A, les valeurs restent cependant inférieures à celles de la ferme B, sauf pour les PT. Le THC reste plus faible sur la ferme A, alors qu'il augmente significativement sur la ferme B. Sur la dernière période (J71-80), une élévation significative du Glu est observée sur la ferme B, alors que la concentration est revenue à un niveau équivalent à celui observé sur les deux premières périodes pour la ferme A.

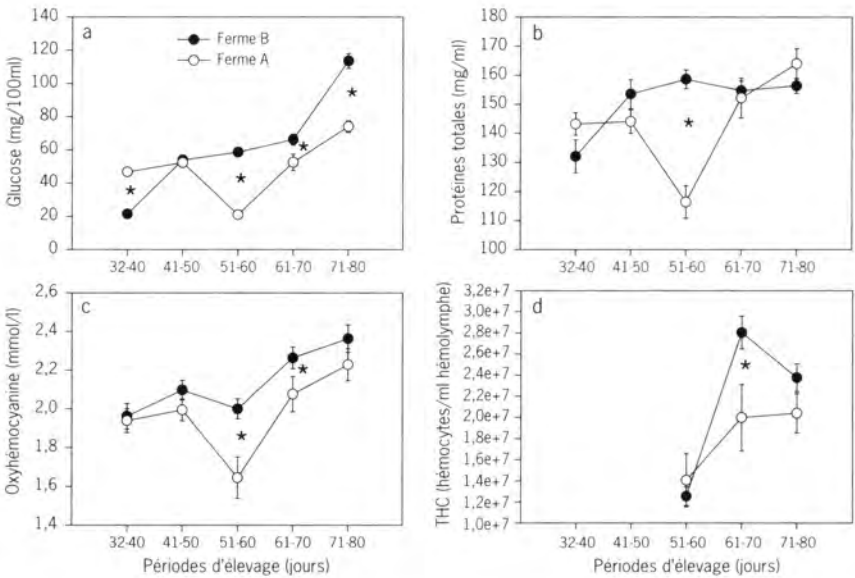


Figure 3- Évolution des concentrations plasmatiques du glucose (a), des protéines totales (b), de l'oxyhémocyanine (c) et du nombre total d'hémocytes (THC) (d) chez des crevettes en stades C et D<sub>2</sub> des fermes A et B. Moyennes  $\pm$  SD. Les différences significatives entre les deux fermes par période sont indiquées par une étoile (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### Réponses physiologique et immunitaire des porteurs sains et des crevettes moribondes (ferme A)

Des crevettes apparemment saines, c'est-à-dire pêchées à l'épervier, mais porteuses du *Vibrio* ont été détectées à partir de J40 (Goarant *et al.*, cet ouvrage), dans la population échantillonnée. Parmi ces animaux porteurs, le pourcentage de crevettes en pré-mue est significativement plus important que celui des crevettes en inter-mue (80,4 % contre 49,4 %) ( $\chi^2$ ,  $p = 0,0005$ ), sur la période où les mortalités apparaissent (J51-60). Cette différence n'est plus significative pour la suite du suivi. À partir de J50, des animaux présentant des signes de faiblesse (moribondes) ont été ramassés sur les bords du bassin. Ces animaux présentaient une vibriose septicémique.

L'étude des paramètres physiologiques et immunologiques chez les animaux porteurs sains (pêchés à l'épervier), en comparaison avec les animaux sains indemnes, montre une CO plus faible sur la période J51-60 (fig. 4a); un taux de Mg plus élevé à J61-70 (fig. 4b); un taux de Glu plus élevé (J41-50) puis équivalent (J51-60) et enfin plus faible sur le reste du suivi par rapport aux animaux sains indemnes (fig. 4c); un taux de PT plus faible à partir de J61-70 (fig. 4d). L'évolution de l'OH est similaire chez les porteuses et les non porteuses, et ne se différencie que sur la période J61-70 avec une concentration plus faible chez les porteuses (figure 4e). Enfin, le THC, bien que suivant une évolution parallèle au cours du temps chez les deux groupes, est significativement plus faible chez les crevettes porteuses saines que chez les crevettes saines indemnes sur la dernière période du suivi (figure 4f). Les crevettes moribondes présentent des valeurs stables basses des différents paramètres, à l'exception du taux de Mg qui est significativement plus élevé que chez les crevettes saines entre J51 et J70, puis chute sur la dernière partie du suivi (fig. 4b).

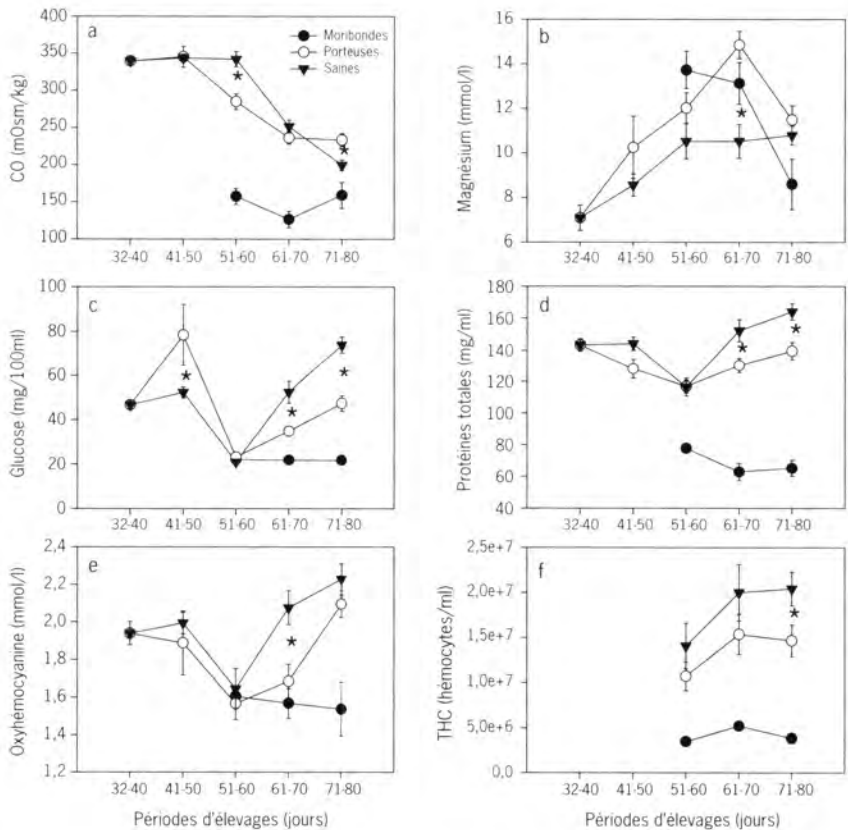


Figure 4- Évolution de la capacité osmoréglatrice (CO) (a), des concentrations plasmatiques du magnésium (b), du glucose (c), des protéines totales (d), de l'oxyhémocyanine (e) et du nombre total d'hémocytes (THC) (f) chez des crevettes en stades C et D<sub>2</sub> de la ferme A non porteuses de *V. nigripulchritudo* (saines), porteuses apparemment saines (porteuses) et porteuses moribondes (moribondes). Moyennes ± SD. Les différences significatives entre les saines et les porteuses sont indiquées par une étoile (ANOVA, p < 0,05).

## Discussion et conclusion

Bien que les animaux de la ferme B présentent un poids moyen supérieur sur la première partie du suivi, cette différence disparaît ensuite et la croissance devient supérieure pour la ferme A. La densité plus faible due aux mortalités est probablement favorable à la meilleure croissance. La meilleure croissance observée sur la ferme A alors que les mortalités sont observées indique que le syndrome n'a pas affecté la croissance des animaux.

### Effet de l'écosystème bassin sur la crevette

En début de suivi (J32-40), une glycémie et un taux de PT faibles, accompagnés d'une concentration moyenne en Mg élevée et d'une CO réduite (résultats non montrés) chez les crevettes de la ferme B laissent penser que celles-ci sont perturbées par leur environnement. Par la suite, l'évolution différente des paramètres physiologiques et immunologiques entre les crevettes indemnes des deux fermes, en particulier sur la période J51-60 lorsque les premières mortalités sont observées sur la ferme A, laisse supposer que les crevettes de la ferme A subissent un effet stressant de l'environnement, qui n'est *a priori* pas observé sur la ferme B. La baisse de la glycémie est indicateur de stress chronique ou à long terme, comme observé chez *Nephtrops norvegicus* soumis à une hypoxie de trois semaines (Hagerman *et al.*, 1990). De même, il a été montré que des crevettes de différentes espèces soumises à des stress environnementaux, comme l'élévation de l'ammoniaque ou des nitrites dans l'eau, présentent une baisse de la concentration en PT et en OH (Chen & Cheng, 1993b, 1995, 2000; Chen *et al.*, 1994; Cheng & Chen, 1999). La même observation a été faite chez *L. stylirostris* soumise à une élévation de la concentration en ammoniaque dans l'eau (Justou & Mugnier, 2002). La valeur de THC de la période J51-60, similaire sur les deux fermes (environ  $1,3 \cdot 10^7$  hémocytes/ml d'hémolymphe), est faible par rapport aux valeurs moyennes observées chez *L. stylirostris* en Nouvelle-Calédonie ( $3,2 \cdot 10^7$  hémocytes/ml d'hémolymphe; Goarant, comm. pers.). L'absence de données sur les périodes précédentes ne permet pas de savoir si cette valeur est transitoire, cependant il est montré que les facteurs environnementaux peuvent également avoir une incidence sur la réponse immunitaire dont le THC (Le Moullac & Haffner, 2000). Ainsi, une variation de la température entraîne une baisse du THC chez *Panulirus interruptus* (Gomez-Jimenez *et al.*, 2000), comme la présence de PCB chez *Crangon crangon* (Smith & Johnston, 1992) ou une hypoxie chez *L. stylirostris* (Le Moullac *et al.*, 1998). Une confrontation des résultats obtenus sur les variations des paramètres de l'environnement (Lemonnier *et al.*, cet ouvrage) en relation avec la réponse de la crevette et des études expérimentales sont nécessaires pour comprendre les relations environnement-crevette.

### Effet de la mue sur la réponse de la crevette

Les résultats du suivi semblent indiquer que les crevettes en pré-mue avancée présentent une plus grande sensibilité, au moins dans certaines conditions d'élevage, que les crevettes aux autres stades aux variations de l'environnement et/ou au pathogène. Bien que les études soient peu nombreuses, les données existantes semblent montrer que les crevettes en pré-mue avancée et en mue sont plus sensibles à un

stress environnemental ou une infection expérimentale en conditions contrôlées que les crevettes en inter-mue. Ainsi, les animaux en stade D<sub>2</sub> de *L. stylirostris* soumis à une hypoxie présentent une mortalité plus importante que les animaux en stade C (Mugnier & Soyez, 2001) et sont plus sensibles à une infection expérimentale (vibriose) (Le Moullac *et al.*, 1997). Chez *Macrobrachium rosenbergii*, une infection expérimentale entraîne une mortalité plus importante chez les animaux en pré-mue avancée que chez les animaux en inter-mue (Cheng *et al.*, 2003).

### Effet du *Vibrio* sur la crevette

Les données actuelles ne permettent pas de dire si les réponses physiologique et immunologique sont le résultat de la présence de la bactérie dans l'hémolymphe ou si les crevettes présentant de telles réponses sont plus susceptibles à la bactérie et de fait porteuses. Des études complémentaires seront menées ultérieurement pour répondre à cette question.

Il peut cependant être noté que l'augmentation du Glu plasmatique observé sur la période J41-50 peut être un signe de stress à court terme, comme cela a été observé chez *Penaeus monodon* soumis à différents stress environnementaux (Hall & Van Ham, 1998b). La baisse de la CO est un indicateur non spécifique de stress (Lignot *et al.*, 2000) et traduit un dysfonctionnement de l'activité osmorégulatrice. De même, l'augmentation du Mg plasmatique est un indicateur de stress, comme cela a déjà été observé chez *P. monodon* (Boglio, 1995) ou *L. stylirostris* juvénile (données non publiées) ou adulte (Boglio & Goarant, 1996), mais également d'infection comme cela a été observé chez *Marsupenaeus japonicus* après une infection virale (Hennig *et al.*, 1998). De plus, des infections expérimentales avec le virus du white spot réalisées par Yoganandhan *et al.* (2003) chez *Fenneropenaeus indicus* montrent un effet du pathogène sur les variations des paramètres physiologiques et immunologiques, comme une augmentation du taux de Glu, et une diminution de la concentration en OH et du THC, et une augmentation du taux de PT. De même chez *L. vannamei* infectée avec le virus de Taura, une baisse des PT, de l'OH et des THC est observée (Song *et al.*, 2003). Chez *L. stylirostris*, il a été montré qu'une infection sublétales par un *Vibrio* a un effet négatif sur les THC (Goarant & Boglio, 2000).

Une perturbation causée par l'environnement, comme le suggère l'étude comparative des résultats obtenus sur les deux fermes, peut avoir affaibli les animaux, les rendant plus vulnérables au pathogène. Le Moullac *et al.* (1998) ont montré qu'un stress, comme une hypoxie de 24 h, augmente la sensibilité de *L. stylirostris* à un *Vibrio* pathogène (*V. penaeicida*). Kautsky *et al.* (2000) considèrent que le stress physiologique semble être le plus important des facteurs conduisant aux flambées de maladie.

Les analyses doivent être complétées et des expérimentations menées pour vérifier les hypothèses d'un effet stressant de l'environnement et de la présence du *Vibrio* sur la crevette.

### Remerciements

Tous nos remerciements aux responsables des deux fermes et à leurs employés pour l'accueil et l'aide qu'ils ont pu nous apporter pour la mise en place et le déroulement de ce suivi. Merci également à l'IRD Nouméa pour nous avoir permis de réaliser une partie des dosages dans leurs locaux.



## Les facteurs nutritionnels influençant la qualité des larves et des post-larves de crevettes pénéides

C. Cahu

Ifremer, centre de Brest, unité mixte Inra-Ifremer, laboratoire de nutrition, BP 70, 29280 Plouzané, France  
Chantal.Cahu@ifremer.fr

### Résumé

La qualité des larves et post-larves de crevettes, définie comme étant leur capacité à se développer normalement et à résister aux stress environnementaux, est largement liée à la composition de leur alimentation. L'alimentation des géniteurs, principalement des femelles, influence la qualité des nauplii produits et leur capacité à se développer jusqu'à la métamorphose en zoé. Le développement embryonnaire et post-embryonnaire est lié à la concentration des œufs en différents nutriments, tels que les lipides totaux, les phospholipides, les triglycérides, les acides gras polyinsaturés, les vitamines, notamment l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol.

Après la métamorphose en zoé, des algues unicellulaires puis des proies vivantes, ou des aliments composés, doivent fournir ces nutriments. Les crustacés, comme les poissons marins, n'ont qu'une très faible capacité à allonger et à désaturer les acides gras. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne doivent être fournis par l'alimentation. L'acide docosahexaénoïque et l'acide eicosapentaénoïque sont essentiels pour la croissance des larves, mais augmentent aussi la résistance des post-larves soumises à un stress de salinité. Ces acides gras sont plus efficaces s'ils sont apportés par la fraction phospholipides que par la fraction triglycérides de l'aliment. Notamment, la phosphatidylcholine paraît essentielle pour promouvoir la croissance. Une supplémentation en vitamines à fonction antioxydante, telles que l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol, pendant les stades larvaires permet de diminuer la mortalité due aux stress. De même, l'amélioration de la résistance au stress notée chez des post-larves de *Penaeus monodon* nourries avec des régimes enrichis en astaxanthine a été reliée aux propriétés antioxydantes de cette molécule.

### Abstract

The quality in shrimp larvae and post-larvae, defined as their capacity to develop and to resist to environmental stress, largely depends on the composition of their diet. The diet fed to broodstock, particularly to females, affects nauplii quality and their ability to develop until zoe stages. Embryonary and post-embryonary development depends on the concentration of different nutrients in eggs, such as total lipids, phospholipids, triglycerides, highly unsaturated fatty acids, vitamins, mainly ascorbic acid and alpha-tocopherol.

After zoe metamorphosis, unicellular algae, live animal preys, or compound diets, have to supply these nutrients. Crustaceans, as marine fish, have a low capacity

to elongate and desaturate fatty acid chains and highly fatty acids must be provided by diet. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are essential for larval growth, and also enhance resistance in post-larvae submitted to osmotic stress. These fatty acids are more efficient when they are supplied by phospholipids than by triglycerides. In particular, phosphatidylcholine seems to be essential to promote growth. Supplementation in vitamins with antioxidant function, such as ascorbic acid and alpha-tocopherol, during larval stages reduces stress sensitivity. In the same way, an enhancement in stress resistance was observed in *Penaeus monodon* post-larvae fed astaxanthin enriched diets, and has been related to the antioxidant properties of this molecule.

## **Introduction**

---

Les besoins nutritionnels des juvéniles de crevettes péneïdes ont été largement étudiés. Ceux des géniteurs et des larves sont par contre plus mal connus. Il est cependant essentiel de couvrir les besoins des reproducteurs afin d'obtenir des œufs aptes à se développer jusqu'à l'éclosion. Les réserves vitellines des œufs doivent aussi assurer le développement des larves au cours de la phase lécitotrophique, c'est-à-dire jusqu'à la métamorphose en zoé. À ce stade, les larves sont capables de s'alimenter et l'alimentation exogène devra fournir les nutriments nécessaires pour leur croissance et leurs métamorphoses (Harrison, 1990).

Ces nutriments devront permettre non seulement à l'animal de survivre, d'avoir une bonne croissance et un développement harmonieux, mais aussi de résister à différents stress. En effet, lors du passage en bassin, les post-larves devront résister aux manipulations, au transport, et à des chocs osmotiques et thermiques au cours des premiers jours. Elles devront aussi résister à un environnement bactérien différent. Jusqu'à présent, aucun aliment composé ne peut se substituer totalement à l'aliment frais (annélides, moules, calmar...) pour les reproducteurs de crevettes péneïdes. De même, les microparticules alimentaires mises au point pour les larves ne peuvent pas être utilisées tout au long du développement larvaire. Des proies vivantes, telles que les nauplii d'*Artemia*, sont encore utilisées pendant quelques jours, ou en co-alimentation, malgré leur qualité variable et leur coût élevé. Une meilleure connaissance des besoins nutritionnels spécifiques des animaux en phase de reproduction ou au cours du développement larvaire est donc indispensable. Notamment, il est apparu que les différents composants des lipides alimentaires, ainsi que les vitamines et d'autres molécules antioxydantes avaient un rôle prépondérant sur la qualité des pontes et des post-larves produites. Le but de cet article est de faire la synthèse des résultats obtenus dans ce domaine.

## **Besoins en lipides des reproducteurs et des larves**

---

### **Les lipides totaux**

Les juvéniles ont de faibles besoins en lipides totaux : moins de 10 % de lipides dans l'aliment sont conseillés. Cependant, différentes données suggéraient que les géniteurs avaient des besoins en lipides plus élevés que les juvéniles. En effet, les lipides représentent 22 à 26 % de la masse sèche des œufs et sont utilisés comme substrat énergétique pendant le développement embryonnaire et jusqu'au stade zoé. De

plus, le transfert des lipides de la glande digestive vers les ovaires est très rapide chez les crevettes montrant que la vitellogenèse est très dépendante des lipides ingérés. Une expérience a donc été réalisée par Bray & Lawrence (1990) en nourrissant des géniteurs de *Penaeus stylirostris* avec un aliment composé contenant 7,8, 11 et 14 % de lipides. Une augmentation du taux de lipides dans l'aliment de 7,8 à 11 % n'améliorait pas significativement le nombre d'œufs obtenus ni le taux d'éclosion (fig. 1). Par contre, un effet bénéfique de cette augmentation se manifestait sur la taille des zoés 1. Au-delà de 11 %, l'augmentation de lipides avait un effet négatif sur les différents paramètres des performances de reproduction.

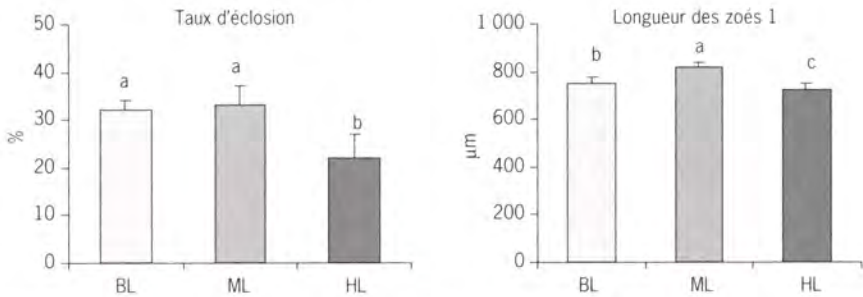


Figure 1 - Taux d'éclosion des œufs et longueur des zoés obtenues avec des femelles de *P. stylirostris* nourries avec des aliments composés contenant 7,8 % (BL), 11 % (ML) ou 14 % (HL) de lipides (d'après Bray *et al.*, 1990).

### Les phospholipides

Parmi les lipides, un rôle prépondérant des phospholipides a été suggéré. En effet, les phospholipides constituent 45 à 52 % des lipides totaux des œufs viables. Cette concentration est atteinte quand les géniteurs sont nourris avec un aliment contenant plus de 2 % de phospholipides (Cahu *et al.*, 1994). Un aliment ne contenant que 1,2 % de phospholipides conduit à une diminution de la fréquence de ponte et du nombre d'œufs par ponte. Alava *et al.* (1993) ont montré qu'un régime totalement dépourvu de phospholipides empêchait le développement ovarien chez *P. japonicus*. Les crustacés sont capables de synthétiser des phospholipides à partir de leurs précurseurs, mais à un taux très faible. Les phospholipides alimentaires sont essentiels pour la vitellogenèse et le développement larvaire (Kanazawa *et al.*, 1985). Cet effet bénéfique peut être globalement attribué à une amélioration des lipides alimentaires et du transport des lipides sous forme de lipoprotéines. Ceci conduit notamment à une meilleure utilisation des acides gras alimentaires. Les phospholipides sont incorporés dans l'aliment sous forme de lécithine. Ils sont également présents dans la farine de poisson incluse dans les régimes.

Différentes classes constituent les phospholipides, la phosphatidylcholine et la phosphatidylinositol étant les plus représentés chez les animaux marins. Il a été montré que la phosphatidylcholine avait un effet positif sur la croissance, la survie et la résistance au stress chez les post-larves de pénéides (Coutteau *et al.*, 1996, 2000). L'incorporation de phosphatidylcholine dans un régime destiné à des post-larves de *P. vannamei* a permis d'augmenter considérablement la résistance au stress de ces animaux (fig. 2).



Palacios *et al.* (1998) montrent que les autres classes de lipides, tels que les triglycérides sont également des constituants importants des œufs, puisqu'ils servent de substrat énergétique.

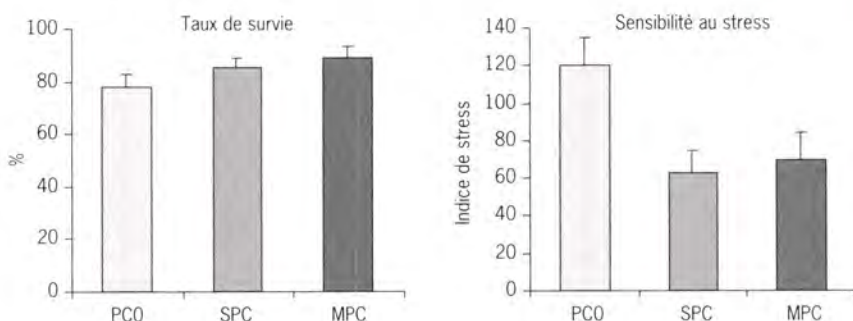


Figure 2 - Taux de survie et sensibilité au stress chez des post-larves de *P. vannamei* nourries avec un régime sans phosphatidylcholine (PCO), contenant de la phosphatidylcholine de soja (SPC) ou de la phosphatidylcholine marine (d'après Coutteau *et al.*, 2000).

### Les acides gras longs polyinsaturés

Les acides gras longs polyinsaturés de la série n-3 (n-3 AGLPI) sont les constituants essentiels des membranes cellulaires chez les organismes marins. Cependant, les crustacés ont une très faible capacité à allonger et à désaturer les acides gras. Il faut donc fournir ces acides gras par l'alimentation. Le rôle important de ces acides gras dans la reproduction et le développement larvaire des crevettes a été suspecté par différents auteurs. Dès 1980, Middledich *et al.* intégraient des annélides dans l'alimentation des géniteurs, afin d'augmenter significativement la concentration en acides gras polyinsaturés de la ration alimentaire et cette alimentation à base d'annélides se poursuit actuellement dans les écloséries de différentes espèces de pénéides.

Des expériences réalisées en utilisant des aliments composés ont permis de quantifier les besoins en n-3 AGLPI des géniteurs femelles de *P. indicus* (Cahu *et al.*, 1995). Celles-ci ont reçu un régime contenant 2,5, 1,4 et 0,6 % de n-3 AGLPI, principalement l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docohexaénoïque (DHA). Les concentrations d'AGLPI étaient maintenues au-dessus de 40 µg/g de matière sèche dans les œufs de crevettes nourries avec les régimes contenant 2,5 et 1,4 % d'AGLPI et les taux d'éclosion étaient de l'ordre de 40 %. Par contre, le régime incorporant le plus faible taux d'AGLPI a conduit à l'obtention d'œufs contenant moins de 20 µg/g d'AGLPI et les taux d'éclosion ne dépassaient pas 5 %. Il apparaît donc que le développement embryonnaire des crevettes dépend de la teneur des œufs en AGLPI.

Parallèlement, Xu *et al.* (1994) démontraient avec *P. chinensis* que le nombre d'œufs par ponte était directement lié à la teneur en EPA des œufs, et le taux d'éclosion à leur teneur en DHA. Ceci suggère que le DHA a un rôle particulièrement important au cours de l'embryogenèse des crevettes, comme cela a été démontré chez les poissons et les mammifères. Cet acide gras intervient notamment chez les Vertébrés dans la mise en place du système nerveux, mais sa fonction principale reste à définir chez les Invertébrés.



Les AGLPI sont également indispensables à la croissance des larves. Lavens & Sorgeloos (2000) reportent un effet bénéfique de l'incorporation d'AGLPI dans l'aliment sur la croissance, la survie et la résistance au stress osmotique des post-larves de différentes espèces. Par contre, des niveaux d'AGLPI supérieurs à 3,0 % du régime ne sont pas bénéfiques.

### **Besoins en vitamines et autres molécules antioxydantes**

Il est bien connu que les vitamines jouent un rôle majeur dans les fonctions reproductrices et le développement embryonnaire dans le règne animal. Chez les crevettes, l'effet de deux vitamines a été étudié sur la qualité des œufs et des post-larves : la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et la vitamine C (acide ascorbique). Ces deux vitamines ont des propriétés antioxydantes naturelles : elles protègent les lipides et notamment les acides gras polyinsaturés de la peroxydation. L' $\alpha$ -tocophérol agit principalement au niveau des lipides membranaires, alors que l'acide ascorbique est plutôt un antioxydant cytoplasmique. Néanmoins, les deux vitamines interagissent, l'une pouvant en partie compenser la déficience de l'autre. Plus récemment, un effet bénéfique de l'astaxanthine, attribué aux fonctions antioxydantes de cette molécule, a été démontré sur la qualité des larves de *P. monodon* (Chien *et al.*, 2003).

#### **L' $\alpha$ -tocophérol**

Une expérience réalisée en nourrissant des géniteurs de *P. indicus* avec un régime enrichi en  $\alpha$ -tocophérol (355 mg/kg) ou non (82 mg/kg) a montré que le taux d'éclosion des œufs se maintenait au-dessus de 50 % dans les pontes des crevettes nourries avec le régime enrichi et que cela était relié à des teneurs en  $\alpha$ -tocophérol de 400 à 800  $\mu$ g/g de poids sec dans les œufs. Dans le groupe nourri avec le régime contenant un taux faible d' $\alpha$ -tocophérol, le taux d'éclosion décroissait fortement au cours des pontes successives. La 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> ponte obtenue par une même femelle présentait un taux d'éclosion inférieur à 20 %. Ces faibles taux d'éclosion étaient associés à des faibles teneurs en  $\alpha$ -tocophérol dans les œufs, inférieures à 100  $\mu$ g/g de matière sèche. De plus, ces faibles taux d'éclosion étaient associés à un pourcentage élevé de nauplii malformés, qui ne se métamorphosaient pas en zoés. Une teneur en  $\alpha$ -tocophérol inférieure à 200  $\mu$ g/g de matière sèche dans les œufs est insuffisante pour soutenir le développement embryonnaire et larvaire. Ce besoin élevé en cette vitamine est lié à la forte concentration des œufs en AGLPI (Cahu *et al.*, 1993).

#### **L'acide ascorbique**

Le taux d'éclosion des œufs est également lié à leur teneur en acide ascorbique, ou vitamine C. Une expérience réalisée avec deux groupes de *P. indicus* nourris avec le même aliment ayant une concentration élevée ou une concentration faible en acide ascorbique a montré que les meilleurs taux d'éclosion étaient associés à une teneur en acide ascorbique des œufs supérieure à 400  $\mu$ g/g (Cahu *et al.*, 1991) (fig. 3). En plus de son action antioxydante, l'effet de cette vitamine peut être expliqué par son rôle dans l'hydroxylation de la proline au cours de la synthèse du collagène.

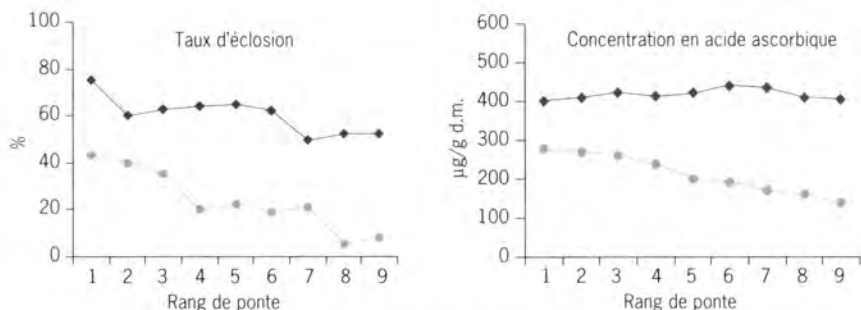


Figure 3 - Taux d'éclosion et concentration en acide ascorbique dans les œufs de *P. indicus* nourries avec un aliment contenant un taux élevé d'acide ascorbique (◆) ou un taux faible d'acide ascorbique (●) (d'après Cahu *et al.*, 1991).

De la même façon, des expériences réalisées avec des post-larves de *P. vannamei* et de *P. monodon* ont montré que 20 à 130 mg d'acide ascorbique par kilogramme d'aliment étaient nécessaires pour soutenir la croissance et la survie (Merchie *et al.*, 1997). Mais, de plus fortes doses permettent d'augmenter la résistance au stress : 200 mg/kg d'aliment augmentent la survie des post-larves de *P. monodon* après un choc osmotique. Kontara *et al.* (1997) reportent une meilleure résistance à l'infection par *Vibrio harveyi* chez des post-larves recevant un régime contenant 1 500 mg d'acide ascorbique par kilogramme d'aliment.

### Les pigments caroténoïdes

Des études récentes montrent que l'incorporation d'astaxanthine (80 mg/kg) dans des aliments destinés aux post-larves améliore la survie et la résistance aux stress osmotique et thermique chez ces animaux. La fonction antioxydante de cette molécule a été démontrée *in vivo* chez les post-larves par la mesure d'activité des enzymes intervenant dans les mécanismes de protection des tissus. L'activité de la superoxyde dismutase, enzyme cytosolique spécifique de la capture des radicaux libres, est plus faible chez les animaux supplémentés (Chien *et al.*, 2003). Ceci montre une meilleure protection des tissus contre l'oxydation chez les animaux recevant de l'astaxanthine.

Ces différentes données permettent de mieux cerner les besoins des géniteurs et des larves de crevette en différents nutriments, particulièrement lipides et certaines vitamines. Ces connaissances ne suffisent pas actuellement pour formuler un aliment composé pouvant totalement remplacer les aliments frais dans leur alimentation. Les études doivent donc se poursuivre, notamment, sur d'autres vitamines. Cependant, les travaux existants ont déjà permis de mettre au point et de commercialiser différents aliments pouvant compléter de façon bénéfique la séquence alimentaire des géniteurs et des larves des crevettes élevées.



# Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction des saisons d'élevage

L. Chim, R. Galois, J.L.M. Martin, P. Lemaire, N. Wabete, J.C. Massabuau, G. Cuzon

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Liet.Chim@ifremer.fr

## Résumé

En Nouvelle-Calédonie, la majorité des fermes de crevettes réalise un seul cycle de production par an. Au cours du cycle d'élevage, les animaux sont soumis à des périodes plus ou moins longues de températures inférieures à 22 °C, valeur qui constitue la limite basse de la plage de confort thermique pour *Litopenaeus stylirostris*. Nous montrons qu'à 28 °C, *L. stylirostris* peut prendre deux repas complets toutes les 8 heures après un jeûne de stimulation alors qu'à 20 °C, dans les mêmes conditions expérimentales, cet intervalle est porté à 72 heures. Le temps du transit intestinal est également 2 fois plus rapide à 28 °C (6 h) qu'à 20 °C (12 h). À côté des modifications de la prise alimentaire et du transit intestinal, les périodes hivernales sont aussi caractérisées par des problèmes de survie et de balance hydro-minérale de *L. stylirostris*. Ces problèmes sont évidents chez les crevettes carencées en acides gras polyinsaturés (AGPI). Par contre, les animaux non carencés sont capables de s'adapter aux baisses de la température de l'eau. Cette adaptation se traduit par une élévation de la teneur en certains AGPI membranaires des cellules branchiales. Cet ajustement du profil acides gras des phospholipides branchiaux en faveur des AGPI contribue très probablement à la conservation des fonctions osmorégulatrices branchiales en maintenant la fluidité des membranes cellulaires au cours des baisses de température.

## Abstract

In New Caledonia, most shrimp farms run only one production cycle per year. During this time, shrimps face periods of time that vary from one year to another with temperature below 22°C. Such temperature being the lower limit for the thermal preferendum of *L. stylirostris*.

Metabolic demand of poikilotherms is under temperature control and it regulates consumption rates, digestion, and feed hydrolysis. For example, at 28°C, *L. stylirostris* can ingest two meals every 8 hours, while at 20°C there is a longer period of time going up to 72 hours to ingest a second whole meal. In a similar way, intestinal transit is twice faster with shrimp raised at 28°C (6 h) than shrimp acclimated at 20°C (12 h).

Aside from a slowing down of digestive functions, winter temperatures can have an adverse effect on hydro-mineral equilibrium in shrimps which are deprived of

polyunsaturated fatty acids (PUFAs). On the opposite, it has been shown in our laboratory that shrimps not deprived of PUFA were able to adapt to a decrease in sea water temperature. Such adaptation is shown through an increase in the amount of PUFAs in gill cell membranes and in particular linoleic acid (18:2n-6), linolenic acid (18:3n-3) and EPA(20:5n-3). This increase is counterbalanced by a drop in oleic acid (19:1n-9). We assume that such adjustment of fatty acid pattern in gill phospholipids with prevalence of PUFAs contributes to preserve gill osmoregulatory functions by maintaining cell membrane fluidity and integrity during periods of temperature drops. In shrimp raised at 28°C, osmoregulation capacity and survival rate are not dependent on dietary PUFAs. Therefore, *L. stylirostris* requirements for PUFAs vary throughout the year. Winter temperatures induce a strong requirement of such nutrients which lead when available, to an increase in shrimp performances.

Our results underline the need to adjust feed formulation as well as feeding strategy to cope with a variation in nutritional requirements and feeding behaviour of *L. stylirostris* facing temperature pattern of the cool season.

## Introduction

---

Les crevettes en élevage sont régulièrement exposées à d'importantes variations physico-chimiques et biologiques de leur environnement qui peuvent conduire à une baisse de leur résistance aux maladies. Ainsi, en Nouvelle-Calédonie, des baisses de températures importantes, jusqu'à 10 °C les dernières semaines de la saison chaude (passant de 29 °C à 19 °C), peuvent entraîner d'importantes mortalités connues sous le terme de « Syndrome 93 » (Mermoud *et al.*, 1998). Cette pathologie montre des phases chroniques et des épisodes aigus de mortalité, souvent précédés par une baisse de la température moyenne vers 22 °C associée à de fortes variations thermiques nyctémérales. Lemaire *et al.* (2002) ont montré que les chutes thermiques du milieu d'élevage s'accompagnaient d'une importante baisse de la capacité osmorégulatrice (Charmantier *et al.*, 1988, 1989) de *L. stylirostris*. Par ailleurs, nous avons montré, en conditions expérimentales, que l'impact des chutes de température était plus ou moins important suivant la qualité des lipides consommés par les crevettes (Chim *et al.*, 2001). Les animaux carencés en acides gras polyinsaturés et exposés aux températures hivernales voient leur capacité osmorégulatrice (CO) diminuer et leur réponse immunitaire se dégrader. Ces phénomènes pourraient affaiblir *L. stylirostris* et augmenter sa sensibilité au *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998a). L'objectif des travaux présentés ici est de mesurer l'influence des températures de saison froide sur différents paramètres de la nutrition de la crevette *L. stylirostris*. Une meilleure connaissance du comportement alimentaire et des besoins nutritionnels de *L. stylirostris* élevée en saison froide devrait en effet nous permettre d'élaborer des formules de granulés spécifiques et de proposer une stratégie d'alimentation mieux adaptée.

## Matériel et méthodes

---

### Détermination de la capacité osmorégulatrice (CO)

La capacité osmorégulatrice correspond à la différence de pression osmotique entre le milieu ambiant et l'hémolymphe (Charmantier *et al.*, 1989). La mesure de la pression osmotique est effectuée au moyen d'un osmomètre Wescor 5520 à ten-



sion de vapeur. Elle est basée sur la détermination de l'abaissement de la tension de vapeur d'une solution par rapport à la tension de vapeur du solvant.

#### **Période réfractaire et vitesse de transit intestinal**

La période réfractaire correspond au temps nécessaire à un animal pour prendre un second repas complet équivalent au premier repas pris après 3 jours de jeûne. Le protocole de détermination de la période réfractaire a été décrit par Wabete (2002). La période réfractaire a été déterminée chez *L. stylirostris* acclimatée à 20 °C et à 28 °C. La détermination du temps de transit a été faite avec des animaux à jeun depuis 3 jours et acclimatés à 19 °C, 23 °C et 26 °C. Les crevettes sont gavées individuellement avec 200 µl de bouillie à l'aide d'un cathéter fixé à une seringue hypodermique. Après gavage, les animaux sont remis dans leur bac d'origine. L'aliment présent dans le tube digestif est parfaitement visible par transparence. Les animaux ayant évacué totalement le contenu de leur tube digestif sont comptabilisés en fonction du temps.

#### **Lipides alimentaires et adaptation aux températures hivernales**

Les effets des lipides alimentaires ont été déterminés sur des crevettes nourries avec deux aliments, l'un pauvre et l'autre riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) dénommés respectivement HC et HFM. Les deux principales matières premières de ces aliments (farines de poisson et de calmar) étaient « délipidées ». Les lipides ont été extraits des farines par 4 bains successifs de 2 heures dans de l'éthanol absolu à 60 °C. En fin d'extraction, l'éthanol est éliminé par évaporation. De l'huile de foie de morue a été ajoutée à l'aliment HFM (7 % w/w) alors que de l'huile de coprah, a été ajoutée à l'aliment HC (7 % w/w). L'analyse des AGPI n-3 (EPA = C20:5 n-3 + DHA = C22:6n-3) sur 5 aliquotes a donné des teneurs de  $2,06 \pm 0,12$  et  $14,51 \pm 0,26$  g.kg<sup>-1</sup> pour les aliments HC et HFM respectivement. L'expérience a été menée dans 16 bacs de 150 l, avec 30 animaux par bac. Les crevettes d'un poids moyen de  $6,56 \pm 1,79$  g ont été mises à jeun une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux de chaque régime alimentaire ont été soumis à deux températures d'élevage 28 °C et 20 °C. Cette expérimentation comprenait donc 4 traitements différents (4 bacs par traitement) : deux sources de lipides associées chacune à deux températures. Les crevettes ont été ainsi élevées durant 24 jours. À la fin de l'expérience, elles ont été sacrifiées et leur CO a été déterminée.

#### **Analyse des lipides**

Les branchies de chaque animal sont rincées à l'eau distillée, pesées et lyophilisées. Les échantillons sont ensuite conservés dans des tubes en Téflon bouchés, sous azote et à -80 °C. Les lipides totaux sont extraits par broyage des échantillons dans des mélanges de chloroforme et méthanol (Folch *et al.*, 1957). Ils sont dosés par un Iatroscan TH-10 connecté à un intégrateur Shimadzu CR3A. Quatre volumes de 1 µl d'extrait concentré sont déposés sur une baguette Chromarod SIII avec une microseringue. Après séchage, la baguette est lue par le Iatroscan sans développement préalable. Une calibration établie avec des standards purs permet de calculer la concentration en lipides de chaque extrait (Parrish & Ackman, 1985). Les lipides polaires présents dans l'extrait lipidique sont séparés des lipides neutres sur une chaîne HPLC couplée à un détecteur de masse évaporatif en dérivation sur la sortie de colonne (colonne semi-préparative, phase Si-Diol). Un gradient de

polarité est obtenu avec des proportions croissantes de méthanol dans du chloroforme. Quatre-vingt dix pour cent des lipides polaires injectés dans le système sont récupérés pour les analyses d'acides gras. Les esters méthyliques d'acides gras des lipides polaires sont obtenus après transestérification par du BF<sub>3</sub>-méthanol (10 %, 1 h, 80 °C) (Morrison & Smith, 1964). Ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne BPX-70 (60 m x 0,25 mm ID), avec l'hydrogène comme gaz vecteur et un gradient de température de 100-220 °C à 1 °C. min<sup>-1</sup>.

## Résultats

### Influence de la température sur la période réfractaire et le transit intestinal

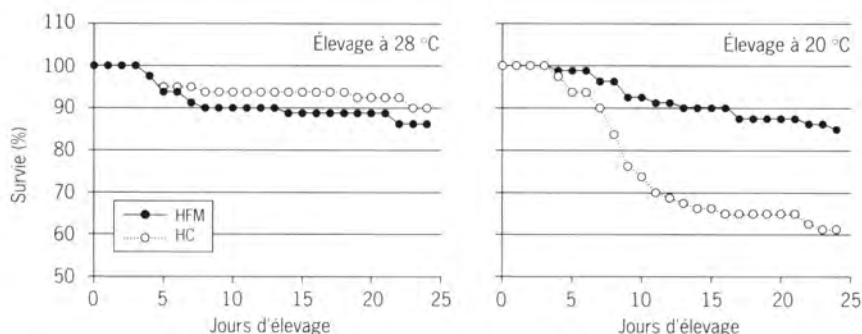
À 28 °C, *L. stylirostris* consomme 0,103 ± 0,002 g de granulés par gramme de poids sec corporel. Huit heures après la première prise d'aliment, la crevette est de nouveau capable de reprendre un repas de volume identique. À 20 °C, le poids d'aliment ingéré rapporté au poids sec de l'animal est de 0,081 ± 0,004 gramme. À cette température, la quantité mangée au cours du deuxième repas redevenait identique au repas initial seulement au bout de 72 heures.

De la même façon, le temps du transit intestinal augmente avec la baisse de la température d'élevage. Douze heures après le gavage, le transit était terminé chez 100 %, 87 % et 30 % des animaux acclimatés respectivement à 26 °C, 23 °C et 19 °C.

### Influence de la température d'élevage et du régime lipidique sur la capacité osmorégulatrice et le taux de survie

La survie au 24<sup>e</sup> jour d'élevage (fig.) était, chez les animaux nourris avec l'aliment HFM, de 90 % et de 82 % respectivement à 28 °C et 20 °C (p = 0,21). Chez les animaux nourris avec l'aliment HC, cette survie était de 92 % à 28 °C et de 64 % à 20 °C (p = 0,015). C'est également chez les crevettes du traitement HC et 20 °C que la CO mesurée est la plus faible (tab. 1).

Les teneurs en acides gras exprimées en pourcentage des acides gras totaux (AGT) des phospholipides extraits des branchies (principal organe de l'osmorégulation chez la crevette) des animaux nourris avec l'aliment HFM et élevés à 28 °C et 20 °C sont présentés dans le tableau 2. Chez les crevettes élevées à 20 °C, les



Nombre relatif d'animaux vivants (%) en fonction du temps, de l'aliment (HC ou HFM) et de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

lipides membranaires branchiaux sont plus riches en acides linoléique (C18:2n-6), dihomogamma linoléique (C20:3n-6), arachidonique (C20:4n-6), alphalinoléique (C18:3n-3), docosapentaénoïque (C22:5n-3) et eicosapentaénoïque (C20:5n-3). Cette augmentation de la teneur en certains acides gras polyinsaturés est compensée par une baisse de la teneur en acides gras mono-insaturés, notamment, l'acide oléique (C18:1n-9). Les acides gras saturés ne participent pas à la redistribution des acides gras des phospholipides des branchies.

Tableau 1 - Capacité osmorégulatrice (CO) au 24<sup>e</sup> jour en fonction de l'aliment (HC ou HFM) et de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

Température d'élevage	28 °C		20 °C	
	HFM	HC	HFM	HC
Nombre d'animaux en inter-mue	7	15	10	14
Moyenne CO (mOsm.kg <sup>-1</sup> ± ES)	254,86 ± 7,29	264,33 ± 9,79	267,5 ± 5,35	233,86 ± 11,3
Comparaison entre aliments	ns		p = 0,05	

Tableau 2 - Profil acides gras des phospholipides branchiaux des animaux nourris avec l'aliment HFM. Influence de la température d'élevage (20 °C ou 28 °C).

Températures d'élevage	20 °C		28 °C		
	3		3		
Acides gras (% AGT des PL branchiaux ± ES)					Valeur p
C14:0	91,193 ± 1,064		88,807 ± 0,209		0,0012
C16:0	17,400 ± 0,227		17,440 ± 0,204		ns
C18:0	7,680 ± 0,067		8,697 ± 0,147		0,0033
C20:0	0,347 ± 0,012		0,337 ± 0,003		ns
C22:0	0,507 ± 0,034		0,483 ± 0,012		ns
C16:1n-7	1,630 ± 0,045		1,303 ± 0,057		0,0107
C18:1n-9	12,470 ± 0,010		16,057 ± 0,037		< 0,0001
C18:1n-7	3,960 ± 0,021		3,630 ± 0,121		ns (0,0647)
C20:1	1,970 ± 0,084		1,850 ± 0,064		ns
C18:2n-6	7,420 ± 0,120		6,770 ± 0,079		0,0109
C18:3n-6	0,090 ± 0,006		0,123 ± 0,007		0,0194
C20:3n-6	5,160 ± 0,135		4,370 ± 0,173		0,0230
C20:4n-6	0,270 ± 0,006		0,243 ± 0,009		ns
C18:3n-3	0,357 ± 0,012		0,300 ± 0,000		0,0092
C18:4n-3	0,107 ± 0,003		0,117 ± 0,003		ns
C20:5n-3	18,580 ± 0,364		16,650 ± 0,608		0,0532
C22:5n-3	1,120 ± 0,017		1,030 ± 0,023		0,0356
C22:6n-3	10,610 ± 0,183		10,520 ± 0,122		ns
Σ saturés linéaires	26,63 ± 0,326		27,35 ± 0,159		ns
Σ mono-insaturés	20,03 ± 0,126		22,84 ± 0,152		0,0001
Σ polyinsaturés n-6	12,67 ± 0,184		11,27 ± 0,165		0,0049
Σ polyinsaturés n-3	31,04 ± 0,510		28,86 ± 0,536		0,0423

## Discussion et conclusion

Les élevages de la crevette calédonienne sont confrontés à des mortalités (« Syndrome 93 ») en relation avec les baisses de température hivernales. Ces mortalités qui touchent toute la filière d'élevage apparaissent comme un problème majeur à résoudre en termes de finalité économique et de défi scientifique. La stricte chronologie du déclenchement de ce syndrome conforte l'idée que la présence du *Vibrio penaeicida* (Mermoud *et al.*, 1998) dans le milieu n'est pas en soi suffisante pour déclencher cette maladie. Des études récentes ont par ailleurs montré l'effet néfaste des conditions thermiques rencontrées en hiver sur l'osmorégulation et certains aspects immunitaires de *L. stylirostris* (Chim *et al.*, 2001 ; Lemaire *et al.*, 2002).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de la température sur la période réfractaire, que nous avons définie comme étant le temps minimum nécessaire à un animal qui vient de terminer un repas complet, pour reprendre un second repas identique au premier (Wabete, 2002 ; Wabete *et al.*, en préparation). Le repas complet est défini comme la quantité maximale ingérée par un animal après une période de jeûne. Il existe une relation inverse de la période réfractaire avec la température. Cette période, qui est de 3 jours en saison froide (20 °C) est réduite à 8 h en saison chaude (28 °C). De la même façon, notre étude montre un allongement moyen du transit intestinal de 50 minutes pour une baisse de 1 °C de la température d'élevage. Cette forte relation entre la température et la consommation et l'utilisation de l'aliment a été également montrée chez d'autres pénéides (Chen *et al.*, 2001 ; Maguire & Allan, 1992 ; Wyban *et al.*, 1995).

Lemaire *et al.* (2002) ont montré qu'une chute de température (de 26 °C à 22 °C) provoquait chez *L. stylirostris* une baisse de la capacité osmorégulatrice (Charmantier *et al.*, 1989). Parallèlement, Chim *et al.* (2001) ont montré que l'impact d'une chute de température sur la CO était fonction de la qualité des lipides alimentaires consommés par l'animal : la sensibilité des crevettes à un stress thermique et osmotique était très supérieure chez celles nourries avec un aliment carencé en acides gras polyinsaturés. L'étude présentée ici montre une élévation de la teneur en acides gras polyinsaturés des lipides membranaires branchiaux de *L. stylirostris* élevées à basse température (20 °C). L'augmentation de la part des acides gras polyinsaturés dans les phospholipides paraît être une réponse adaptative au froid assez générale chez les poïkilothermes, qui permet de maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires. En effet, les lipides membranaires sont les seuls éléments de structure de la cellule qui peuvent être remaniés en relation avec les variations thermiques de l'environnement (Hazel & Williams, 1990). Différentes études chez les poissons indiquent que les changements de composition en acides gras des lipides des membranes biologiques affectent les mouvements d'eau et d'ions à travers la membrane cellulaire (Cullis & Hope, 1985). Il a été également montré que les acides gras essentiels interviennent dans la régulation de l'absorption des ions (Nonnotte *et al.*, 1987 ; Finstad & Thomassen, 1991). Ainsi, l'hyper-régulation requiert un transport actif d'ions attribué premièrement aux ATPases cation et anion dépendantes (Wheatly & Henry, 1987). Or, les enzymes membranaires peuvent être directement ou indirectement régulées par la composition en acides gras de la membrane cellulaire (Chapelle, 1986 ; Morohashi *et al.*, 1991).



La crevette *L. stylirostris* carencée en acides gras essentiels est incapable de s'adapter au froid par augmentation de la part en AGPI des lipides membranaires branchiaux. Les crevettes sont alors dans l'impossibilité de maintenir leur homéostasie osmotique et survivent mal aux températures hivernales. Ces résultats sont confortés par les travaux de Rees *et al.* (1994) qui ont montré qu'un apport alimentaire élevé en AGPI-n-3 améliorait la survie, la croissance et la résistance à un choc hypo-osmotique chez les post-larves de la crevette *Penaeus monodon*.

Afin de compenser la baisse de la consommation des animaux en hiver, nous suggérons de travailler dans deux directions. La première est d'adapter la fréquence de l'alimentation à la température d'élevage. Cette pratique, outre d'économiser de l'aliment, devrait permettre de prévenir la dégradation du milieu d'élevage par excès de déchets organiques. La seconde est d'augmenter dans les granulés la teneur en nutriments essentiels. Parmi ceux-ci, nous considérons plus particulièrement les AGPI qui, comme nous l'avons vu, jouent un rôle important dans l'adaptation de la crevette aux températures hivernales. Les ajustements préconisés ici pourraient permettre de mieux répondre aux besoins nutritionnels exprimés par *L. stylirostris* élevée en hiver et ainsi contribuer à maintenir la santé du cheptel.

## Genetic selection of aquaculture organisms including prawns with a special focus on the way to integrate a breeding programme into the private industry

M. Macbeth<sup>(1)</sup>, C. McPhee<sup>(1)</sup>, M. Burke<sup>(1)</sup>, J. Bartlett<sup>(1)</sup>, C. Jones<sup>(1)</sup>,  
W. Knibb<sup>(1)</sup>, M. Kenway<sup>(2)</sup>, K. Wilson<sup>(2)</sup>

(1) Queensland Department of Primary Industries, Bribie Island, Aquaculture Research Centre,  
144 North Street, Woorim, PO Box 2066, Bribie Island, Queensland 4507, Australia

(2) Australian Institute of Marine Science, PMB 3, Townsville, MC QLD 4810, Australia  
wayne.knibb@dpi.qld.gov.au

### Abstract

There are various returns, chiefly economic, from investing in genetic improvement of aquaculture species. Most relate to increased competitiveness and stability for the industry.

Usually, but not invariably, quantitative selection is the most practical and cost efficient way for industry to improve their stocks of aquaculture organisms. Within family selection may be one of most effective and economical ways of applying selection under industrial conditions.

To predict whether a selection programme will be successful, we need to estimate genetic parameters (heritabilities - the proportion of the trait variation due to additive genetic variation, and genetic correlations). These estimates have been made for the black tiger prawn.

Quantitative genetic selection usually requires some level of tagging, in order to record kinship relationships. To identify different individuals (even at early larval stage) and families of prawns, barramundi, etc., we are developing various microsatellite DNA markers.

The development of selection projects in Queensland on a variety of species is reviewed.

### Résumé

Le centre de recherche en aquaculture de Bribie Island a réuni une équipe de recherche (généticiens quantitatifs, biologistes moléculaires, biologistes spécialistes du poisson et de la crevette) et des moyens (infrastructures d'élevage et laboratoires moléculaires) pour mener des programmes de R&D et d'amélioration génétique sur plusieurs espèces tempérées et tropicales.

**Estimation des paramètres génétiques:** la connaissance de l'héritabilité (part de la variance génétique additive dans la variance d'un caractère) et des corrélations génétiques permet de prévoir les chances de succès d'un programme de sélection. Elle est aussi utile pour concevoir la mise en œuvre de la sélection (*i.e.* quels caractères ou combinaisons sont considérés). Jusqu'à ce jour, notre équipe a estimé les héritabilités et corrélations génétiques pour une gamme de caractères liés à la croissance et à la reproduction chez la crevette géante black tiger *Penaeus*

*monodon*. Actuellement, des expérimentations sont en cours pour estimer les paramètres pour l'abalone tropicale *Haliotis asinina*.

**Isolation de marqueurs microsatellites :** Pour identifier différents individus (y compris au stade larvaire précoce) et différentes familles de crevettes et de barramundi, etc., nous développons des marqueurs ADN microsatellites. Ces nouveaux outils moléculaires permettent la flexibilité des programmes de sélection et leur intégration aux procédures d'élevage dans les fermes.

**Procédures de sélection à coût efficace :** Des considérations théoriques suggèrent que la sélection intra-familiale peut être un compromis raisonnable entre les besoins parfois contradictoires des programmes de sélection ciblés, spécialement quand il est difficile de réduire la variance environnementale entre familles, et quand le budget disponible est limité. En effet, la sélection intra-familiale peut conduire, dans des conditions de production, à des réponses effectives plus importantes que celles de programmes qui permettraient d'obtenir en théorie une réponse plus rapide. De plus, comparée à d'autres plans de sélection, la sélection intra-famille a plusieurs avantages :

- elle demande peu de nouvelles infrastructures (les familles peuvent être élevées séparément dans différents bassins de production commerciale déjà existants);
- elle demande peu de familles (e.g. 20);
- la ponte peut avoir lieu à différents moments pour les différentes familles;
- il y a peu de consanguinité (la taille effective des populations est deux fois plus élevée que pour les autres plans de sélection);
- elle engendre peu de frais de marquage et de suivi des pedigrees.

La sélection familiale a commencé en 2001 pour les *P. merguensis* et 2003 pour les *P. monodon*.

## **Background**

---

### **Why invest in genetics?**

Genetic programmes have the power to shape the animal to suit a given purpose or environment - as is evident by the variety of dog breeds, and the foods we consume. Genetic programmes can bring various benefits, most of them related to economic return.

### **Increased productivity and reliability, yielding benefit to consumer and stability to industry**

Genetic improvement is often the primary method to increase productivity in terrestrial agriculture. By comparing performance of broiler chickens maintained with and without genetic selection since the 1950s, we see that nearly all the 300- 400% growth improvement of modern chicken strains was due to selection (Havenstein *et al.*, 1994).

Faster growth translates into greater production with existing facilities, and often, improved food conversion efficiency (see Knibb *et al.*, 1998). Today, chickens are inexpensive, of uniform quality and appearance, and supply is reliable; the reverse is typical of most aquaculture products in the market place. By analogy with chickens, genetic improvement of marine fish will enhance their competitiveness relative to other food items in the supermarket, which, in turn, can expand and stabilize mariculture industries.

### **Increased competitiveness leads to profit or survival for companies**

Long-term profit margins for commodity aquaculture companies usually are narrow (Sweetman, 1993). For marginal companies (~5% profit on costs), even modest genetic gains (~10%) can double profits. Where profitability is constrained by environmental regulations and limits on sites, genetically improved strains can increase production with existing infrastructure.

### **Solutions for the ongoing emergence of pathogens**

As mariculture production increases using high-density monoculture, we should expect greater commercial losses from disease outbreaks. The development of strains genetically resistant to important pathogens is one approach to address the problem of continual and inevitable increases in the number of serious diseases (Chevassus & Dorson, 1990).

### **New export industries**

New specialist "seed" industries, producing eggs and juveniles for local or overseas markets, can emanate from genetic improvement programmes.

### **Large returns on investment**

Genetic gains compound with each generation of selection and economic value is proportional to the size of the industry. It is possible to calculate with some precision the cost/benefit ratios for genetic breeding programmes, e.g. 1:15 for salmon (Gjedrem, 1997), 1:50 for pigs (Mitchell *et al.*, 1982).

### **Filling the gap between demand and supply for seafood products**

Global demand for seafood exceeds the capacity of wild fisheries, yet, mathematically, much of the shortfall can be met by improving breeds in existing aquaculture production facilities (Gjedrem, 1997).

### **Which method to use for genetic improvement?**

---

Note: the following examples are restricted to fish genetics which has a relatively long history of research and application. Relatively recent works in shrimp genetics support the overall conclusions.

#### **Selection among strains**

Different strains may differ for growth and survival performance. Choice of the best existing strains could equal the genetic gains made by years of within strain selection using inferior strains. Hence strain testing should precede within strain selection. Most finfish species, including seabream (*Sparus aurata*), carps and tilapias show some strain variation for growth, disease resistance or cold tolerance, and to varying degrees, strain differences were exploited in commercial farms (Knibb, 2000).

#### **Selection within strains**

Within strain selection can be performed for various objectives (i.e. simply profit, or traits that contribute to profit) using different selection criteria (ways to measure the traits). Individuals can be ranked with information just from them-



selves, from their relatives, or using additional information. Selection response cannot occur unless there are genetic differences among individuals, of a type that is inherited by the offspring. Luckily, most populations have genetic differences for commercial traits. Selection response was achieved for either disease resistance, body weight, or body proportion in carp, tilapia, salmon and seabream (Kirpichnikov, 1981; Knibb, 2000; Wohlfarth & Hulata, 1989; for reviews). Most selection experiments for body weight in finfish yielded gains of 10-20% per generation. In view of past successes from professionally operated selection programmes, there appears to be little risk of commercial failure with selection projects.

#### **Qualitative traits, major genes and Mendelian mutations**

Unlike growth, thought to be due to many loci of minor effect, some traits are due to one or few loci. For the seabream, the ebony mutation is heterotic for growth, and this mutation is also used for commercial "protection" of improved strains (Knibb, 2000). However, overall, there are few qualitative traits of commercial value in food fish aquaculture. Other examples include red body color in tilapias and scale patterns in carps.

#### **Crossbreeding (intraspecific hybrids)**

In terrestrial agriculture, crossbreeding between different strains of the same species can yield heterosis and uniformity. For seabream, commercial crossbreeding is used to limit inbreeding in selection lines. Indeed, for most aquaculture applications, crossbreeding should be considered simply as the reverse of inbreeding, rather than as a method to achieve gain over the base outbred population (Knibb *et al.*, 1998).

#### **Hybrids**

Hybrids between species are created with the hope to:

- combine parental traits, like fast growth and tolerance to disease or temperature;
- produce single-sex hybrid offspring;
- achieve superior performance or heterosis;
- achieve sterility.

Considering all species, hybrids usually resemble the average of their parents. Given the large number of attempts to produce new fish hybrids, remarkably few (apparently less than 1%, and none for seabream) resulted in sustained commercial production.

#### **Chromosome manipulations**

Potential applications of chromosome set manipulations in fish are diverse, and include:

- growth acceleration (with triploids *via* suppression of gonadal development);
- same sex offspring;
- rapid inbreeding;
- restoration of whole fish from cryopreserved sperm.

However, in practice, triploid seabreams have little growth acceleration. A similar conclusion was reached for triploid carp. For all fish species, many triploids and hybrid fish triploids were produced, but except for some salmonids, little information exists regarding their commercial performance, and few are used by farmers. Even so, ecological issues might sustain future research on sterile and triploid fish, and methods to produce them.

### **Genetic engineering**

Presently there is no commercial use of genetically engineered fish for food.

### **Conclusions on the methods for genetic improvement**

---

Theoretically, there are many methods to genetically improve fish strains. In practice, few improved strains reached industry, and of these, most were developed with traditional selection exploiting additive genetic variance. Only selective breeding and exploitation of the genetic differences within strains (additive genetic variance) have the capacity to deliver *continual* genetic improvement, and to do so deliberately (in a planned way) for a variety of different traits, simultaneously. Offsetting these desirable features of selective breeding are the disadvantages of cost, infrastructure, and perhaps most significant, a requirement for a long-term commitment and organization to prosecute a selective breeding programme. Those few strains reaching industry were of substantial economic value.

### **Methods for implementing genetic selection in industry**

---

Theoretical considerations suggest *within family* selection may be a reasonable compromise of the sometimes contradictory requirements for an outcome-orientated selection programme, especially where it is difficult to reduce the environmental variance between families, and limited budgets are available. Compared with other breeding designs, within family selection has various advantages:

- requires little new infrastructure (families can be grown separately in different existing commercial ponds);
- requires few families (e.g. 20);
- spawning can be at different times for different families;
- there is little inbreeding (effective population sizes are 2x larger than for other designs);
- incurs little cost for tagging and tracking of pedigrees.

### **Present genetic research in Queensland**

---

#### **Redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)**

For the past five years, a line of Redclaw crayfish has been selected for increased rate of growth between pond stocking at two months and harvest six months later. The line was established from a cross between wild stocks from two Gulf of Carpentaria rivers. For four years it has been maintained as 200 females and 100 males in 20 quasi-families. Selection each year has been within families and matings have been between families to minimize inbreeding. An unselected control line from the same foundation was maintained in parallel. Mean weight gains for the selected and the control lines were 48 g and 32 g, giving the selected line a 50% advantage in gain over the control line. The percentages of egg bearing females at harvest were 9.75% and 18.1% for the selected and control lines respectively, indicating an increased age at sexual maturity for the selected line. Relative to a return of \$A11,700 for one ton of control line crayfish, that for selection line crayfish was \$A16,150. The selection programme is at present being commercialized.

### Banana prawns (*Penaeus merguensis*)

For the last 2 years, DPI has operated a within family selection programme for growth rate in banana prawns. A distinguishing feature of this particular selection programme is the research to develop molecular tags which may support family assignment after communal grow-out.

Approximately 60 separate clones containing a microsatellite repeat were isolated. Of which only 20 had sufficient flanking DNA sequence to enable the design of specific primers. To date, four primer pairs were polymorphic and primers were designed to allow all four primers to be amplified and genotyped in one reaction. The female parents from 13 separate banana prawn family lines were genotyped for four microsatellite loci. Of the 13 females, four display a unique fingerprint while the remaining 9 families are not discernable from each other. It is necessary to generate further loci before pedigree assignment will be reliable.

Species	No of clones sequenced	No that contain microsatellites	PCR primers designed to date	Polymorphic
<i>Penaeus merguensis</i>	300	60	8	4

### Black tiger prawns (*Penaeus monodon*)

Black tiger prawns are favoured by farmers in Australia because of their large size and striped appearance. The current industry practice is to harvest mature females from the wild. These are used for spawning and supply the industry with juvenile stock for grow-out. The practice of harvesting mature females from the wild has proven to be unreliable. The domestication of this species would provide a reliable source of juveniles and at the same time enable selection pressure to be applied to traits of commercial interest.

It has proven difficult to provide a suitable rearing environment for black tiger prawns to breed in captivity with only 20% of matings yielding viable spawns. Our analyses of captive-reared broodstock at the Australian Institute of Marine Science, reproduced over three generations, suggest that many reproductive traits are heritable. Simulations by DPI have shown that selection for the ability to breed in captivity could significantly improve mating/spawning success (fig. 1). A breeding programme can be designed to give a good probability of success by modelling a given heritability and by changing the initial number of families in the breeding programme and the number of matings per family.

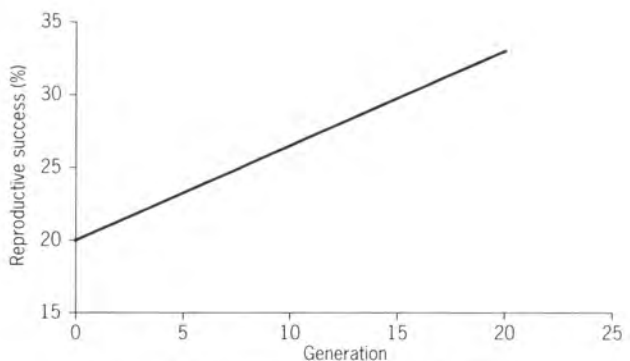


Figure 1 - Response to selection for spawning success.

The high heritability of growth in tiger prawns (AIMS data) could allow significant improvements in growth. A doubling of growth rate in less than 10 years is quite feasible with a low selection pressure of 30% (heaviest 3 in 10 selected). Higher selection intensities will yield a faster response to selection.

### **Barramundi (*Lates calcarifer*)**

Barramundi is a tropical fish species with a distribution from tropical eastern Australia through to the Indo-Pacific region. The species has been commercially grown in Australia for about 20 years with markets primarily within Australia. More recently, markets have opened up in America, and elsewhere, offering significant long-term investment opportunities.

Growth rate has been identified as a target trait for selective breeding in barramundi as, with other fish species, it displays a large heritable component. Modelling by DPI suggests that growth rate can be doubled in 20 years by changing the frequency of existing genes that favour growth in a selected sub-population (fig. 2). (This model assumes a 25% coefficient of variation, a heritability of 30%, a selection differential of 2.67 standard deviations and a generation length of 2 years: Macbeth *et al.*, 2002). Managing inbreeding was considered to be an important component in a long-term selection programme and with appropriate design inbreeding can be kept below 1% per generation.

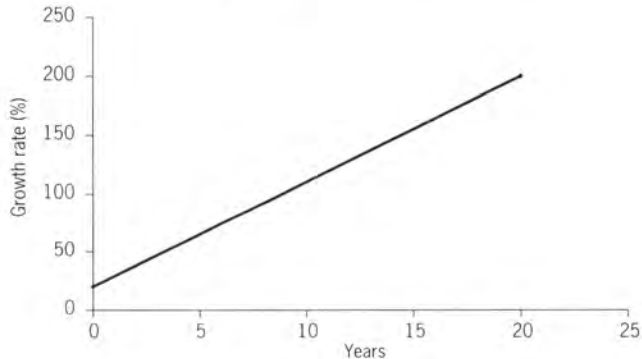


Figure 2 - Expected selection response in barramundi.

Higher returns from improved growth can be realized through selling heavier fish, or through a greater turnover of fish at the original harvest weight. Standard discounting procedures were used to evaluate a selective breeding programme over a 20 year period. For a large scale unit producing 1 000 tons annually, the returns from selection would amount to A\$47,000,000 net present value over a 20-year period. The cost of implementing the selection programme is estimated at A\$400,000 giving a benefit to cost ratio of 11:1 (considering present size of industry). This may be conservative as likely returns from improved feed conversion efficiency due to selection for growth were not included in the model. With a ten fold increase in production supported through export markets the benefit to cost ratio could exceed 50:1. These benefits to cost ratio's are within the range estimated in other aquaculture species.



## Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture

S. Lapègue, E. Bédier, E. Goyard, L. Dégremont, J.P. Baud, A. Gérard, P. Gouilletquer, P. Boudry

Ifremer, laboratoire de génétique et pathologie, Ronce-les-Bains, 17390 La Tremblade, France  
Sylvie.Lapegue@ifremer.fr

### Résumé

Deux espèces d'huîtres sont aujourd'hui présentes sur les côtes françaises : l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), indigène, et l'huître creuse du Pacifique (*Crassostrea gigas*), introduite du Japon dans le début des années 1970. L'huître plate a subi coup sur coup, dans les années 1960, deux maladies dues à des protozoaires parasites et sa production est ainsi passée de 20 000 t/an dans les années 1960 à 1 500 t/an aujourd'hui en France. Il en résulte que la filière ostréicole française repose quasiment exclusivement (99 %) sur la production de l'huître creuse, *C. gigas*, avec 150 000 tonnes en 2000 dont environ 90 % sont issus du captage naturel. Cependant, la reproduction de cette espèce en éclosérie est actuellement en expansion avec une estimation de 400 à 800 millions de naissains commercialisés en 2002. Des rapports renforcés entre l'Ifremer et les cinq écloséries françaises de la filière ostréicole, qui adhèrent toutes au Sysaaf (Syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français), permettent désormais d'envisager le développement de nouveaux programmes d'amélioration génétique.

À la fin des années 1980, un programme de sélection pour la résistance de l'huître plate à la bonamiose a été initié au sein de l'Ifremer et a permis d'obtenir des souches plus tolérantes à cette maladie. Après deux générations en sélection massive, les marqueurs moléculaires avaient mis en évidence une base génétique réduite au sein de ce programme qui s'était alors orienté vers une sélection intra-familiale. Devant la lourdeur zootechnique d'un tel schéma, un compromis a été trouvé en réalisant une sélection au sein de cohortes de familles biparentales, la gestion de ces cohortes étant permise par les analyses moléculaires. Le programme est maintenant dans sa phase de transfert, avec des expérimentations à plus grande échelle en partenariat avec la profession.

En ce qui concerne l'huître creuse, et en parallèle à l'obtention et l'étude de polyploïdes, les performances de différentes souches d'huîtres creuses provenant d'Asie ont été comparées à celles de la souche introduite en France il y a trente ans, sujette à des mortalités estivales. La souche locale présente de meilleures performances, vraisemblablement grâce à une adaptation bien réalisée. Par ailleurs, bien que l'amélioration de la croissance jusqu'à la taille commerciale s'avère possible par une sélection précoce au stade larvaire, le critère de croissance n'est pas nécessairement à privilégier dans le contexte d'un bassin ostréicole disposant de ressources trophiques limitées. En revanche, les importantes mortalités rencontrées par le naissain en périodes estivales constituent le sujet d'étude prioritaire sur lequel se sont penchées de nombreuses équipes (génétique, physiologie, pathologie, écologie...) dans le cadre

du grand défi Morest. Les premiers résultats ont mis en évidence de fortes différences de survie entre des familles biparentales d'animaux, indiquant un déterminisme génétique du caractère « survie » et encourageant dans la voie d'une sélection pour ce caractère.

### Abstract

---

Two oyster species are currently present along the French coasts: the indigenous European flat oyster (*Ostrea edulis*), and the Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*), that has been introduced from Japan since the beginning of the 1970s. The flat oyster successively suffered from two protozoan diseases during the 1960s and its production decreased from 20 000 tons/year by that time to 1 500 tons/year nowadays. Consequently, the oyster production is principally (99%) based upon the Pacific oyster species with approximately 150 000 tons/year among which 90% are grown from the natural spat. However, the hatchery production of this species is developing and was estimated to 400 to 800 millions spats in 2002. Moreover, strengthened relationships between Ifremer and the 5 commercial hatcheries, that all joined the Sysaaf (Union of the French poultry, shellfish and fish farming selectors), allow to plan for new genetic breeding programmes.

At the end of the 80ies, Ifremer initiated a genetic breeding programme for the resistance of the European flat oyster to the bonamiosis, and obtained strains more tolerant to this disease. After two generations of massal selection, molecular markers had identified a reduced genetic basis in this programme. It was then re-oriented to an intra-familial selection. However, we were confronted to a zootechnical problem to manage such a scheme and we compromised by an intra-cohorts of families selection scheme managed using molecular markers. The programme has now reached the transfer level with experimentation at a professional scale.

Concerning the Pacific cupped oyster, and in parallel with the obtaining and the study of polyploids, performances of different Asian cupped oyster strains were compared to the one introduced in France thirty years ago and currently suffering from summer mortalities. The local strain exhibited better performance, certainly based upon a good local adaptation. In other respects, although early growth is a relevant criteria for selection for growth to commercial stage, it is not to be privileged in the context of an oyster producing region with a limited food availability. Contrary, the spat summer mortality became a priority for numerous teams (genetics, physiology, pathology, ecology...) joined in the Morest programme. The first results showed important survival differences between full-sib and half-sib families. They indicate a genetic determinism to this character "survival" and promote for its selection.

### L'amélioration de la résistance à la bonamiose chez l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*

---

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* représente l'espèce d'huître indigène européenne. Présente de la Scandinavie au Maroc, et jusqu'à la mer Noire, cette espèce a été traditionnellement cultivée en Europe et en France depuis l'Antiquité. Victime vraisemblablement d'une surexploitation dans les années vingt, voire de la

concurrence de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* dans certaines régions de production, l'huître plate a vu ensuite sa production se rétablir avant d'être successivement touchée par deux épizooties. La première, due à *Marteilia refringens*, a touché les exploitants des zones intertidales à la fin des années soixante; la seconde, due au parasite *Bonamia ostreae* a affecté dès 1979 les zones sub- et intertidales. Ces deux maladies ont affecté de manière pérenne la production d'*Ostrea edulis* qui, de 20 000 tonnes environ, s'est stabilisée actuellement aux alentours de 1 500 tonnes par an (Goulletquer & Héral, 1997). Cette production est essentiellement localisée en région Bretagne, selon une technique de semis en eau profonde, dans des zones peu propices au développement de *Marteilia refringens*. Les survies à taille commerciale sont de l'ordre de 5 à 10 %. Dans le même temps, et après la quasi-disparition de l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* dans les années soixante-dix suite à l'épizootie d'iridovirus, l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, introduite pour pallier la disparition de l'huître portugaise, a atteint un stade de quasi-monoculture avec plus de 99 % de la production conchylicole française. Ce chiffre est à rapprocher des 97 % que représente la production de cette espèce à l'échelle mondiale. Cette situation de monoculture dans laquelle se trouve la conchyliculture française est une donnée inquiétante pour la durabilité de la filière, et les efforts menés pour tenter de rétablir la filière huître plate vont dans le sens d'une diversification de cette activité et de sa durabilité.

Pour combattre l'impact des agents pathogènes affectant les cultures de bivalves, les moyens de lutte sont réduits et se limitent au contrôle de la dissémination du matériel vivant, d'une part; à l'amélioration génétique des cheptels pour une meilleure tolérance aux maladies, d'autre part. L'absence de réponses immunitaires spécifiques rend en effet inefficaces les traitements de type vaccination et l'élevage en milieu ouvert empêche l'application de traitements médicamenteux. La complexité du cycle de *Marteilia refringens*, parasite à plusieurs hôtes, n'est encore que partiellement élucidée, et sa présence est *a priori* limitée aux eaux peu profondes de la zone intertidale. En revanche, *Bonamia ostreae* présente un cycle court à un seul hôte et est présent dans l'ensemble des profondeurs exploitables. Les études pour tenter d'éradiquer ou de limiter l'impact de ces épizooties ont porté essentiellement sur ce dernier parasite.

Les mortalités dues à *Bonamia ostreae* affectent peu ou prou l'ensemble des côtes européennes (France, Irlande, Espagne, Angleterre, Pays-Bas, Danemark) et, dans tous les cas où elles ont eu lieu, les tentatives d'éradication de la maladie se sont montrées largement infructueuses. Seule la réduction de la densité des huîtres en élevage a permis dans certains cas de réduire les mortalités, sans pour autant faire disparaître le parasite. L'introduction de naissain « sain » a également été récemment tentée, sous l'impulsion de certains pays indemnes de *Bonamia ostreae* comme la Norvège, qui jouent sur la confusion entre absence de parasite et résistance de l'hôte. Les suivis effectués sur les premières importations de ce naissain montrent une infestation rapide en zones contaminées.

La sélection génétique d'animaux résistants à la maladie apparaît donc comme une alternative possible pour lutter contre ces mortalités. Des programmes d'amélioration génétique pour une meilleure résistance aux maladies ont été menés chez les mollusques, essentiellement chez *Crassostrea virginica*, *Saccostrea commercialis* et *Ostrea edulis*. Chez *Crassostrea virginica*, une amélioration croissante de la survie à *Haplosporidium*

*nelsoni* (MSX) a été observée sur 7 générations de sélection produites en éclosérie (Haskin & Ford, 1979; Ford & Haskin, 1987; Kennedy & Roberts, 1999). Chez la même espèce, une sélection contre la juvénile *Oyster disease* a montré des augmentations de survie après 4 générations de sélection (Farley, 1997). Plus récemment, un programme de sélection aux parasites *Mikrocytos rougbleyi* et *Marteilia sydneyi* a été initié en Australie chez *Saccostrea commercialis*, et a montré des gains de survie en faveur des huîtres sélectionnées dès la première génération (Nell *et al.*, 2000). Ces données montrent que la sélection génétique pour une meilleure résistance aux maladies est possible chez les mollusques bivalves.

Plusieurs programmes de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour une meilleure tolérance à *Bonamia ostreae* ont été démarrés en Europe, en particulier en Irlande et en France. L'existence au niveau individuel, chez les huîtres plates élevées en zones contaminées, d'une résistance naturelle a été en effet montrée depuis longtemps (Elston *et al.*, 1986) et suggère la possibilité d'une telle amélioration génétique. Cette résistance ne semble pas induire pour autant une amélioration de la survie au sein des populations naturelles. Le fait qu'*Ostrea edulis* se reproduise dès l'âge de 1 an alors que le parasite ne complète son cycle dans l'hôte qu'au bout de 2 à 3 ans peut expliquer en partie cet état de fait. Dans ces conditions, la valeur sélective du caractère resterait faible en conditions naturelles. Un projet CRAFT (regroupant le Royaume-Uni, l'Irlande, la Norvège, les Pays-Bas et certains privés français) a fonctionné de 1998 à 2000 de manière à vérifier le développement de la résistance chez certaines souches irlandaises. Des mortalités et des taux de prévalence moindres ont été observés chez les huîtres sélectionnées par rapport aux témoins, mais ceux-ci provenaient de gisements indemnes de bonamiose, ce qui est à même de biaiser les résultats obtenus (Culloty *et al.*, 2001).

En France, l'Ifremer s'est lancé, dès 1985, sur le problème de l'amélioration génétique de la tolérance à *Bonamia ostreae*, parallèlement aux études pathologiques menées sur le parasite. La purification de ce dernier, obtenue en 1988 a permis de recourir à des surinfections expérimentales, et de soumettre les huîtres à une pression de sélection mieux contrôlée que celle obtenue en conditions naturelles. Le programme a évolué d'une sélection massale à une sélection intrafamiliale. La gestion de la diversité génétique des lignées utilisées dans ce programme, et les suivis de terrain d'une durée de 3 ans expliquent la longueur de ce programme dont on ne retiendra que les principales étapes :

- en 1995, la comparaison des performances d'huîtres de 3<sup>e</sup> génération montrait un gain significatif par rapport au contrôle sauvage (59 % de survie contre 13 %), alors que les croisements entre ces animaux et le contrôle sauvage laissaient suggérer un déterminisme génétique susceptible d'être sélectionné (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Le protocole de croisement massal a été parallèlement modifié en croisements biparentaux de manière à diminuer les effets potentiels de consanguinité;
- de 1997 à 2000, des animaux sélectionnés issus de ce nouveau protocole ont montré des gains significatifs de performances par rapport aux deux cohortes de nais-sain naturel captées dans les deux années encadrant leur production en éclosérie (61 % de survie contre 46 et 13 %);
- de 1998 à 2000, le même gain de performances a été montré entre des animaux sélectionnés produits de manière familiale et les contrôles sauvages (83 % de survie contre 8 % en deuxième année) (fig. 1).



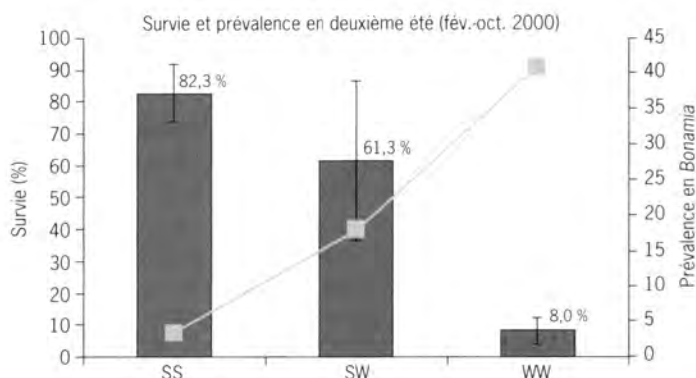


Figure 1 - Survie et prévalence à *B. ostreae* observées en fin de deuxième été sur les *O. edulis* sélectionnées pour la résistance à la bonamiose (SS), sur les familles issues chacune d'un parent sélectionné et d'un parent sauvage (SW) et sur les familles issues chacune de 2 parents sauvages non sélectionnés (WW).

Dans tous les cas, les taux de survie apparaissent corrélés aux taux de prévalence en *Bonamia*. Les résultats expérimentaux disponibles à l'heure actuelle sont donc prometteurs, et laissent penser à une tolérance accrue et transmissible des souches développées par l'Ifremer. Cependant, les expériences ont été jusqu'à présent menées, pour des raisons pratiques d'accès aux animaux et d'acquisition des données, en conditions expérimentales (lots de taille limitée, élevage en poches ostréicoles), non transposables au niveau de la production.

Une validation en conditions d'exploitation, c'est-à-dire avec un ou plusieurs million(s) de bêtes semées sur plus d'un hectare en eau profonde selon la technique classiquement utilisée par les ostréiculteurs est actuellement en cours de réalisation dans le cadre du projet Ofistrea soutenue par l'Ofimer (Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture), et s'avère être un préalable au transfert vers le secteur professionnel. Cependant, ce transfert implique un changement à la fois d'échelle et de stratégie dans la production du naissain d'huîtres plates. La demande actuelle est assurée par le captage de naissain naturel, essentiellement en Bretagne Sud, pour un semis en eau profonde au printemps de l'année suivant ce captage. Comme tout produit issu de la sélection génétique, les souches sélectionnées proviennent de croisements contrôlés qui ne sont réalisables qu'au sein d'écloseries. Incorporer ces dernières dans les filières de production est donc incontournable dès lors que l'on désire faire profiter les professionnels des acquis de la sélection. Dans certains cas, comme en Australie par exemple, la culture de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est entièrement basée sur la production de naissain d'écloserie. Les programmes de sélection mis en place pour améliorer la compétitivité de la filière peuvent donc s'intégrer sans rupture dans cette dernière. En France, l'activité conchylicole repose majoritairement sur le captage naturel, que ce soit pour l'huître creuse ou pour l'huître plate. L'écloserie expérimentale de l'Ifremer La Tremblade a développé pour ce programme de sélection un savoir-faire à l'échelle de la production de quelques centaines de milliers de naissains. L'implication des écloseries privées est incontournable pour un transfert de ces lignées vers le milieu professionnel.

### **Diversité génétique et amélioration par la sélection chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas***

Durant plus d'un siècle, la production d'huître creuse en France a reposé sur l'espèce *Crassostrea angulata*, introduite du Portugal en 1868. Suite aux mortalités massives observées à la fin des années 1960, *Crassostrea gigas* fut introduite en provenance du Japon (préfecture de Myagi) et de Colombie britannique (Canada). Cette introduction fut un succès et la production d'huîtres creuses fut rapidement relancée grâce à la reproduction spontanée de *C. gigas*, principalement dans les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron (Grizel & Héral, 1991). Parallèlement au captage naturel, la maîtrise de la reproduction de cette espèce en éclosérie a permis d'étudier la possibilité d'amélioration génétique de cette espèce. La triploïdie, obtenue initialement par rétention d'un des globules polaires au moment de la fécondation (voir pour revue Beaumont & Fairbrother, 1991 ; Gérard *et al.*, 1999) puis par simple croisement entre géniteurs diploïdes et tétraploïdes (Guo *et al.*, 1996), constitue une composante majeure des apports de la génétique aux productions d'huîtres creuses (voir pour revue Nell, 2002).

Parallèlement à ces travaux en cytogénétique et à leurs applications, des études ont été menées pour déterminer si les huîtres creuses actuellement cultivées en France sont bien adaptées à leur environnement ou si des populations de *C. gigas* ou de *C. angulata* d'autres origines pouvaient s'avérer plus intéressantes pour l'ostréiculture. Des expérimentations en milieu contrôlé et en conditions de production ont donc été réalisées. Pour des raisons zoosanitaires et afin d'éviter des biais liés à des différences d'âge ou de conditions environnementales, ces travaux ont été réalisés sur les descendants de géniteurs prélevés dans les populations testées. Ces géniteurs ont été maintenus en quarantaine, conditionnés et reproduits en éclosérie. Une telle démarche permet de limiter au maximum les risques zoosanitaires et les biais évoqués ci-dessus, mais les lots testés ne sont pas forcément toujours représentatifs des populations d'origine.

Dans un premier temps, ces travaux ont été menés sur la consommation en oxygène (indicateur physiologique du coût énergétique de maintenance résultant du catabolisme) de naissain (0,25 à 0,4 mg) dont les parents étaient originaires de France et du Japon (*C. gigas*); d'Espagne et de Taïwan (*C. angulata*). Les taux de respiration ont été mesurés individuellement à 20 °C au moyen d'un respiromètre volumétrique. Les résultats ont montré que les souches d'origine française et japonaise (*C. gigas*) ont un taux de respiration plus élevé que les souches d'origine espagnole et taïwanaise (*C. angulata*) (Gouletquer *et al.*, 1999). Dans un second temps, ces travaux se sont poursuivis sur des individus de plus grande taille, permettant d'établir un bilan physiologique (taux de filtration, d'ingestion, d'absorption et de respiration) déterminant une estimation du SFG (Scope For Growth) pour chaque individu étudié. De plus, le suivi en continu de ces paramètres sur des périodes de 3 heures a permis de déterminer la FTA (Feeding Time Activity) et la RTA (Respiratory Time Activity) et donc d'établir un SFGc (SFG corrigé), tenant compte des temps d'activité des animaux. Les résultats ont montré que les taux moyens de respiration et de filtration ne différaient pas entre les souches, mais que celles-ci présentaient des FTA et donc des SFGc significativement différents (la souche *C. angulata* présentant les valeurs les plus basses) (Haure *et al.*, 2003). Ces résul-

tats sont en concordance avec les données de croissance observées pour ces souches : la souche *C. angulata* présentant des taux de croissance inférieurs à ceux des autres souches testées (Huvet, 2000; Haure *et al.*, 2001).

Parallèlement aux comparaisons réalisées en laboratoires ou bassins expérimentaux, des comparaisons de performances ont été réalisées sur le terrain, dans des conditions proches de celles de production. L'objectif était notamment de confirmer si *C. angulata* présentait des croissances plus faibles, comme établi par les comparaisons à partir des données temporelles (Héral, 1986) et par une observation directe (Bougrier *et al.*, 1986). Quatre souches (deux taxons : *C. gigas* et *C. angulata*) d'origine européenne (France et Espagne) ou asiatique (Japon et Taïwan) et 2 lots hybrides (*C. gigas* x *C. angulata*) ont été suivis durant 2 années sur le banc de Ronce-Perquis dans le bassin de Marennes-Oléron. Les résultats montrent des performances de croissance et de survie de *C. gigas* supérieures à celles de *C. angulata* (Soletchnik *et al.*, 2002). De plus, pour chaque taxon, la souche européenne a présenté de meilleures performances que la souche asiatique, laissant supposer une adaptation de ces souches aux conditions locales.

La souche française de *C. gigas* apparaissant, comparativement à d'autres souches, bien adaptée aux conditions locales, les recherches se sont orientées vers l'étude des possibilités de sélection pour des caractères d'intérêt aquacole : survie et croissance à différents stades. Après des études sur la variabilité phénotypique de ces caractères à différents stades (Collet *et al.*, 1999; Boudry *et al.*, 2003), des estimations de leur héritabilité ont été entreprises. Dans un premier temps, 15 familles (5 mâles croisés chacun avec 3 femelles) ont été produites en éclosérie afin d'estimer l'héritabilité et les corrélations génétiques entre plusieurs caractères de développement précoce (croissance et survie larvaire, taille et âge à la fixation, taux de fixation, survie et croissance du naissain). Malgré les limitations liées essentiellement aux contraintes expérimentales (nombre de familles, absence de réplicats...), les résultats se sont avérés très intéressants permettant, notamment, de déterminer les caractères pour lesquels la variation est significativement héritable (survie larvaire, taux de développement larvaire, taille et succès à la fixation) et de révéler des corrélations génétiques négatives entre certains caractères (taux de développement et taille à la métamorphose, d'une part, et succès à la métamorphose, d'autre part) (Ernande *et al.*, 2003). Ces résultats montrent l'intérêt des approches multi-caractère, particulièrement, quand ceux-ci sont liés à l'allocation d'une même ressource.

Un deuxième ensemble de travaux s'intègre dans le défi Morest, projet multidisciplinaire coordonné par l'Ifremer ayant pour objectif de comprendre et proposer des solutions face aux mortalités estivales (voir Samain *et al.*, cet ouvrage). Quarante-cinq familles de plein-frères, soit 17 familles de demi-frères, issues de 3 séries de croisements (chaque série étant constituée comme précédemment) ont été produites avec pour objectif principal d'étudier la possibilité de sélectionner pour une meilleure survie du naissain au cours de la période estivale. Les résultats obtenus (testage des 45 familles sur 3 sites : Marennes-Oléron, La Trinité-sur-Mer, Port-en-Bessin) ont montré une forte variabilité entre familles de demi-frères (fig. 2), confirmant les valeurs élevées de l'héritabilité au sens strict de la survie ( $0.81 \pm 0.29$ ) et plus faibles pour la croissance (Dégremont *et al.*, 2002, 2003). Une seconde génération, obtenue par sélection divergente des meilleures et des moins

bonnes familles (pour la survie) au sein de la première génération (croisements intra- ou inter-familles) a permis d'estimer l'héritabilité réalisée du caractère et l'absence de corrélations génétiques significatives entre croissance et survie. Les valeurs obtenues (0,77 pour la lignée « haute » et 0,56 pour la lignée « basse ») confirment la forte héritabilité du caractère et donc la possibilité de sélectionner pour améliorer la survie (fig. 3) (Dégremont *et al.*, 2003; in prep.). Le transfert et l'intégration de ces résultats devraient contribuer à la mise en place de programmes de sélection pour ce caractère avec les écloséries d'huître en France, désormais adhérentes du Sysaaf (Syndicat des sélectionneurs avicoles et aquacoles français).

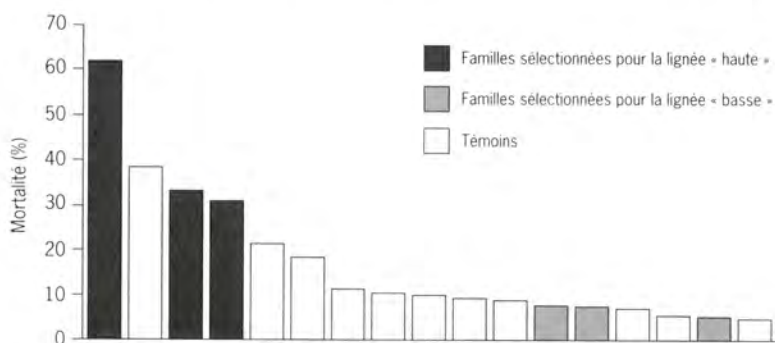


Figure 2 - Variabilité de la mortalité estivale (moyenne inter-site) entre les 17 familles de demi-frères de la première génération Morest ( $P < 0,001$ ).

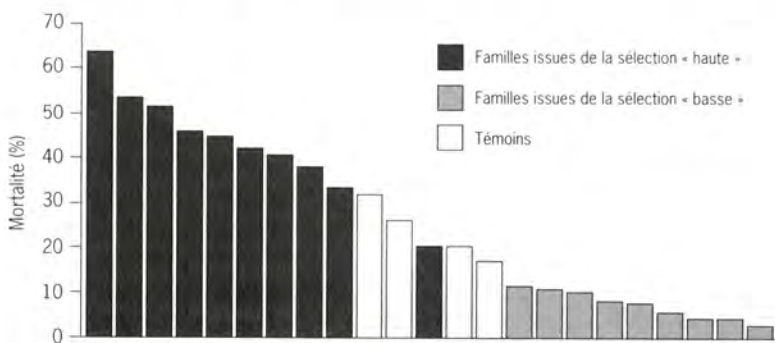


Figure 3 - Variabilité de la mortalité estivale (site de La Trinité-sur-Mer) entre les familles (sélection divergente non consanguine) de seconde génération Morest ( $P < 0,001$ ).

Aujourd'hui, les recherches s'orientent vers le développement de marqueurs génétiques qui permettront d'assister et, à terme, d'optimiser la sélection. Deux approches sont notamment développées : (1) analyses de parenté par marqueurs microsatellites afin de suivre la diversité (ex. Boudry *et al.*, 2002) et donc minimiser la consanguinité (projet en cours avec le soutien du BRG (Bureau des ressources génétiques)); (2) recherche de marqueurs de polymorphisme de gènes d'intérêt (ex. Sellos *et al.*, 2003). La cartographie du génome et les développements scientifiques et méthodologiques dans le domaine de la génomique (ex. Guéguen *et al.*, 2003) ouvrent également de nombreuses perspectives dans ce domaine.



## Selective breeding of *Litopenaeus vannamei* in Colombia

T. Gitterle<sup>(1)</sup>, B. Gjerde<sup>(2)</sup>, C. Lozano<sup>(1)</sup>, H. Johansen<sup>(2)</sup>, J. Arturo Suárez<sup>(1)</sup>, A. Suárez<sup>(1)</sup>, J. Faillace<sup>(1)</sup>, C. Erazo<sup>(1)</sup>, E. de la Vega<sup>(1)</sup>, M. Rye<sup>(2)</sup>

(1) Corporación Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia (Ceniagua), Punta Canoa, Cartagena de Indias, Colombia

(2) Institute of Aquaculture Research (Akvaforsk), Norway  
thomas.gitterle@akvaforsk.nlh.no

### Abstract

In 1997 Ceniagua (the Colombian Aquaculture Research Institute) in collaboration with Akvaforsk (Institute of Aquaculture Research, Norway) initiated a family selection scheme to improve the growth rate measured as harvest body weight and the innate resistance of *Litopenaeus vannamei* to WSSV as part of an ongoing selective breeding programme in Colombia. Records were obtained for pond harvest body weights and for WSSV challenge test survival on the offspring of 146 sires and 340 dams (Line 1) and 204 sires and 429 dams (Line 2) from in total seven different batches and two selected generations. The estimated heritability  $\pm$  SE for WSSV resistance was  $0.03 \pm 0.02$  (Line 1) and  $0.07 \pm 0.02$  (Line 2) and for harvest weight  $0.21 \pm 0.04$  (Line 1) and  $0.20 \pm 0.04$  (Line 2). The results indicate an unfavourable genetic correlation between resistance to WSSV and growth;  $-0.55 \pm 0.18$  (Line 1) and  $-0.64 \pm 0.19$  (Line 2). Thus, simultaneous improvement of both traits will require a family based selection approach. It is important to investigate whether this rather strong unfavourable genetic correlation between these two important economic traits is true or fully or partly caused by the challenge test procedure used.

### Résumé

En 1997, le Ceniagua (Institut colombien de recherche en aquaculture), en collaboration avec Akvaforsk (Institut de recherche en aquaculture, Norvège), a initié un schéma de sélection familiale chez *Litopenaeus vannamei* afin d'améliorer la croissance (estimée par le poids final à la pêche) et la résistance innée au WSSV, dans le cadre d'un programme de sélection génétique de Colombie.

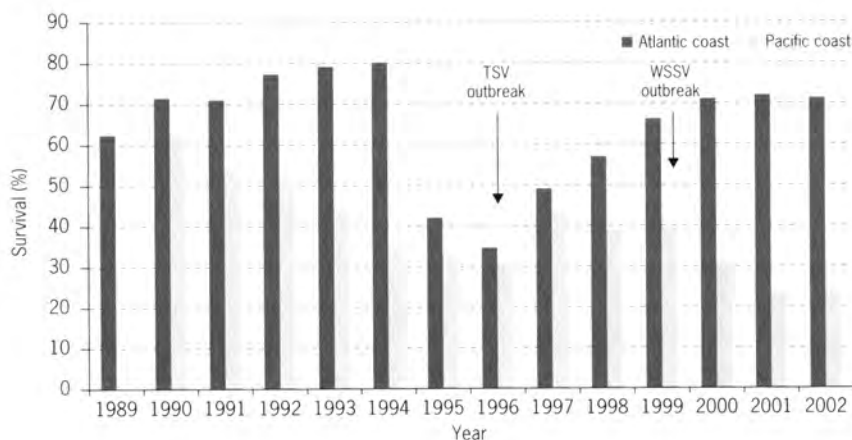
Le poids à la récolte et la survie lors de challenges viraux à WSSV ont été évalués chez les descendants des 146 mâles et 340 femelles (lignée 1) et chez ceux de 204 mâles et 429 femelles (lignée 2) issus de sept cohortes différentes et de 2 générations. L'héritabilité de la résistance au WSSV a été estimée à  $0,03 \pm 0,02$  (lignée 1) et à  $0,07 \pm 0,02$  (lignée 2). Celle du poids à la récolte a été estimée à  $0,21 \pm 0,04$  (lignée 1) et à  $0,20 \pm 0,04$  (lignée 2). Les résultats indiquent une corrélation génétique défavorable entre résistance au WSSV et la croissance :  $-0,55 \pm 0,18$  (lignée 1) et  $-0,64 \pm 0,19$  (lignée 2). Ainsi, l'amélioration génétique simultanée des 2 caractères nécessitera un schéma de sélection familiale. Il est important de rechercher si cette corrélation génétique plutôt forte entre ces deux caractères d'intérêt économique est réelle ou si elle est, pour tout ou partie, liée à la procédure utilisée pour le challenge viral.

## Introduction

The use of domestication and genetic improvement programmes in the shrimp industry is rather recent, in spite the fact that selective breeding programmes have proven very successful tools for increased production efficiency in all major livestock and several aquaculture species. During the past decade, viral diseases such as Taura Syndrome Virus (TSV) and White Spot Syndrome Virus (WSSV) have devastated the shrimp industry in several areas of the world. To face these challenges, the Colombian shrimp sector has developed a selective breeding programme for *Litopenaeus vannamei* directed towards development of stock with improved growth and increased resistance to diseases.

## National programme

In 1995 a major TSV outbreak in the Colombian Atlantic and Pacific coasts caused many losses to the industry. As the best way to solve the situation, the Colombian shrimp farmers started to raise surviving animals from highly affected ponds. After two generations of individual selection, the survival rate due to TSV in the both coasts increased by 20% (fig.). Based on the good results obtained in TSV resistance and the understanding of the benefits of selecting in a more efficient way, Ceniagua (Corporación Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia) in collaboration with Akvaforsk (Institute of Aquaculture Research) of Norway initiated in 1997 a national breeding programme in Colombia. The work initially focused on improved resistance to TSV, which no longer is considered a major threat to the shrimp sector in Colombia. However, in 1999 WSSV was first detected in the Americas and wreaked havoc in commercial shrimp farms along the Pacific coast. Consequently, the selective breeding programme is currently aiming at improved resistance to WSSV and increased growth, whilst maintaining the level of resistance obtained for TSV.



Annually mean survival rates in the Colombian Atlantic (black) and Pacific (grey) coasts from 1989 to 2002.

### Selective breeding strategies

---

The first steps towards the development of an improved stock of *L. vannamei* in Colombia involved mass selection for increased resistance for TSV, by reproducing animals that survived in severely affected ponds. The results were positive, and demonstrated the feasibility of directional selection for increased disease resistance.

In 1997, the Colombian shrimp sector initiated a combined family and within-family selection programme. The main advantages of family based selection schemes as compared to individual selection are higher flexibility, superior efficiency for improving traits that can only be recorded through destructive tests (e.g. carcass quality) or disturbing tests that cannot be undertaken in the breeding nucleus (e.g. disease challenge), and finally the possibility to control to the rate of inbreeding in the target populations. The latter is of particular importance in the highly fecund shrimp species, for which intensive individual selection may lead to rapid accumulation of inbreeding and inbreeding depression and loss of additive genetic variation that will reduce the rate of genetic gain.

Three base populations (batch 1, 2 and 3) were established from a total of 87 sires and 154 dams originating from eight countries in Latin America. The following four batches (batch 4, 5, 6 and 7) are descendant generations from these three base populations. Two genetic lines were founded from the three base populations. Line 1 (L1) is made up of batch 1 and their selected generations; i.e., batches 4 and 6. Line 2 (L2) is made up of batch 2 and 3 and their selected generations; i.e., batches 5 and 7.

Each batch was produced over a period of 1-3 weeks mainly using a nested mating design with females nested within males (full-sibs and paternal half-sib) and on a few occasions with males nested within females. At present a total of 448 full-sib families representing the offspring of 204 sires and 442 dams are produced. Families are hatched and reared separately until they reach approximately 1 gram. At this stage, randomly sampled animals from each family are tagged with Visible Implant Fluorescent Elastomers. Independent samples of tagged individuals from all families are then pooled and evaluated for resistance to specific diseases in experimental challenge tests, and for growth and survival in ponds at commercial farms located on the Atlantic coast of Colombia. Families of batch 3 onwards were challenged with WSSV in replicated tests in tanks at Ceniagua's laboratory in Tumaco on the Colombian Pacific coast where WSSV is endemic.

The families in all batches were evaluated for harvest weight, whereas challenges with WSSV were performed for families in batches 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9.

Breeding values are estimated by Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) methodology using the data recorded in the experimental challenge tests and during the grow-out trials performed on the commercial farms. The breeding values estimate an individual's ability to produce high performing offspring. Breeding candidates are finally ranked and selected as parents for the next generation according to an overall selection index that combines the candidate's breeding values for the various individual traits included in the overall breeding goal.

### **Biosecurity measures**

---

Since WSSV is epidemic, the biosecurity measures were increased at the maturation and larviculture facilities at Punta Canoa where the breeding nucleus is kept. Candidate broodstock animals are raised in circular 50 tons tanks with low water exchange and permanent aeration. Later they are transferred to the maturation tanks where biofilters are installed, lowering the water exchange levels to 5% per week. Animals displaying disease symptoms are identified and tested for viral and bacterial pathogens using PCR, bacterial culture and in PCR *in situ* hybridization techniques. Entry of crustaceans of all kinds is prevented by filtering water supplies and by physical barriers around the breeding nucleus facilities.

### **Results and prospects for improvement**

---

At present, complete data are available from seven batches of families representing 448 full-sibs and 204 and 12 paternal and maternal half-sib families, respectively. The results revealed a low but statistically significant heritability ( $<0.10$ ) for resistance to WSSV measured in controlled challenge test experiments in both lines. The estimated heritabilities for body weight at commercial harvest size are of intermediate magnitude ( $\sim 0.20$ ) and highly consistent for the two lines. Based on these results and substantial phenotypic variability, the prospects for genetic improvement for both traits are considered very promising. The correlation between mean family breeding values for growth and pond survival in farms are consistently positive (range 0.05-0.40), strongly indicating that selection for improved growth is expected to give a favourable correlated response for overall pond survival. Furthermore, strong positive correlation between full-sib family means for harvest weight in different test farms (range 0.65 to 0.99) demonstrates low genotype by environment interaction for growth in Colombia and implies that one breeding population may serve the range of commercial production environments in the county.

However, results have revealed a negative correlation of intermediate magnitude (range -0.23 to -0.55) between mean family breeding values for growth in commercial farms not affected by WSSV and survival in controlled WSSV challenge test experiments. These findings strongly indicate that intensive selection for growth rate in production environments not affected by WSSV over time may result in a population highly susceptible to WSSV.

In spite of the strong indication of an unfavourable genetic correlation between growth rate and the ability to withstand WSSV, the family based breeding scheme in Colombia is designed to improve both traits simultaneously.

### **Predicted selection responses**

---

Based on the results obtained in batch 1 to 5, simultaneous selection for increased growth (recorded as harvest weight) and resistance to WSSV (recorded as survival in experimental challenge test experiments) has provided a mean selection response per generation of approximately 7% for each of these traits. Growth and resis-



tance to WSSV have been given the same relative weighing in the selection (0.45 and 0.45). The remaining selection pressure (0.10) has been applied to general pond survival, and a positive selection response is also obtained for this trait.

### **Dissemination**

---

A system for supplying improved genetic material throughout the Colombian shrimp sector is in place, with commercial hatcheries serving as multipliers. While the selection for reproduction of the breeding nucleus involves simultaneous selection for both growth rate and WSSV, candidate breeders used for production of dissemination seed for the Atlantic coast (not affected by WSSV) and the Pacific coast (affected by WSSV) are selected solely on basis of their genetic merit for growth and WSSV, respectively. Thus for the individual traits, the genetic level of animals stocked for grow-out is higher than for the contemporary breeders used in the breeding nucleus.

The Colombian shrimp sector has confidence in the breeding stocks and now over 20% of the total production comes from family selected populations.

### **Supporting research activities**

---

Ceniagua supports the genetic improvement programme by research on techniques and methodologies directed to improving the efficiency of the breeding operation. Work is advancing on cryopreservation of sperm, which would facilitate improved genetic links between subsequent batches of families, documentation of genetic gains, and provides a means of safeguarding improved genetic material. Advanced genetic techniques are likely to become increasingly important as supplementary tools in genetic improvements programmes for marine shrimps in the future. Recent advances in gene mapping facilitate marker-assisted selection by identifying genetic markers associated with traits of economic interest. Supporting research activities in Ceniagua currently evaluate the potential of using genetic markers to select for resistance to WSSV. The use of genetic marker information may increase the accuracy of selection and lead to even higher selection responses. Microsatellite analyses are being developed to monitor the level of genetic variation in the breeding populations and as a tool for verifying the mating programme.

### **Acknowledgements**

This work has been supported by the Colombian agencies Proexport, Colciencias, the Ministry of Agriculture and Rural Development and the Colombian Shrimp Industry. The constant cooperation of the Colombian shrimp farmers has been a key element of this project.

## Synthèse des travaux de génétique « crevette » menés à Tahiti : quel bénéfice pour la filière calédonienne ?

E. Goyard, E. Bédier, J. Patrois, V. Vonau, D. Pham, G. Cuzon, L. Chim,  
L. Penet, T. Dao, P. Boudry, Aquacop

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Emmanuel.Goyard@ifremer.fr

### Résumé

La sélection des espèces pour leur aptitude à l'élevage et leur domestication est la première étape de l'exploitation des ressources génétiques menant à des programmes plus élaborés de sélection génétique. Ainsi, dans les années quatre-vingt, une des premières activités du Centre océanologique du Pacifique de l'Ifremer (COP) a consisté à introduire 12 espèces de pénéides et à les tester pour répondre à la demande des filières « crevette » émergentes de Tahiti et de Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus stylirostris* fut retenue pour la Calédonie du fait de sa meilleure tolérance aux températures de saison froide et à l'intensification des élevages. Néanmoins, un programme de génétique structuré n'a démarré qu'en 1992. Il visait à (i) caractériser les populations domestiquées d'un point de vue moléculaire et (ii) évaluer les possibilités d'améliorer les performances d'élevage par la sélection.

Parmi les marqueurs génétiques développés en collaboration avec le Csiro (Australie) et l'USTL Montpellier, 4 marqueurs microsatellites polymorphes sont utilisés en routine au COP Tahiti. En 2001-2002, ils ont permis de démontrer le faible niveau de variabilité génétique des stocks de *L. stylirostris* élevés à Tahiti, en Calédonie et à Hawaï. La forte consanguinité des lots actuellement en élevage à Tahiti et en Calédonie, d'une part, et à Hawaï, d'autre part, est vraisemblablement due aux goulots d'étranglement qui ont affecté ces populations durant leur domestication. Cependant, la dérive génétique aléatoire n'ayant pas éliminé les mêmes génotypes, la variabilité génétique des stocks exploités en Calédonie pourrait être augmentée par l'introduction des stocks domestiqués hawaïens.

Des expériences de sélection ont débuté dès 1993. Si la sélection du caractère « queue verte » qui a permis d'obtenir des familles consanguines sélectionnées n'a pas d'application commerciale réelle, les résultats les plus exploitables concernent la sélection massale pour la croissance. Malgré une héritabilité faible, explicable par la faible variabilité de la population soumise à sélection, la vitesse de croissance a été améliorée de 32 % en 7 générations. Le progrès génétique reste significatif, bien que plus faible (18 %), si la population sélectionnée et son témoin sont testés sur un aliment plus riche en carbohydrates que l'aliment commercial riche en protéines utilisé lors du processus de sélection. Ceci est cohérent avec d'autres résultats obtenus à Tahiti sur *L. vannamei* en collaboration avec l'Unam (Mexique). Aucun effet de la sélection n'a été observé sur d'autres caractères comme la capacité osmorégulatrice, l'indice de consommation *ad libitum*, et la digestibilité des protéines et des carbohydrates.

L'introduction des souches hawaïennes, que des résultats préliminaires suggèrent d'exploiter en produisant des hybrides terminaux entre lignées, augmenterait les chances de succès d'un programme d'amélioration génétique, notamment pour la résistance aux maladies.

### Abstract

---

Selection of the best species for culture and their domestication is the first step in the exploitation of genetic resources leading to more elaborated selective breeding programmes. Thus, one of the first scientific activities of the Ifremer's Centre océanologique du Pacifique (COP) in the 80's was to introduce 12 candidate penaeid species and to assess them to meet the demand of the Tahitian and New Caledonian emerging shrimp industries. *Litopenaeus stylirostris* stood out as the most suitable species for New Caledonia because of its tolerance to both mild temperatures and high density farming conditions. Nevertheless, a structured scientific programme in genetics started only in 1992 and aimed at (i) the molecular characterization of the genetic variability of domesticated populations and (ii) the assessment of the potential to improve their rearing performances through selection.

Genetic markers were developed through collaboration between Australia and France. Among them 4 polymorphic microsatellite markers have been used in routine in COP Tahiti. In 2001-2002, they allowed to demonstrate that the loss of genetic variability is high among the closed broodstocks of *L. stylirostris* available in Tahiti, New Caledonia and Hawaii and is likely due to some bottlenecks which occurred during the domestication process in Tahiti and New Caledonia on one side, and in Hawaii on the other side. As a consequence, the current stocks in culture are highly inbred. However, as random genetic drift did not eliminate the same genotypes, the genetic variability of the stocks farmed in New Caledonia could be increased by the introduction of the Hawaiian domesticated stocks.

Some selective breeding experiments were conducted as early as 1993. If the selection of the green colour of the tail, which supplied some selected inbred families, has not showed any practical application, the most useful experiments concern mass selection for growth. Despite a low heritability which can be explained by the low residual variability of the population under selection, the growth rate was increased by 32% through 7 generations. Although lower (18%), the genetic gain remains significant if the selected population and its control are tested on a diet richer in carbohydrates than the high protein commercial diet used during the selection process. This is consistent with other results obtained on *L. vannamei* in Tahiti in collaboration with Unam (Mexico). No impact of selection was demonstrated on other traits like *ad libitum* feed consumption rates, digestibility of proteins and carbohydrates and osmoregulatory capacity.

Preliminary results suggest the use of Hawaiian strains to produce inter-lines hybrids and their introduction could increase the success of a selective breeding programme, in particular for disease resistance.

## Introduction

---

Dans les années quatre-vingt, une des premières activités du centre océanologique du Pacifique de l'Ifremer a consisté à introduire à Tahiti 12 espèces de pénéides: *Penaeus monodon*, *P. plebejus*, *P. aztecus*, *P. semisulcatus*, *P. esculentus*, *Metapenaeus ensis*, *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *Marsupenaeus japonicus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *F. chinensis* et *F. indicus*. (Aquacop, 1984). L'objectif visé était d'évaluer leur potentiel aquacole dans les environnements de Tahiti et de Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus stylirostris* fut sélectionnée pour la Nouvelle-Calédonie du fait de sa meilleure tolérance aux températures de saison froide et à l'intensification des élevages. À partir des quelques dizaines d'individus sauvages introduits initialement, les travaux menés à Tahiti pour maîtriser la reproduction de cette espèce en captivité (Aquacop, 1979) ont permis de produire plus de vingt à vingt-cinq générations sur les deux territoires. La domestication, qui peut être définie comme la sélection qui s'opère spontanément pour de meilleures aptitudes à l'élevage, et dont *L. stylirostris* a bénéficié, est susceptible d'expliquer, au moins partiellement, les excellentes performances enregistrées sur les fermes de Nouvelle-Calédonie, avec des rendements de l'ordre de 4 tonnes/ha/an (Lucien-Brun, 2001), et la résistance de la souche au virus IHNV (Weppe *et al.*, 1992). Néanmoins, un programme de génétique structuré n'a émergé qu'en 1992 à l'Ifremer. Il visait à (i) caractériser la diversité génétique des populations domestiquées d'un point de vue moléculaire et (ii) évaluer les possibilités d'améliorer les performances d'élevage par la sélection. Pour des raisons d'ordre essentiellement logistique, ce programme s'est déroulé à Tahiti jusqu'en 2002, avant d'être transféré en Nouvelle-Calédonie, terrain d'application de ces travaux. Quel bénéfice les acteurs de la filière calédonienne peuvent-ils tirer de ces 10 années de recherches qui se sont déroulées dans un contexte différent du leur? L'expérience acquise peut-elle servir d'exemple à d'autres filières aquacoles?

## Étude des ressources génétiques disponibles au sein des populations domestiquées de *L. stylirostris*

---

### Contexte

D'une façon générale, la perte de variabilité génétique des stocks domestiqués est connue depuis longtemps, y compris chez les crevettes pénéides (Sbordoni *et al.*, 1986; Sunden & Davis, 1991). La population de *L. stylirostris* disponible à Tahiti s'est avérée peu variable et fortement consanguine (Bierne *et al.*, 2000a), mais aucune donnée n'était disponible pour évaluer la perte par rapport aux populations sauvages fondatrices. La corrélation négative entre vitesse de croissance et niveau de consanguinité individuelle a été démontrée au sein de la population tahitienne (Bierne *et al.*, 2000a), et des résultats similaires ont été obtenus chez *P. japonicus* (Crococ *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la population calédonienne de *L. stylirostris*, les faibles effectifs génétiques utilisés pendant les années de mise au point de la reproduction en éclosérie ont probablement réduit sa variabilité génétique, affectant potentiellement sa capacité de réponse à de nouvelles pressions de sélection, spontanées ou contrôlées dans le cadre d'un futur programme d'amélioration. La solution théo-



rique pour éviter ce problème susceptible d'affecter le développement de la filière était bien sûr une introduction préventive de variabilité génétique, mais deux types de considération n'avaient pas jusqu'à maintenant permis d'en décider la mise en œuvre. D'une part, la population calédonienne apparaît comme particulièrement performante à ses utilisateurs. D'autre part, dans un contexte zoosanitaire international difficile, tout transfert d'animaux représente un risque d'introduction de pathogènes inconnus ou non détectés et ceci même en respectant les recommandations du Conseil international pour l'exploitation de la mer (CIEM) en matière de transferts internationaux d'animaux. Les travaux menés à Tahiti sur la variabilité de la population locale (Bierne *et al.*, 2000a) n'étaient donc pas considérés comme suffisants pour démontrer la nécessité d'introduire de la variabilité en Nouvelle-Calédonie, et ceci bien que la population calédonienne de *L. stylirostris* ait une origine commune et une histoire similaire à celle de Tahiti. En d'autres termes, le développement durable de la filière crevette de Nouvelle-Calédonie passait par une étude des ressources génétiques réellement disponibles au sein du cheptel exploité sur le territoire, et au sein de populations extérieures susceptibles d'être introduites de manière contrôlée.

#### Stratégie d'échantillonnage

Cinq populations néo-calédoniennes indépendantes les unes des autres depuis 4 à 7 générations ont été échantillonnées (prélèvement et conservation dans l'alcool des pléopodes d'une trentaine d'individus par population).

Quatre populations susceptibles d'être introduites ont été échantillonnées de façon similaire :

- la population tahitienne, dont la similarité avec la souche calédonienne devait être précisée ;
- une population sauvage d'Équateur, représentative de la diversité initialement disponible ;
- deux populations domestiquées à Hawaï depuis respectivement 5 et 25 générations dans le cadre du programme de production de géniteurs de crevettes pénéides exempts de pathogènes (statut dit « SPF ») mené par l'USDA (Département de l'agriculture des États-Unis) et présentant donc l'avantage d'être les seules populations de *L. stylirostris* au monde ayant un statut sanitaire limitant les risques d'introduction de pathogènes.

#### Outils moléculaires utilisés

Différents marqueurs génétiques sont disponibles chez *L. stylirostris* : des microsattellites développés pour *L. vannamei* (Vanna.01 et Vanna.02 ; Garcia *et al.*, 1996) ont été adaptés à *L. stylirostris* (Bierne *et al.*, 2000a) ; des microsattellites ont été développés pour *L. stylirostris* en collaboration avec l'USTL de Montpellier (Pstyli.05, Pstyli.07, Pstyli.09 et Pstyli.19 ; Vonau *et al.*, 1999) ; un marqueur intronique a été développé sur *P. monodon* en collaboration avec le CSIRO et transféré sur *L. stylirostris* (Elongation Factor 2 ; Bierne *et al.*, 2000b).

Parmi eux, trois marqueurs microsattellites (Vanna.01, Vanna.02 et Pstyli.19) dont la révélation argentique est maîtrisée au COP ont été utilisés pour cette étude.

## Résultats

L'analyse des génotypes étudiés a montré que :

- la variabilité des populations domestiquées, en particulier celles de Nouvelle-Calédonie et de Tahiti, est très réduite par rapport à la population sauvage ;
- les populations calédoniennes et tahitiennes partagent les mêmes allèles : la perte d'allèles a probablement eu lieu au cours de leur histoire commune en début de domestication ;
- l'importation en Nouvelle-Calédonie d'une ou des deux souche(s) hawaïenne(s) permettrait de disposer d'une diversité allélique accrue (respectivement 25 % et 40 % de la diversité de l'espèce après introduction) ;
- sur l'ensemble des 3 locus, seul un allèle est à la fois présent en Nouvelle-Calédonie et dans une des populations de Hawaï : les locus Vanna.02 et Pstyli.19 permettent d'assigner chaque individu à sa population d'origine, et donc d'évaluer la contribution de chaque souche à la production calédonienne.

En s'inspirant d'une méthode développée par Launey *et al.* (2001), Goyard *et al.* (2003) ont montré que le transfert de 32 géniteurs par souche devrait permettre d'introduire l'ensemble de la variabilité disponible à Hawaï et d'initier un schéma de croisements rotatif utile à sa gestion ultérieure.

## Amélioration génétique par sélection au sein d'une population domestiquée de *L. stylirostris*

### Contexte

La faisabilité de la sélection sur la vitesse de croissance ou sur la résistance à certains pathogènes a été démontrée chez *P. japonicus* (Hetzel *et al.*, 1999) et *P. vannamei* (Wyban & Swingle, 1999; Argue *et al.*, 2000). Chez *L. stylirostris*, les bases génétiques de la résistance au virus IHNV de la population tahitienne ont été signalées par Weppe *et al.* (1992). Cette résistance n'est pas le fruit d'un programme de sélection orienté, mais le produit de la domestication de cette espèce en présence du virus. Sur la même population, la coloration verte de la queue a été fixée sur des familles consanguines en 6 générations de sélection inter et intra-familiale (Goyard, données non publiées), démontrant que la souche tahitienne disposait encore d'un certain niveau de variabilité pour ce caractère.

Les travaux menés à Tahiti en sélection expérimentale ont essentiellement porté sur la vitesse de croissance en sélection individuelle. Des gains significatifs de l'ordre de 20 % ont été obtenus à partir de la quatrième génération (Bédier *et al.*, 1996), malgré une héritabilité réalisée relativement faible du caractère de l'ordre de 15 % (Goyard *et al.*, 2001), probablement due à la faible variabilité génétique de la population sous sélection (cf. chapitre précédent). Afin d'évaluer l'intérêt de l'amélioration de la vitesse de croissance, la réponse corrélée a été étudiée sur d'autres caractères d'intérêt économique sur les générations suivantes.

### Effet de la sélection « croissance » sur la consommation, la conversion et la digestion de l'aliment

Des animaux pesés, sexés, marqués individuellement et appartenant à la sixième génération de la population soumise à sélection et à la sixième génération de la population témoin (population reproduite de génération en génération sans autre

sélection que la sélection spontanée exercée par les conditions d'élevage) ont été regroupés en deux fois huit lots de dix animaux dans des bacs de 150 litres aérés et renouvelés en eau à raison de 100 % par heure. Pendant 4 semaines, ils ont été nourris en excès deux fois par jour avec l'aliment commercial utilisé en routine (45 % de protéines) après que les refus d'aliments aient été siphonnés pour être séchés et pesés. Le gain de poids a été mesuré pour chaque individu et pour chaque lot en fin d'expérience; la consommation d'aliment par lot a été calculée par différence entre aliment distribué et aliment refusé; l'indice de conversion a été calculé pour chaque lot témoin et chaque lot sélectionné n'ayant enregistré aucune mortalité sur la durée de l'expérience. Une expérience similaire a été menée sur les septièmes générations des populations sélectionnées et témoins.

Les résultats sont cohérents entre les deux générations et font apparaître que les animaux sélectionnés ne consomment pas plus d'aliment que les témoins. Du fait de la meilleure croissance de la population sélectionnée, les indices de conversion des lots sélectionnés sont significativement plus bas que ceux des lots témoins (fig. 1). Ces deux expérimentations ont été suivies de deux autres visant au calcul de la digestibilité des protéines et des carbohydrates (Penet *et al.*, 2001; Dao *et al.*, 2002). Les mêmes animaux ont été regroupés en 2 x 2 bacs de 1,5 m<sup>2</sup> (deux bacs par population), puis alimentés 4 fois par jour de façon à éviter les refus. Les fèces étaient récoltées une heure après pour séchage. Le calcul des coefficients de digestibilité des protéines et des carbohydrates a été rendu possible par le marquage préalable de l'aliment par un indicateur de digestion (cendres insolubles dans l'acide) selon le protocole d'Atkinson *et al.* (1984). Aucune différence significative entre populations n'a été mise en évidence.

Ces résultats montrent que la sélection pour de meilleures performances de croissance ne s'est pas accompagnée, comme chez certains salmonidés (Sanchez *et al.*, 2001), d'une augmentation de la consommation d'aliment réduisant l'intérêt économique du progrès génétique réalisé. Dans la mesure où la digestibilité des aliments n'est pas améliorée, les différences observées entre populations pourraient s'expliquer par un comportement ou un métabolisme de base différent entre populations, mais cela reste à démontrer.

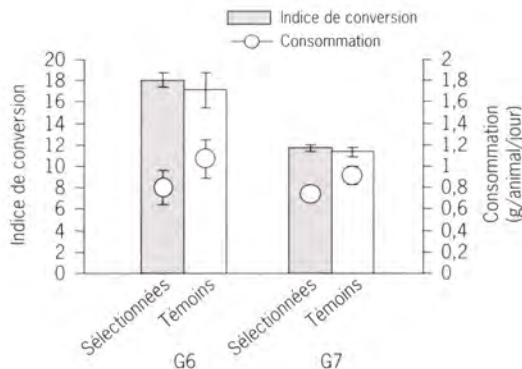


Figure 1 - Effet de la sélection « croissance » sur la consommation et la conversion de l'aliment.

### Effet de la sélection « croissance » sur la capacité à valoriser des aliments riches en carbohydrates

La sélection expérimentale réalisée à Tahiti a consisté à faire reproduire pendant sept générations les individus les plus gros au sein d'une population nourrie avec un aliment commercial à 45 % de protéines. Compte tenu de l'intérêt potentiel de la substitution des aliments commerciaux actuels par des aliments plus riches en carbohydrates, moins polluants et moins chers (Cuzon & Williams, 2001), une expérience a été menée à la septième génération pour déterminer si le progrès génétique réalisé en 7 générations serait conservé si l'aliment utilisé était désormais un aliment riche en carbohydrates (Dao *et al.*, 2002). En fait, le protocole décrit au point précédent a été dupliqué, mais avec un aliment expérimental « Hcbh » contenant 41 % de carbohydrates et 31 % de protéines au lieu de 21 % et 45 % respectivement pour l'aliment commercial « Lcbh ».

Il apparaît que la population sélectionnée grossit significativement plus vite que la population témoin avec l'aliment expérimental et avec l'aliment commercial. Néanmoins, le progrès mesuré n'est plus que de 18 % avec l'aliment expérimental, au lieu de 32 % avec l'aliment utilisé tout au long des sept années du processus de sélection (fig. 2). L'interaction population x aliment est à la limite d'être significative ( $p = 0,09$ ).

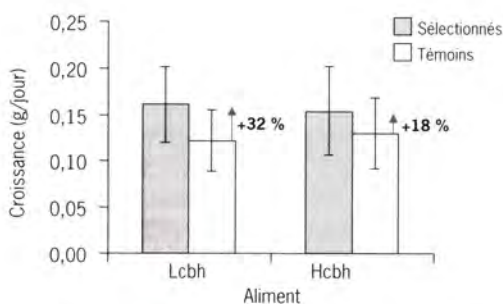


Figure 2 - Effet du régime alimentaire sur l'évaluation du progrès génétique en sélection « croissance ».

Ces résultats tendent à montrer que l'efficacité du programme de sélection pour la croissance sera augmentée si les animaux sont sélectionnés au sein d'une population alimentée de façon similaire à ce qui est pratiqué dans les fermes. Ils rejoignent les résultats obtenus sur *L. vannamei* par Arena *et al.* (2002) dans le cadre d'une coopération Ifremer-université de Mexico qui montrent que les populations domestiquées au Mexique et à Tahiti, qui ont toujours été alimentées avec un aliment riche en protéines, ont une capacité à valoriser les carbohydrates plus faibles que la population sauvage d'origine.

### Conclusions et perspectives

Les travaux de sélection expérimentale menés à Tahiti sur une population génétiquement proche de celle de Nouvelle-Calédonie montrent que des gains de productivité peuvent être attendus de la mise en œuvre par les écloséries de Nouvelle-



Calédonie de méthodes relativement simples de sélection. La sélection pour la résistance au Syndrome 93 est une voie à explorer et qui commence à donner des résultats encourageants (Goarant *et al.*, cet ouvrage). Néanmoins, la faible variabilité génétique du stock calédonien, longtemps suspectée puis démontrée, est un facteur limitant les réponses à de nouvelles pressions de sélection. Dans un contexte où les conditions d'élevage sont susceptibles d'évoluer (nouveaux pathogènes, nouvelles normes zootechniques, nouveaux aliments, nouvelles exigences de la clientèle), la pérennité de la filière passe donc nécessairement par une gestion raisonnée de la variabilité résiduelle mais aussi et surtout par l'introduction de variabilité génétique. D'une façon générale, si l'étude de la consanguinité et de la variabilité génétique des populations aquacoles constitue un sujet de recherche classique, on dispose de peu de recul à l'échelle mondiale sur la stratégie de réintroduction de variabilité au sein d'une filière donnée. Ce type d'opération a été conseillé en Inde chez la truite Arc-en-ciel (Gopalakrishnan *et al.*, 1999), est achevé en Martinique chez l'ombrine subtropicale *Sciaenops ocellatus* (Dao & Falguière, comm. pers), et a été pratiqué avec succès en Chine chez le pétoncle *Argopecten irradians* après onze générations de domestication (Zhang *et al.*, 1997). En fait, la plupart des filières aquacoles reposent soit sur des espèces indigènes, soit sur des espèces introduites qui ont réussi à constituer des populations locales sauvages (huître creuse, salmonidés...) si bien que la ressource génétique est en général directement accessible et exploitable, sans grand risque zoonitaire. À l'inverse, très peu de filières reposent encore, comme la filière calédonienne, exclusivement sur une population domestiquée depuis 30 générations, indépendante d'une population sauvage ou « ensauvagée ». Dans un contexte zoonitaire, de plus en plus défavorable, qui augmente la difficulté et le coût de toute tentative d'introduction, les travaux présentés ici préfigurent les questions auxquelles seront confrontés les acteurs d'autres filières qui reposeraient sur des bases biologiques similaires et, en particulier, celles qui feraient uniquement appel à l'introduction d'une seule souche domestiquée et peu variable d'une espèce donnée.

En ce qui concerne la filière calédonienne, les souches hawaïennes domestiquées, à statut sanitaire SPF, représentent une opportunité d'introduction de diversité allélique unique. Les informations récentes en provenance d'Hawaï (destruction, pour raison économique, d'une des deux seules souches de *L. stylirostris* SPF disponibles dans le monde; Wyban, comm. pers.) montrent l'urgence pour la filière calédonienne de se doter des outils et structures nécessaires à la négociation, l'achat et la gestion de ce nouveau matériel génétique. Le maintien des populations calédoniennes et hawaïennes en parallèle sera à prévoir afin de tester en priorité l'hypothèse d'un effet d'hétérosis entre ces populations, stratégie que suggèrent les résultats obtenus sur l'effet de la consanguinité sur les performances de croissance (Bierne *et al.*, 2000a). Dans tous les cas, la qualité finale des produits issus des différentes populations, pures ou hybrides, devra être évaluée pour conserver ou améliorer l'image de la crevette calédonienne sur le marché international.

## Nitrogen and shrimp ponds: whole-farm N budgets and nitrogen removal from effluent

C. Jackson

CSIRO, Marine Laboratory, 233 Middle Street, Cleveland, QLD 4163, Australia  
Chris.Jackson@csiro.au

### Abstract

A detailed farm nitrogen (N) budget was assessed for a shrimp farm intensively rearing *Penaeus monodon*. Over 10 months, weekly water samples from farm inlet and outlet were analysed for total N (TN), and dataloggers were used to accurately measure water flow through the farm. Farm records for feed and harvest were also included. The results showed that TN levels in the intake water were always low and only contributed 5% of the N input to the farm. Most of the N (90%) entered the farm as formulated shrimp food. Within the farm only 22% of the input N was converted to harvested shrimp, 14% remained in the sediment, while most of the remainder (57%) was discharged to the environment. Only 3% of input N was unaccounted for, and assumed to be lost to the atmosphere *via* denitrification or volatilization of ammonia.

Several Australian farms have trialled sedimentation ponds to reduce effluent loads of particulate matter and TN. The performance of five sedimentation ponds, with a range of flow rates and residence times, was assessed. The maximum TN removal rate was about 22% (mostly reduction in particulate N). Increasing residence time did not improve TN removal. This is consistent with results from published studies on treatment wetlands, which suggest that natural processes cannot reduce TN concentration below about 1.5 mg.l<sup>-1</sup>. These studies also predict that TN removal efficiency can be very high (e.g. > 90%) provided the input TN concentration is also increased. Therefore effective removal of TN from shrimp farm wastewater should be feasible provided the TN can be concentrated several-fold. Some possible methods for achieving this are discussed.

### Résumé

Le bilan détaillé en azote (N) d'une ferme intensive de *Penaeus monodon* a été étudié. Chaque semaine sur une période de 10 mois, des échantillons d'eau d'entrée et de sortie de la ferme ont été analysés en azote total (TN). Des enregistreurs ont été utilisés pour mesurer avec précision le débit d'eau traversant la ferme. Les données en aliment distribué et de production de crevettes ont également été incluses dans l'analyse. Les résultats montrent que les teneurs en TN dans l'eau d'entrée restent faibles et contribuent pour seulement 5% de l'azote de la ferme. La plus grande partie de l'azote (90%) est introduit par l'aliment artificiel distribué aux crevettes. Seuls 22% de l'azote apporté sont convertis en biomasse de crevette, 14% restent dans le sédiment, alors que la majorité de l'azote restant (57%) est évacué dans l'environnement. Seulement 3% de l'azote apporté est supposé être perdu dans l'atmosphère *via* la dénitrification ou la volatilisation de l'ammoniaque.

Nos études au sein du bassin ont montré qu'à cause de la faible proportion d'azote incorporée dans la biomasse de crevette une grande quantité de déchets azotés entrent dans le système du bassin, ce qui entraîne des concentrations élevées en azote ammoniacal total (TAN) et en azote organique dissous (DON), et une biomasse élevée en nanoplancton et bactéries. Les niveaux élevés de TAN sont principalement le résultat d'une reminéralisation rapide des déchets au fond du bassin, particulièrement dans la zone d'accumulation de boue au centre du bassin. La communauté phytoplanctonique des bassins de crevette est capable d'assimiler rapidement le TAN. Il y a, cependant, un équilibre dynamique entre la production de TAN et son incorporation, qui résulte en des fluctuations rapides des concentrations en TAN dans la colonne d'eau. Le DON est produit principalement par la dégradation de l'aliment et des fèces des crevettes. Contrairement au TAN, la majorité du DON est réfractaire et n'est pas dégradé rapidement par la communauté microbienne. Des mesures directes ont montré que la dénitrification était un processus mineur dans les bassins et lié aux faibles concentrations en nitrate et nitrite, ce qui suggère aussi que la nitrification est peu importante.

Plusieurs fermes australiennes ont testé des bassins de décantation pour réduire la charge des effluents en matière particulaire et TN. La performance de cinq bassins de décantation, avec différentes vitesses d'entrée d'eau et de temps de résidence, a été testée. Le taux maximum d'élimination du TN est d'environ 22% (principalement par réduction du N particulaire). L'augmentation du temps de résidence n'améliore pas l'élimination du TN. Ces résultats sont en accord avec les études publiées sur le traitement des zones humides, qui suggèrent que les processus naturels ne peuvent pas réduire la concentration en TN en dessous d'environ 1,5 mg.l<sup>-1</sup>. Ces études prédisent que l'efficacité de l'élimination du TN peut être très élevée (e.g. > 90 %) à condition que la concentration en TN soit aussi augmentée. Ainsi, l'élimination effective du TN de l'eau de rejet des fermes de crevettes pourrait être faisable à condition que le TN puisse être concentré plusieurs fois. Les méthodes envisageables sont discutées.

## Introduction

Nitrogen plays several critical roles in shrimp farming. In shrimp feeds it represents protein, the most costly ingredient and one provided largely by fishmeal, in turn derived - with questionable sustainability - from wild fish stocks (Naylor *et al.*, 1998). Within the pond production system, a substantial proportion of the nitrogen is present as ammonia, which is a critical water quality parameter in determining shrimp stress and health (Lin *et al.*, 1993; Chen & Lin, 1992). Finally, the water discharged from shrimp farms contains substantial quantities of nitrogen in various forms, which have the potential to cause eutrophication in the local environment (Burford *et al.*, 2003). Together, these issues have contributed towards widespread concern about the ultimate sustainability of present shrimp farming systems (Naylor *et al.*, 2000; Paez-Osuna *et al.*, 1998; Funge-Smith & Briggs, 1998; Beveridge *et al.*, 1997). Information from these studies is reproduced with permission from Elsevier.

The roles of nitrogen are closely linked. The severity of the water quality problems in ponds, and the environmental problems from discharges, is exacerbated by the poor utilization of feed protein: in typical farming systems, only 20 to 25% of the nitrogen from feeds is finally recovered in harvested shrimp (Jackson *et al.*, 2003a; Briggs & Funge-Smith, 1994).

For these reasons, in recent years considerable resources have been directed towards studying the roles of nitrogen in Australian shrimp farms (e.g. Burford & Gilbert, 1999; Burford *et al.*, 2001; Burford & Longmore, 2001; Jackson *et al.*, 2003a) and the fate of shrimp farm nitrogen in the adjacent environment (Burford *et al.*, 2003; McKinnon *et al.*, 2002a,b). This paper reviews two of these recent studies by CSIRO: a whole-farm nitrogen budget (Jackson *et al.*, 2003a), and the use of treatment ponds to remove nitrogen from shrimp farm waste (Jackson *et al.*, 2003b).

### Whole-farm nutrient budget

The study was conducted at a shrimp farm near Cardwell, QLD, in NE Australia (18° 17' S, 146° 03' E) from October 1996 to August 1997. This region is classified as "wet tropics" and has an annual rainfall of 2 to 4 metres. There are no large urban developments in the area and human influence on the marine environment is minimal. The shrimp farm was about 1 km from the shoreline, and received seawater from a mangrove-lined creek (fig. 1). Water discharged from ponds was fed through a network of shallow tributary canals to the main discharge canal, and thence into the receiving creek, without any intermediate treatment

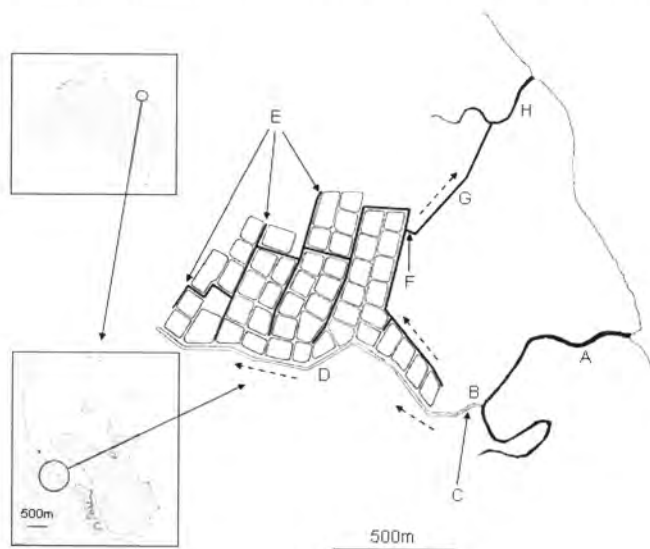


Figure 1 - Study shrimp farm location, layout and sampling locations. A, intake creek; B, intake pumps; C, intake sampling location; D, intake canal; E, tributary discharge canals; F, discharge flow logger and sampling location; G, main discharge canal; H, discharge creek. Dashed arrows indicate water flow.

Reproduced from "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm", by Jackson, Preston, Thompson and Burford, *Aquaculture*, 218, 397-411, (Copyright 2003, with permission from Elsevier).



or sedimentation process. At the time of the study, the farm production cycle was unsynchronized (i.e., crop age varied between ponds, and production continued year-round). Each pond completed between 1 and 2 production cycle(s) per year. *Penaeus monodon* were grown in 48 ponds with an average size of 1.2 ha and average water depth of 1.4 metres.

This study quantified nitrogen inputs to the farm from supply water and feed, and outputs due to discharge water, harvested shrimp, and sediment removal. The study was undertaken over a period of 10 months. Intake and discharge water flow was accurately quantified using data loggers, and water samples were taken weekly to determine total nitrogen (TN) concentration. Farm records were used for feed, harvest and sediment removal data. Jackson *et al.* (2003a) have described the methods in detail.

Ninety per cent of the N entering the farm came from the commercial food (fig. 2A); only 5% originated from intake water. The existing shrimp biomass at the time the study began also contributed 5% to the total N inputs over the study period.

Only 22% of the input nitrogen was recovered in harvested shrimps (fig. 2B). By far the largest proportion over the study (57%) was contained in discharge water, while 14% remained in the sediment, and 4% remained in unharvested shrimps. Only 3% of input nitrogen was unaccounted for, and was assumed to be lost to the atmosphere *via* denitrification and volatilization of ammonia.

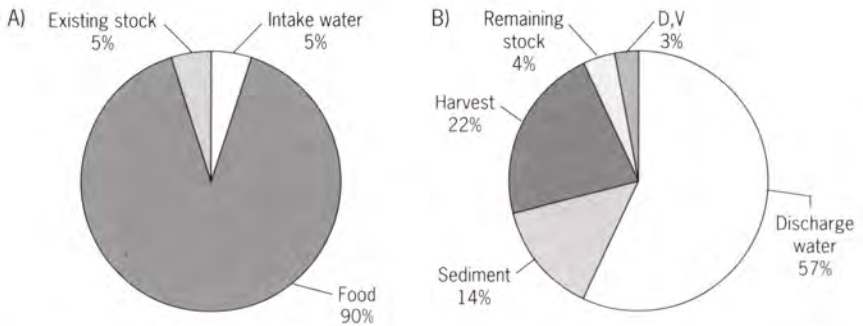


Figure 2 - Percentage nitrogen sources (A) and fates (B). "Existing stock" and "Remaining stock" represent the N contained in shrimp biomass at the start and end of the study respectively. D,V is the estimated loss of N to denitrification and ammonia volatilization. Percentages for the fate of N are related to total input N.

Reproduced from "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm", by Jackson, Preston, Thompson and Burford, *Aquaculture*, 218, 397-411, (Copyright 2003, with permission from Elsevier).

The composition of the discharge water was also examined. All water quality parameters showed substantial variation in concentration, over both hourly and daily time scales (fig. 3). Chlorophyll *a* varied from less than 50  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  to over 300  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Overall, the mean chlorophyll concentration was 88.8  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  in February and 85.8  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  in July-August. TN levels during February were mostly from 1.5 to 3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , with a mean concentration of 1.8  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . During July-August the mean TN was higher, 2.6  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  with values ranging from 2 to 3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

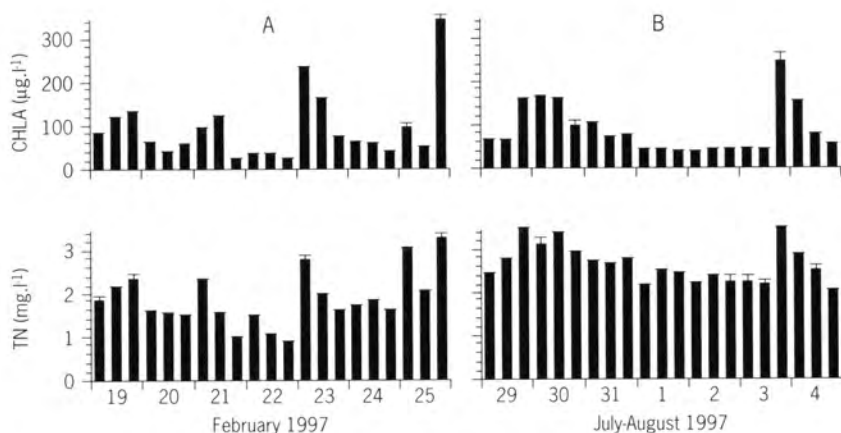


Figure 3 - Concentrations of chlorophyll a (CHLA) and total nitrogen (TN) in farm discharge water, sampled 3 times per day for 7 days. Samples were taken during discharge flow and time of sampling varied. A: 19-25 February 1997; B: 29 July-4 August 1997. Bars indicate SE of 3 replicate samples.

Reproduced from "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm", by Jackson, Preston, Thompson and Burford, *Aquaculture*, 218, 397-411, (Copyright 2003, with permission from Elsevier).

During the intensive sampling period in February, 42.1% of the nitrogen in the discharge water was in the particulate fraction, 20.6% was TAN, while the remainder - 37.2% - was other dissolved forms of N (fig. 4A). During the second intensive sampling period, in July to August, there was a lower proportion of TAN (only 12.0%); and both particulate and other dissolved fractions were correspondingly

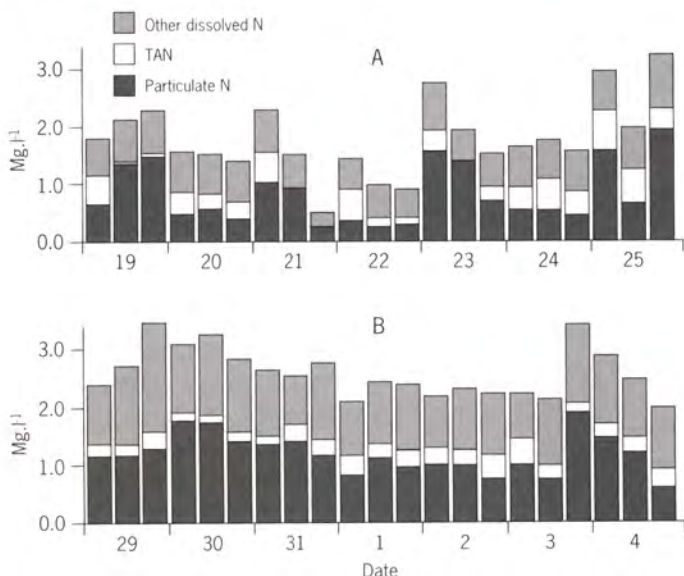


Figure 4 - Concentrations ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) of nitrogen components of farm effluent, sampled 3 times per day for 7 days. Samples were taken during discharge flow and time of sampling varied. A: February 1997; B: July-August 1997.

Reproduced from "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm", by Jackson, Preston, Thompson and Burford, *Aquaculture*, 218, 397-411, (Copyright 2003, with permission from Elsevier).

greater (44.7% and 43.3% respectively; fig. 4B). Both TAN and CHLA were highly variable from one sampling period to the next. Nitrite and nitrate were only assessed during the August sampling period, and very low concentrations were found: mean  $\text{NO}_2\text{-N}$  was  $0.004 \text{ mg.l}^{-1}$ , and mean  $\text{NO}_3\text{-N}$  was  $0.091 \text{ mg.l}^{-1}$ .

### Nitrogen removal using sedimentation ponds

The five sedimentation ponds evaluated in the second study were at two neighbouring shrimp farms located in south Queensland (latitude  $27.7^\circ\text{S}$ ). Five ponds were studied: A1 and A2 at Farm A; and B1, B2 and C at Farm B. The flow rate through the ponds was either monitored by datalogger (at Farm A) or was known from pump specifications (at Farm B). Flow rate, depth and area were used to calculate residence time in each pond. Regular water samples were taken at each pond's intake and discharge, and analysed for TN, total phosphorus (TP) and total suspended solids (TSS). Methods were fully described by Jackson *et al.* (2003b). The mean discharge concentrations of TN, TP and TSS were compared to intake concentration and expressed as percentages, for each of the five sedimentation ponds. These mean percentages were then compared with the residence times of water in the ponds (fig. 5).

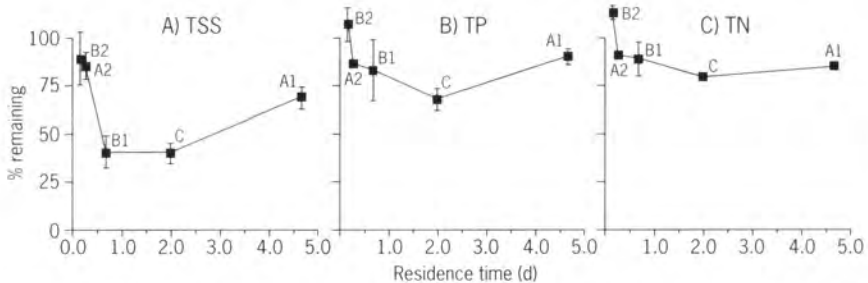


Figure 5 - Percentage of original sedimentation pond intake concentration remaining in discharge water, for five sedimentation ponds, related to residence time of water in the ponds. Each value shown represents the mean  $\pm$  SE of all results calculated for that pond. (A) Total suspended solids (TSS); (B) Total phosphorus (TP); (C) Total nitrogen (TN).

All ponds significantly reduced TSS concentration except for pond B2, where the result was not significantly less than 100%. Both ponds B1 and C had similarly good performance at removing TSS, with only about 40% of the intake TSS concentration remaining in the discharge water (fig. 5A). These ponds had residence times of 0.67 and 1.98 day. Even ponds B2 and A2, with residence times of only 0.15 and 0.25 day, appeared to remove some of the TSS, with discharge concentrations 89 and 80% of intake concentrations, respectively (although the small removal by pond B2 was not significant). Pond A1, with the longest residence time of 4.65 days, performed relatively poorly: its discharge concentration was 69% of intake, higher than ponds B1 and C.

For total phosphorus (TP), the results for ponds B1 and B2 were not significantly less than 100%, while the differences for the other three ponds were highly significant. The best removal rate was for pond C (residence time = 1.98 day), where the discharge concentration was 67% of the intake concentration (fig. 5B). Again, pond

A1, with the longest residence time, had relatively poorer performance. Pond A2, with a residence time of 0.25 day, removed a small quantity of TP from the water. The results for TN were similar to those for TP, although a greater amount (79%) of TN remained in the discharge water for the best-performing pond - again, pond C (fig. 5C). The increase in percentage remaining between 1.98 and 4.65 days, while still apparent, was not as pronounced for TN as it was for TSS or TP. The results for ponds B1 and B2 were not significantly less than 100%, but for the remaining ponds, the reduction in TN was highly significant.

Although sedimentation ponds alone are effective in reducing TSS, we have shown that they are less effective in reducing the concentration of TP and TN. Removal of these nutrients by sedimentation is most effective when the sedimentation ponds are only operated for a short period. Teichert-Coddington *et al.* (1999) examined the performance of a sedimentation pond operated in batch mode to treat a single pond drainage event, and found that 31% of TN was removed during 0.25 day of sedimentation. However when sedimentation ponds are operated for long periods with continual water flow, a significant amount of the organic matter that first settles to the substrate becomes degraded by bacterial activity within the sediment. This causes remineralisation of nutrients, with subsequent release back into the water column. Therefore, although the particulate nitrogen fraction is reduced by flow-through sedimentation, the dissolved fraction may be higher (Preston *et al.*, 2000).

Compared to the relatively modest nitrogen removal rates demonstrated in this and similar studies of sedimentation ponds, substantially better performance is achievable with water discharged from ultra-intensive, zero-exchange shrimp culture. After 7 days residence in earthen sedimentation ponds, TN was reduced to about 30% of initial concentration (Browdy *et al.*, 2001). These ponds were operated in batch mode, and the nitrogen removal was probably achieved through a combination of denitrification and sequestration of organic matter deep within accumulating sediments. This observation is consistent with models developed to explain the dynamics of nitrogen removal in wetlands (Kadlec & Knight, 1996). The 'K-C\*' model, developed using data from over 50 wetlands, predicts that natural treatment systems are relatively ineffective at treating low TN concentrations such as the effluent from traditional shrimp farms (2 to 3 mg TN l<sup>-1</sup>). However the model also predicts highly efficient TN removal (> 50%) from water containing over 20 mg TN l<sup>-1</sup> - such as effluent from ultra-intensive systems (Boyd & Clay, 2002).

Improvements in nutrient removal may also be achieved by the development of systems that are more actively managed than passive sedimentation ponds. For example, periodically removing sedimented material may improve the nutrient-reducing performance of sedimentation ponds, by reducing nutrient remineralisation. Another possible approach is to combine passive sedimentation with active recapture of nutrients through the harvest of a second cultured species. Jones & Preston (1999) demonstrated a promising laboratory-scale system involving sequential treatment by initial sedimentation, then removal of remaining particulates by filter-feeding oysters, and final absorption of dissolved nutrients by seaweed. Trials with shrimp farm effluent reduced TN to 28% and TP to 14% of incoming concentrations.



Although the use of filter feeders or deposit feeders offers the potential to recapture otherwise wasted nutrients, there are significant barriers to widespread adoption of this approach. Scaling from laboratory demonstration to commercial reality is likely to pose substantial engineering and management difficulties. For example, to use oyster polyculture to reduce N loads in the effluent of a shrimp farm by 50%, the annual harvest of oyster meat would need to be greater than the harvest of shrimp from that farm. Therefore, management of the secondary species may divert resources from managing the target species. This problem may be exacerbated if the grow-out period of the additional species differs from that of target species. If the additional species is grown within a recirculation system, mortalities due to disease or other factors may have adverse effects on the primary species. The uncertainty that accompanies the production of any aquaculture species suggests that nutrient removal *via* polyculture may not be the best option for those shrimp farmers seeking predictable and reliable waste removal from pond discharges.

Several attempts have been made to remove excess TN from aquaculture operations by increasing denitrification rates (e.g., Arbiv & van Rijn, 1995). One approach involves computerised management of a reactor, in which critical parameters, including redox potential and rate of addition of a carbon source, are closely controlled (Lee *et al.*, 2000). While such technological solutions may be applicable in fully-recirculating, high-intensity indoor systems where the volume of water and capital costs are manageable, they are unlikely to be successful in outdoor pond-based aquaculture. Similarly, nitrification and denitrification technologies derived from urban waste water treatment systems are unlikely to be economically feasible due to the high volume and comparatively low nutrient concentration of farm discharges (Avnimelech, 1998).

## Conclusions

---

The traditional intensive shrimp farming methods currently practiced in Australia and many other countries are relatively inefficient in terms of N utilisation. The results of our studies agree with previous reports that only about 20% of the N entering the farm is captured in harvested shrimps. A large proportion of the remaining wasted N is discharged into the environment due to regular water exchanges or drain harvesting. Although attempts have been made to reduce environmental impacts by treating this water, particularly in Australia, only a modest reduction in nutrient concentration is typically achieved. Furthermore, the prospects for developing practical systems that significantly improve waste removal or recapture from traditional waste streams do not appear good due to the low nutrient concentration.

On the other hand, newly-developed highly-intensive culture methods, based on low or zero water exchange and the promotion of an in-pond heterotrophic microbial community, have greatly reduced environmental impacts. This is because of the combined effects of improved N utilisation, reduced discharge volumes, and much better prospects for effective discharge treatment. In addition, these systems can be more profitable due to their higher production per unit area.

# Influence des pratiques zootechniques et des paramètres environnementaux sur les performances de production, et sur la formation et le devenir des déchets dans les élevages de crevettes

J.L.M. Martin, H. Lemonnier, P. Garen

Ifremer, Crema L'Houmeau, BP 5, 17137 L'Houmeau, France  
Jean.Louis.Martin@ifremer.fr

## Résumé

Les performances de production (croissance et survie) des crevettes sont sous la dépendance de pratiques et paramètres zootechniques maîtrisés (densités d'élevage, renouvellement de l'eau, origine des post-larves, mode de distribution de la nourriture...), ainsi que de facteurs environnementaux « extra-bassin » non maîtrisés (salinité, température, ensoleillement...). Dans ce travail, nous analysons l'influence de ces deux types de facteurs sur la production de crevettes, ainsi que sur la formation et le devenir des déchets générés par les élevages.

## Abstract

Growth and survival performances in shrimp production are under the dependence of controlled rearing practices (stocking density, water renewal rate, post-larvae origin, way of food distribution...) and of "extra-pond" uncontrolled environmental parameters (salinity, temperature, sunlight radiation...). This work aims to point out the influence of two controlled important rearing techniques (stocking density and pond-water renewal rate) and of one uncontrolled parameter (sunlight intensity) on rearing performances and on the formation and fate of wastes in shrimp ponds.

## Introduction

La production de crevettes a connu une forte expansion au cours des années 1970-1990. Au cours de ce développement, de nombreux problèmes sont apparus dans la plupart des pays producteurs (Thaïlande, Philippines, Indonésie, Équateur...). En général, la décroissance de la productivité des sites aquacoles était imputée à la sur-intensification de l'activité (surface totale de bassins, densités d'élevage, nombre de cycles annuels d'élevage), qui conduisait à une détérioration de l'environnement (Folke & Kautsky, 1992) et à celle de la qualité de l'eau et des sédiments des bassins (Phillips *et al.*, 1993). Il apparaissait donc essentiel pour les producteurs d'assurer une production optimale en même temps que la formation des déchets était minimisée. Pour répondre à ces objectifs, les producteurs ont à leur disposition des éléments de gestion des bassins qui leur permettent d'optimiser les rendements de production. Parmi les éléments influents sur les performances de production, certains sont maîtrisables, tels que les densités d'élevage, les taux de renouvellement d'eau, les modalités de distribution de la nourriture par exemple.

D'autres paramètres, peu ou pas maîtrisables, pouvant influencer sur les performances de production peuvent être cités, tels que la température, la salinité, les radiations solaires. Si l'influence de la température et de la salinité sur les animaux mis en élevage est bien documentée, par contre, peu de choses sont connues concernant l'influence des radiations solaires. Dans ce travail, nous analysons l'influence de différents paramètres sur les performances de production des crevettes, ainsi que sur la formation et le devenir des déchets dans les bassins d'élevage. Pour cela, deux types de paramètres sont considérés. D'une part, des paramètres maîtrisés (densité de stockage et renouvellement de l'eau) et, d'autre part, un paramètre non maîtrisé (ensoleillement).

### **Les performances de croissance, les déchets, la densité de stockage**

Les déchets générés par l'aquaculture, essentiellement des fèces et des granulés non consommés, sédimentent d'abord sur le fond des bassins, conduisant à une accumulation de matière organique dans le sédiment (Boyd, 1992). Une partie des déchets générés par l'activité est rejetée des bassins sous forme particulaire ou dissoute. Il a été montré que la formation des déchets dans les bassins d'élevage dépendait de nombreux facteurs de nature zootechnique, qui étaient contrôlés par les producteurs. C'est ainsi qu'il a été montré une relation inverse entre la croissance des crevettes et la densité de stockage (Ray & Chien, 1992), conduisant à une relation directe entre la densité de stockage et la formation de déchets par kilogramme de crevettes produit (Martin *et al.*, 1998). L'analyse de nombreux élevages effectués en bassin de terre, en Nouvelle-Calédonie, montre une relation entre la densité de stockage et la survie (fig. 1a) ainsi qu'une relation entre la densité de stockage et le facteur de conversion de la nourriture (FCN) (fig. 1b). Notons qu'il s'agit là d'élevages ayant été réalisés dans des conditions zootechniques variables (saison, apport de nourriture, origine des post-larves, durée d'élevage...). Les travaux de Martin *et al.* (1998) au travers d'expérimentations en bassin de terre pour lesquelles l'ensemble des paramètres sont contrôlés et similaires (temps d'élevage, renouvellement de l'eau, période d'élevage...), confirment ces observations. De plus, ces auteurs montrent que la taille des crevettes est inversement proportionnelle à la densité d'élevage (fig. 2a) mais aussi que la quantité de déchets générés par kilogramme de crevettes produit est proportionnelle à la densité de stockage (fig. 2b).

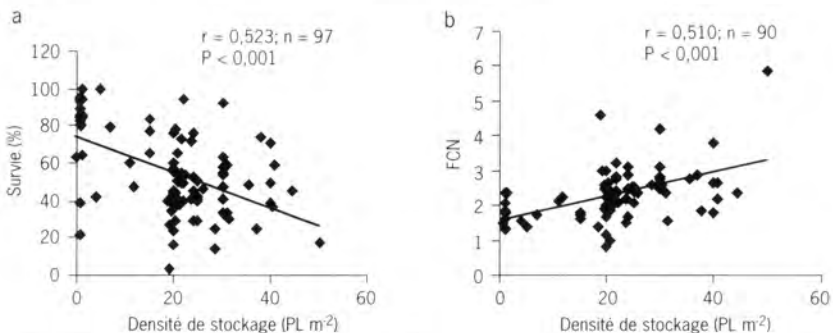


Figure 1 - Relations entre la densité de stockage (PL = post-larves) et la survie (a) et entre la densité de stockage et le facteur de conversion de la nourriture (FCN) (b) dans des élevages effectués en bassin de terre (données issues des fiches techniques de Saint-Vincent, Nouvelle-Calédonie).

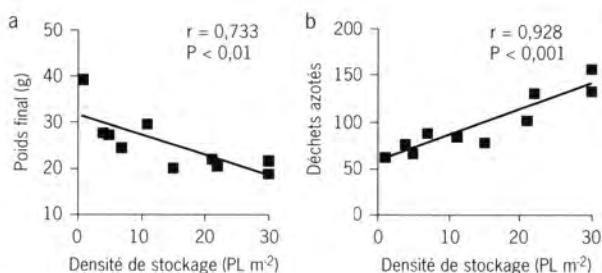


Figure 2 Relations entre la densité de stockage et le poids final des crevettes (a), et entre la densité de stockage et les déchets azotés (b). Ces derniers expriment le nombre de grammes d'azote-déchets générés par kilogramme de crevettes produit (d'après Martin *et al.*, 1998).

L'influence de la densité de stockage sur le devenir des déchets a fait l'objet d'un nombre restreint d'études (Martin *et al.*, 1998 ; Briggs & Funge-Smith, 1994). Il ressort de ces études que l'augmentation de la densité de stockage a pour conséquences de diminuer la proportion d'azote lié au granulé (N-granulé) assimilé par la crevette (diminution du FCN), de favoriser l'accumulation des déchets organiques dans le sédiment, et de diminuer la proportion exportée par l'eau lors des opérations de renouvellement de celle-ci (fig. 3).

En guise de conclusion, il ressort que, lorsque la densité de stockage de crevettes augmente (1) il faut fournir plus de nourriture pour la production d'une même biomasse de crevettes (2) en conséquence, la proportion de déchets générés par kilogramme de crevettes produit augmente, (3) à biomasse produite égale, il faut fournir plus de nourriture pour obtenir des crevettes de même taille et (4) pour une même quantité de déchets produits, la proportion accumulée dans le sédiment augmente, alors que la quantité exportée par l'eau d'évacuation des bassins diminue.

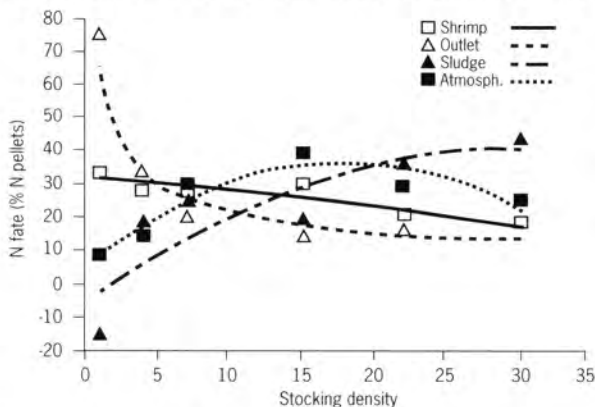


Figure 3 Proportions relatives des déchets azotés dans les différents compartiments du bassin d'élevage en fonction de la densité de stockage (PL = post-larves). % N exprime le pourcentage de déchets de chacun des compartiments par rapport à la quantité totale de déchets formés (d'après Martin *et al.*, 1998).

### Les performances de croissance, les déchets, le renouvellement de l'eau

Le contrôle de paramètres tels que l'oxygène dissous et les blooms algaux dans la colonne d'eau est vital pour un bon fonctionnement de l'écosystème que constitue le bassin d'élevage (Wang, 1990). L'échange d'eau dans les bassins est utilisé par les producteurs pour compenser les pertes par évaporation, pour réajuster les salinités ou pour minimiser l'amplitude des fluctuations d'oxygène. L'échange d'eau apparaît également comme un des moyens essentiels qu'ont les producteurs pour gérer la formation et le devenir des déchets et, en conséquence, pour maintenir la qualité du milieu d'élevage (Allan & Maguire, 1993). En effet, le renouvellement d'eau est utilisé pour



éliminer les déchets organiques et les métabolites minéraux ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_3$ ) en excès pouvant être dommageables pour les crevettes, et pour prévenir les blooms algaux excessifs (Hopkins *et al.*, 1995; Martinez-Cordova *et al.*, 1995).

L'importance des échanges d'eau dans le maintien de la qualité du milieu d'élevage a été très précocement comprise par les éleveurs. De nombreuses études ont été réalisées sur ce sujet qui toutes confirment qu'une diminution du taux de renouvellement de l'eau a pour conséquence une augmentation de la concentration du phytoplancton dans les bassins (Allan & Maguire, 1993; Hopkins *et al.*, 1993) liée à une dilution moindre de l'eau des bassins, et non pas à une augmentation de la production primaire (Lemonnier *et al.*, 2003b). En termes de performances de production, les expérimentations réalisées en saison chaude en bassin de terre sans aération (Lemonnier *et al.*, 2003a) montrent que, tous paramètres étant égaux par ailleurs, les taux de survie et la biomasse finale ne sont pas significativement améliorés avec l'augmentation du taux de renouvellement. Ceci est en accord avec les études de Hopkins *et al.* (1991), Allan & Maguire (1993), Martinez-Cordova *et al.* (1995), qui montrent que le taux de renouvellement de l'eau dans les bassins peut être significativement réduit sans affecter la production de crevettes. Par contre, si la quantité de déchets générés par les élevages n'est pas significativement modifiée en fonction des taux de renouvellement, la nature et le devenir des déchets, et plus particulièrement leur proportion relative, sont affectés par une augmentation des taux de renouvellement d'eau. C'est ainsi que la proportion de déchets accumulés dans le sédiment diminue alors que celle exportée par l'eau augmente avec le taux de renouvellement (fig. 4).

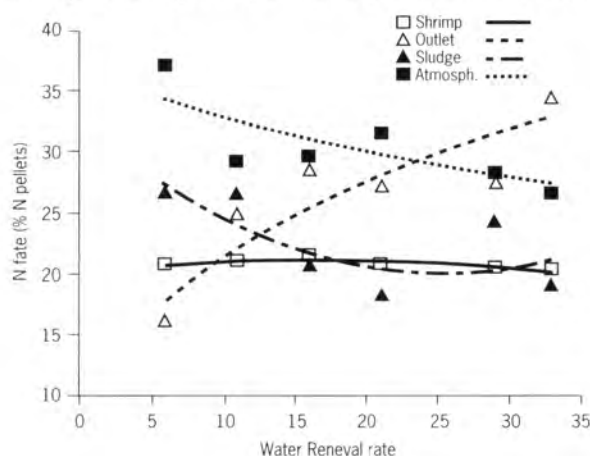


Figure 4  
Proportions relatives des déchets azotés dans les différents compartiments du bassin d'élevage en fonction du taux de renouvellement de l'eau. % N exprime le pourcentage de déchets de chacun des compartiments par rapport à la quantité totale de déchets formés (Lemonnier *et al.*, données non publiées).

### Les performances de croissance, les déchets, le rayonnement solaire

Outre les paramètres de nature zootechnique, maîtrisés par les producteurs, d'autres paramètres, non maîtrisés, semblent devoir agir sur les performances de production et sur la formation et le devenir des déchets. C'est ainsi que des variations saisonnières de performances (croissance et survie) ont été mises en évidence et attribuées, la plupart du temps, à des différences saisonnières de température et/ou de salinité (Teichert-Coddington *et al.*, 1994). Il est admis qu'une croissance satisfaisante du phytoplancton, c'est-à-dire permettant l'assimilation des nutriments générés par l'élevage, depuis le stockage des post-larves et tout au long de l'élevage, est une condition

nécessaire à l'obtention de bonnes performances de production. Il a en effet été montré qu'un déficit de production primaire conduisait à une augmentation des concentrations de sels nutritifs potentiellement toxiques pour les crevettes (Chen & Lin, 1992; Chen & Kou, 1992). La lumière joue un rôle essentiel dans la production primaire (Platt & Jassby, 1976). Burford (1997) montre que la lumière est un facteur limitant la production de phytoplancton dans les bassins d'élevage de crevettes. Madenjian (1990) établit que la production primaire dans les bassins de crevettes est influencée par l'intensité de la radiation solaire. Si le rôle de l'ensoleillement sur la production primaire intra-bassin est donc relativement bien documenté, par contre, peu de choses sont connues sur l'influence de l'ensoleillement sur les performances de production de crevettes. Les travaux de Garen & Martin (2002) font apparaître qu'une diminution de l'intensité lumineuse à la surface des bassins, similaire à celle pouvant se produire en région intertropicale, due à la couverture nuageuse, conduit à une baisse de croissance et de survie des crevettes. Par ailleurs, la diminution de production primaire, consécutive à la diminution de la radiation solaire, a pour conséquence une augmentation de la concentration des sels nutritifs, en particulier ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ )-N, ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ )-N (Burford, 1997). Par ailleurs, Garen & Martin (2002) montrent une augmentation de la concentration de l'azote organique dissous dans l'eau des bassins d'élevage, vraisemblablement liée à l'excrétion des crevettes, mais aussi à la dégradation des fèces et des granulés non consommés. L'analyse des performances de production en relation avec les concentrations observées des différents éléments fait apparaître (Garen & Martin, 2002) que, très vraisemblablement, la diminution des performances de production ne serait pas due à la toxicité des éléments nutritifs minéraux, mais plutôt aux concentrations élevées de matière organique dissoute observées dans les bassins. En effet, la conversion des concentrations d'azote organique dissous mesuré en équivalent matière organique, calculée sur les ratios N/protéine/matière organique dans le granulé, fait apparaître que les concentrations de matière organique seraient supérieures à  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  dans les bassins étant l'objet d'une diminution de radiation solaire (Garen & Martin, 2002). Concernant la formation des déchets, il apparaît que, en relation avec les faibles croissances et les mortalités plus grandes, le taux de conversion de N-granulé est très fortement abaissé dans les bassins non soumis au rayonnement solaire direct.

## Conclusion

L'analyse des différents travaux montre que les éléments de gestion des bassins à disposition des producteurs permettent d'optimiser les performances de production avec une minimisation des déchets. Parmi ces éléments, la densité de stockage apparaît comme un paramètre capital. Son augmentation a pour effet de diminuer les performances de production. De plus, à production égale, les quantités de déchets sont supérieures pour des densités d'élevage élevées. Le renouvellement de l'eau apparaît être plus un élément permettant un assainissement des bassins (dilution des blooms, apports d'oxygène, élimination des déchets...) qu'un élément ayant une action directe sur les performances de production et sur la quantité de déchets formés. Enfin, la quantité de radiation solaire atteignant la surface de l'eau apparaît être un paramètre important dans la réussite des élevages. Ce paramètre pourrait rendre compte des baisses de performances saisonnières observées dans certains pays tropicaux soumis à de fortes couvertures nuageuses prolongées.

## Data management for professional shrimp farm operation

---

C. Jackson, M. Austin

CSIRO, Marine Laboratory, 233 Middle Street, Cleveland, QLD 4163, Australia  
Chris.Jackson@csiro.au

---

### Abstract

---

Pondman 2, a new software package designed for modern Windows operating systems was developed to improve the ability of shrimp farmers to record, analyse and use data. This will allow them to manage their operations more effectively, and make more sophisticated management decisions. The planning and development of Pondman 2 were done in continuous consultation with shrimp farmers, to ensure it meets their needs. Pondman 2 is now in use at the majority of Australian shrimp farms, and international uptake is increasing.

In addition to the benefits for farmers, the software also provides researchers with high-quality commercial data in a consistent format for research into production, disease control and environmental impacts. The use of this software also allows more effective extension and consulting services. Examples of such applications will be shown.

### Résumé

---

Pondman 2, un nouveau logiciel sous environnement Windows a été développé pour améliorer les possibilités, pour les aquaculteurs, d'enregistrer, analyser et utiliser les données. Ceci leur permettra de gérer leur exploitation de façon plus efficace et de prendre des décisions de gestion plus perfectionnées. La conception et le développement de Pondman 2 ont été faits en lien permanent avec les producteurs afin de s'assurer de couvrir leurs besoins. Pondman 2 est maintenant utilisé dans la plupart des fermes australiennes et la demande internationale est en hausse.

Parallèlement aux avantages ainsi offerts aux producteurs, le logiciel permet aux chercheurs la récupération de données de qualité dans un format standardisé pour les travaux sur la production, le contrôle des pathologies et les impacts environnementaux. Des exemples d'application ont été présentés pendant le colloque Styli 2003.

### Introduction

---

Shrimp farm managers need to record and analyse large amounts of information to be able to make effective decisions in day to day farm operation. Despite this, a 1998 survey of data-management activities at Australian shrimp farms showed that for most categories of data, only about half the farmers kept computerised records, while the remainder used paper log books. Spreadsheets were the main software used for computerised record-keeping, therefore data analysis capabilities remained limited. The survey also assessed the types of data recorded. All farmers regularly recorded water quality, feed, and stocking; most also recorded harvest, water exchange, therapeutic treatments, and survival rates. Only about half of the respondents kept detailed records of aeration.



Pondman 2, a new software package designed for modern Windows operating systems was developed to improve the ability of shrimp farmers to record, analyse and use data.

### **Environmental and zootechnical data used in shrimp farm management**

---

A diverse range of data needs to be recorded in the management of a shrimp farm. These data are recorded at widely varying intervals – from several times per day, to once per crop or even less frequent. For example:

- water quality (temperature, DO, pH, secchi, salinity, ammonia, chlorophyll, TSS...). Recording frequency varies according to farm requirements. Some operators always take some of these measurements twice daily, while other are taken more intermittently;
- pond characteristics (shape, area, depth). Recorded once only;
- stocking, transfer, harvest. Recorded intermittently as events occur. Stocking, harvest: one or more per season per pond. Between-pond transfers: may be none recorded at all, or alternatively some;
- production monitoring: biomass, average size. Often recorded weekly;
- feed quantity, type: recorded several times per day.

These data need to be combined in various ways to create meaningful information for farm managers. For example:

- survival and stocking density: needs data about stocking, transfer, harvest, biomass, average size;
- FCR: needs data about cumulative feed applied, current biomass;
- pond water quality management: usually done by visual assessment of water quality trends in parameters such as DO and pH, considered together with stocking intensity, feeding and temperature over the same time period.

### **Pitfalls of spreadsheets**

---

The temptation for many farmers is to use spreadsheet software for this task. At first this seems like a good solution - the data are easy to enter, and calculations are easy to programme. However using spreadsheets usually breaks three fundamental principles of effective data management:

- There should be only one primary copy of the data. Using this principle ensures that calculations and reports are always based on correct data, and there is no chance that the "wrong copy" gets updated or that calculations are based on outdated information.

The base data (raw data or original records), from which important results are derived, should be held in one place only.

Calculations and reporting should be derived from the primary copy of the data every time. If the calculations require several steps, each time the report is done the entire process - going right back to the primary data - should be completed. If intermediate results are computed during this process, they should be discarded once the report is produced, and not used as a convenient starting point next time. When data is added or edited, these operations should be done on the primary copy.

Copies may (and should) be made for backup and archiving, but it should always be clear which is the "primary copy" of the data.

When spreadsheets get used for complex data reporting, it is inevitable that parts of the data get copied into different parts of the spreadsheet - or, even



worse, into different spreadsheets. The use of "paste values" is an indication that multiple copies of data are being made. Then, when new data are added or when old data is edited, it becomes necessary to ensure that all copies of the data are kept in synchrony. This can quickly grow to be an unmanageable task.

Spreadsheets are also likely to break the other two important guidelines - although, with careful design including cell protection and liberal use of named cells, these problems can be partly addressed (Rajalingham *et al.*, 2000; Kreie & Pendley, 1998).

- Data entry and editing should be separated from reporting. This principle reduces the chance that the data can get corrupted. Unless carefully designed, spreadsheets intermingle data with results on the same screen. A user who is only interested in running some calculations can, very easily, corrupt raw data.
- Calculations should be tested carefully then secured. Studies show that from 1 to 3% of spreadsheet cells contain errors (Panko, 2000). This is high compared to programming languages because spreadsheets do their calculations by formulae that are only visible when selected, because these formulae are typically present throughout a spreadsheet (mixed with data and results), and because spreadsheet formulae can be very cryptic if using un-named cell references. It is also easy for a user to inadvertently change a formula and for that error to go undetected.

### **Pondman 2: dedicated software for shrimp farm management**

---

Recognising the need for a shrimp farm data system that overcomes the problems of spreadsheets, CSIRO has developed Pondman 2. Pondman 2 is built on a dedicated database engine, which allows appropriate data from various sources to be combined in reports.

Features of Pondman 2 include:

- a wide range of data analysis tools including text and graphic reports on feed, FCR, stocking density, water exchange, aeration, water quality and other parameters, both farm-wide and for individual ponds. Reports include time-series, current status, and end of crop;
- convenient graphical display for selecting ponds and recording aeration layout.
- direct data download from water-quality instruments;
- powerful data management including full and incremental backup, and selective retrieval;
- comprehensive data-checking ensuring internal consistency, and minimising errors;
- convenient and flexible data entry: automatic generation of default values; layout of forms can be customised; field names can be changed.

The planning and development of Pondman 2 were done in continuous consultation with shrimp farmers, to ensure it meets their needs. Pondman 2 is now in use at the majority of Australian shrimp farms, and international uptake is increasing. A series of slides illustrating features of Pondman and examples of its use were shown in the presentation.

### **Additional benefits: use in research**

---

In addition to the benefits for farmers, the software also provides researchers with high-quality commercial data in a consistent format for research into production, disease control and environmental impacts. The use of this software also allows more effective extension and consulting services.

# Mesure en cytométrie en flux du picoplancton autotrophe et hétérotrophe : un outil de contrôle de la qualité des eaux de fermes d'élevage de crevettes

C. Courties, G. Boeuf

Laboratoire Arago, université Pierre & Marie Curie-CNRS, BP 44, 66651 Banyuls-sur-Mer Cedex, France  
courties@obs-banyuls.fr

## Résumé

La cytométrie en flux est très rarement utilisée sur des sites aquacoles. Pourtant, elle est l'un des outils les plus appropriés pour suivre les populations phytoplanktoniques, bactériennes ou virales qui se succèdent et se développent rapidement dans les eaux des bassins d'élevage. Elle est proposée ici pour mesurer les évolutions spatio-temporelles de leur démographie et de leur diversité au cours de la croissance de la crevette *Litopenaeus stylirostris* dans les élevages de Nouvelle-Calédonie où parfois des mortalités sont observées. Cette technique, maintenant servie par des matériels simples et peu coûteux, est facilement utilisable à proximité de sites aquacoles, permettant des mesures avec des échantillons fraîchement prélevés ou fixés. Associée aux autres paramètres environnementaux généralement mesurés sur les sites aquacoles, elle contribuera indéniablement à une meilleure compréhension des fluctuations de l'environnement de l'élevage et, ainsi, à une meilleure maîtrise des interactions avec l'extérieur, tout ceci étant nécessaire à une aquaculture durable et de qualité.

## Abstract

Flow cytometry is rarely used on aquaculture sites. However, the technique is one the most efficient to monitor microbial populations which quickly change in the waters bathing the farm enclosures. Flow cytometry is proposed here to measure in space and time the diversity and abundance of different cell types (microalgae, bacteria or viruses) in shrimp farms of New Caledonia where, sometimes, mortalities are observed. The development of flow cytometry technology has produced simpler and cheaper machines that can be operated close to the aquaculture sites for the measurement of fresh or fixed samples. In combination with environmental analyses of the water supply and the farm enclosures, flow cytometric data will undoubtedly play an important role in understanding the environmental fluctuations of aquaculture farms. Ultimately, this will improve farm management and permit lasting and quality aquaculture production.

## Introduction

L'aquaculture mondiale est en pleine évolution et les productions globales ont augmenté de 160 % sur 10 ans (45,7 millions de tonnes en 2000, produits végé-

taux et animaux confondus; FAO, 2002). Cette activité dépend directement des ressources naturelles comme l'eau, les sols, la nourriture et, dans certains cas, les juvéniles et reproducteurs. Dans le concert mondial des productions, la crevetticulture a pris un essor certain depuis une vingtaine d'années dans la zone intertropicale. La production mondiale a été multipliée par 7 entre 1980 et 1995 (Naylor *et al.*, 1998), atteignant un million de tonnes en 2000 (FAO, 2002). Mais, c'est une activité aquacole qui subit des fluctuations considérables selon les zones et les modes de production. Diverses pathologies, dont des viroses récurrentes, constituent un puissant frein au développement et il apparaît clairement que ces problèmes sont liés à une gestion encore balbutiante de l'environnement des élevages (Naylor *et al.*, 1998; Boeuf, 2002). Concernant le suivi de la qualité des eaux dans les systèmes aquacoles, il est nécessaire de renforcer, voire d'instaurer, ces contrôles, particulièrement à propos du compartiment microbien qui n'y est que très rarement étudié, alors qu'il est l'un des meilleurs descripteurs du niveau trophique des eaux. La cytométrie en flux, technique de mesure individuelle et multiparamétrique de cellules en suspension dans un liquide, est l'outil approprié permettant leur dénombrement et leur caractérisation rapide. Cette technique, utilisée avec succès en océanographie depuis une vingtaine d'années, est à l'origine de la découverte et de l'étude de grands groupes cellulaires picoplanctoniques ( $< 2 \mu\text{m}$ ) dont le rôle s'est avéré fondamental dans les écosystèmes marins (Chisholm *et al.*, 1988; Courties *et al.*, 1994); et l'on peut dire que bon nombre d'études actuellement conduites dans les écosystèmes aquatiques font appel à la cytométrie en flux (Legendre *et al.*, 2001). Récemment, cette technique a beaucoup évolué vers des appareils moins coûteux, simples d'utilisation et plus sensibles (Roberts, 2003). Elle est donc proposée sur les sites de production en Nouvelle-Calédonie pour (1) caractériser et dénombrer les cellules de l'ultraplancton autotrophe et les bactéries hétérotrophes dans les eaux d'élevage et pour (2) suivre l'évolution de ces peuplements à partir de séries de mesures qui, rapidement obtenues et associées aux autres paramètres environnementaux, aideront à la gestion de l'eau des fermes aquacoles.

#### **La cytométrie en flux : une aide à la compréhension des interactions ferme-environnement**

La compréhension puis le contrôle des interactions ferme-environnement passent en partie par la connaissance des compartiments physico-chimiques et biologiques. Généralement, on mesure en routine dans les fermes la température et la salinité de l'eau, l'oxygène dissous disponible, parfois le pH. On établit la présence d'éléments liés à la dégradation des chaînes azotées des nutriments alimentaires. On suit certaines productions organiques... mais les organismes microbiens sont exclus de ces mesures. Or, ils sont nombreux, très actifs dans les eaux souvent chaudes baignant les systèmes aquacoles et ce sont eux qui permettent d'expliquer une grande partie des fluctuations de la qualité de l'environnement. La cytométrie en flux est l'outil idéal pour les détecter et les dénombrer puisqu'il s'agit d'une technique d'analyse individuelle et multiparamétrique des cellules en suspension dans un liquide (fig. 1).

En océanographie, elle a trouvé sa pleine justification dans l'étude du picoplancton marin autotrophe constitué de cellules très abondantes dont la taille est inférieure à 2 µm. Ces cellules sont très difficiles à observer et à identifier en microscopie et beaucoup d'entre elles sont encore inconnues (Blanchot *et al.*, 1998; Moon-van der Staay *et al.*, 2001; Moreira & Lopez-Garcia, 2002; Vaulot *et al.*, 2002). Dans un cytomètre en flux, leur détection et leur énumération y sont rapides, 1 à 10 minutes suffisent pour analyser un volume d'échantillon variant de 10 à 900 µl. Mais la cytométrie en flux n'est pas limitée au seul dénombrement des cellules. Elle fournit aussi une analyse multiparamétrique assurant, pour chaque cellule présente dans l'échantillon, l'acquisition simultanément de plusieurs de ses propriétés, tels les tailles apparentes, les contenus apparents en pigments photosynthétiques et ceux en acides nucléiques (fig. 2). Généralement, ce sont 3 à 5 propriétés par cellule qui sont simultanément mesurées à des cadences d'analyse variant de quelques dizaines à plusieurs milliers de cellules chaque seconde. La comparaison et la compilation de ces diverses propriétés cellulaires permettent alors de caractériser chaque catégorie de cellules autotrophes (phytoplancton, Li, 1990) et hétérotrophes (bactéries, Gasol & del Giorgio, 2000), et les virus libres (Marie *et al.*, 1999). Les cellules du phytoplancton sont les plus faciles à mettre en évidence grâce aux propriétés de fluorescence des pigments naturels qu'elles contiennent (chlorophylle et phycoérythrine). Ainsi, un cytogramme typique d'un échantillon marin côtier (fig. 3) sera constitué de populations picoplanctoniques comprenant des cyanobactéries (à double pigmentation chlorophylle et phycoérythrine) généralement dominantes ( $10^2$  à  $10^5$  ml<sup>-1</sup>), de picoeucaryotes, contenant de la chlorophylle, moins abondants ( $10^2$  à  $10^4$  ml<sup>-1</sup>) et de divers groupes de nanoplancton chlorophyllien de taille comprise entre 5 et 20 µm peu abondants ( $10^1$  à  $10^3$  ml<sup>-1</sup>), avec parfois parmi eux des cryptophytes, groupe d'eucaryotes

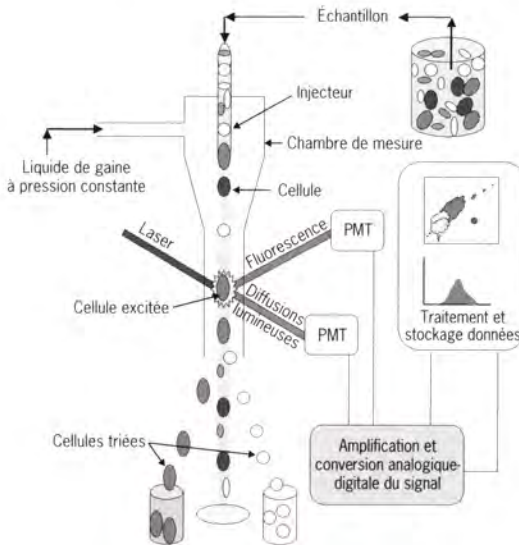


Figure 1  
Schéma de principe des mesures en cytométrie en flux.

Dans un cytomètre en flux, les cellules de l'échantillon en suspension dans l'eau passent individuellement devant un rayonnement lumineux (ici un laser Argon émettant à 488 nm). Les cellules ainsi excitées produisent des signaux de diffusions lumineuses et de fluorescences relatives à certaines de leurs propriétés. Ces signaux sont séparés par des filtres optiques, collectés par des photomultiplicateurs (PMT). Là, chaque photon émis est transformé en signal électrique, amplifié puis converti par des convertisseurs analogiques-numériques afin d'être stocké sur ordinateur et interprété. Leur représentation se fait sous forme monoparamétrique (histogramme) ou bi-paramétrique (cytogramme). Certains cytomètres en flux ont une fonction de tri de cellules permettant d'isoler physiquement une à quatre population(s) différente(s).



autotrophes possédant eux aussi une double pigmentation qui facilite leur détection. Pour les bactéries, comme pour les virus, qui ne possèdent pas de pigments fluorescents, un marquage préalable des échantillons est nécessaire pour les mettre en évidence. Divers fluorochromes sont utilisés, qui ont pour caractéristique commune de marquer les acides nucléiques et d'être simples d'emploi (Robertson & Button, 1989; Monger & Landry, 1993; Li *et al.*, 1995; Marie *et al.*, 1996; Lebaron *et al.*, 1998; Troussellier *et al.*, 1999).

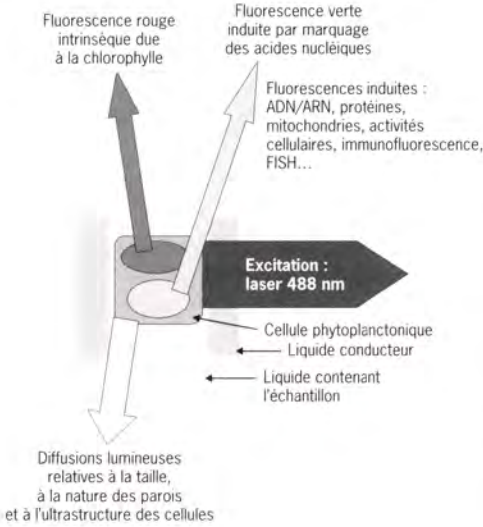


Figure 2  
Schéma des propriétés cellulaires analysées en cytométrie en flux. Les signaux de diffusions lumineuses émis par une cellule excitée sont relatifs à sa taille, la nature de sa paroi, son ultrastructure et sa forme. Les signaux de fluorescence sont de deux sortes. Ceux intrinsèques, qui correspondent à la présence de pigments naturels chez les végétaux, comme ici la chlorophylle émettant en rouge (ou la phycoérythrine émettant en orange) après une excitation en bleu. Ceux extrinsèques, résultats de marquages spécifiques de molécules, de structures ou d'activités cellulaires, qui accroissent les capacités de discrimination des cellules, comme c'est le cas ici avec le marquage des acides nucléiques du noyau de la cellule.

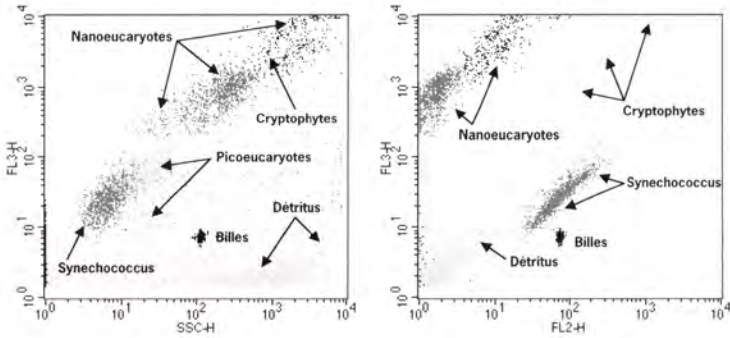


Figure 3 - Cytogramme d'un échantillon marin méditerranéen. L'analyse multiparamétrique des propriétés de taille apparente (SSC-H) et de fluorescence rouge (FL3-H) et orange (FL2-H) des cellules d'un échantillon marin permet de discriminer plusieurs types cellulaires phytoplanctoniques : les picoeucaryotes (< 2 µm), plusieurs groupes de nanoeucaryotes plus ou moins abondants, parmi lesquels sont les cryptophytes mieux discriminés sur la base de leur double contenu pigmentaire émettant à la fois une fluorescence rouge (FL3-H; due à la chlorophylle) et une fluorescence orange (FL2-H; due aux biliprotéines) tout comme le groupe des cyanobactéries de type *Synechococcus*. Un standard interne (billes de 1 µm) est simultanément analysé afin de normaliser les propriétés des cellules discriminées, de comparer les différents types cellulaires d'un même échantillon, mais aussi de suivre leurs évolutions spatio-temporelles sur un site donné.

La rapidité d'analyse caractérisant l'utilisation d'un cytomètre, alliée au faible encombrement de certaines machines facilite leur utilisation sur les sites d'échantillonnage et favorise la réalisation de longues séries de mesures (Troussellier *et al.*, 1993, Li & Dickie, 2001), dans le temps et/ou dans l'espace (Veldhuis *et al.*, 1997; Zubkov *et al.*, 2000), parfois en couplant la technique à un échantillonneur automatique (Jacquet *et al.*, 1998), ou encore grâce à un cytomètre installé *in situ* dans une bouée (Dubelaar & Guerritzen, 2000). Toutefois, pour des zones difficiles d'accès, comme peuvent l'être parfois les fermes aquacoles, des techniques éprouvées de conservation permettent de stocker au froid les échantillons fixés pour une analyse différée (Vaulot *et al.*, 1989; Troussellier *et al.*, 1995), ce qui s'avère utile pour des études spatio-temporelles plus approfondies de ces sites. Une des conséquences intéressantes du mode d'analyse individuel, multiparamétrique et rapide de la cytométrie en flux est que l'on dispose d'un nombre très

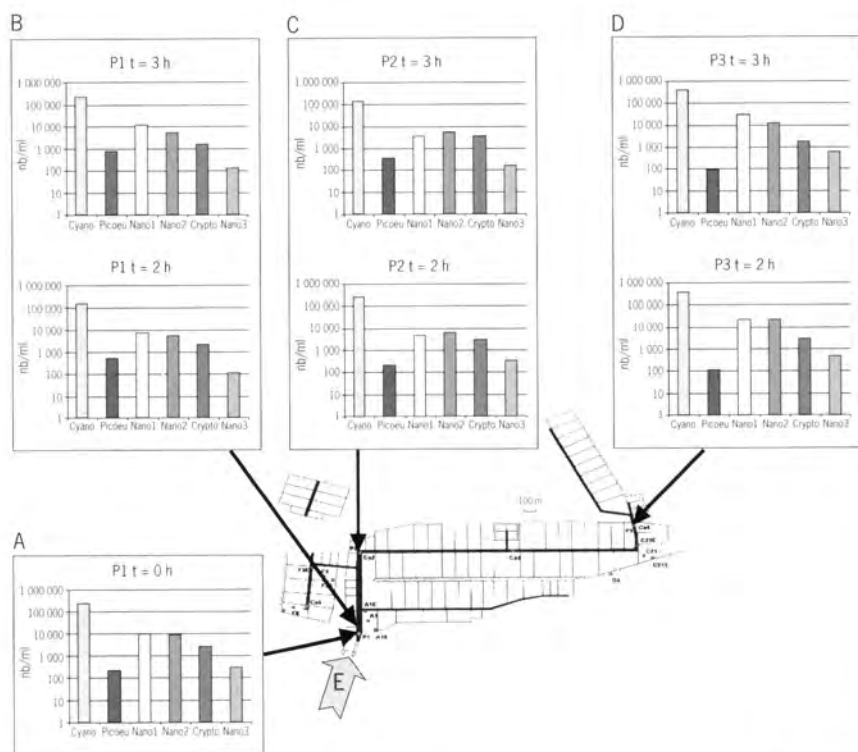


Figure 4 - Abondances et diversité du phytoplancton pendant le pompage de l'eau de la baie de Baly dans la ferme Aquamas de Soalala (Madagascar, Canal du Mozambique, février 2001). Cette ferme est implantée en bordure de mangrove estuarienne. L'eau baignant la ferme est pompée (E) en profondeur à chaque cycle de marée montante et répartie dans les bassins d'élevage grâce à un grand canal principal la traversant. Le premier prélèvement en (A) correspond à l'eau pompée dans la baie et entrant dans le canal. La cytométrie y révèle la présence de 6 types cellulaires, des cyanobactéries, des picoeucaryotes et 4 groupes de nano-plancton dont l'un est constitué de cryptophytes (Nano 1, 2, 3 et Crypto). Les cyanobactéries dominent le peuplement ( $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ), les picoeucaryotes sont les moins abondants ( $200 \text{ ml}^{-1}$ ), les autres eucaryotes variant de  $10^3$  à  $10^4 \text{ ml}^{-1}$ . En (B), en (C) et en (D), station proche du terme du grand canal, les prélèvements réalisés 2 et 3 heures après le début du pompage, montrent qu'il n'y a aucune différence avec le prélèvement (A) en termes d'abondances et de diversité du phytoplancton : les propriétés biologiques de l'eau circulant dans le canal restent stables tout au long de son transit d'environ 3 kilomètres. Elle sera donc distribuée ainsi dans chacun des bassins d'élevage de la ferme.

élevé de données qui décrivent précisément les propriétés de tous les groupes cellulaires autotrophes présents dans l'échantillon, ceci dans la limite d'une échelle de taille cellulaire comprise entre 0,2 et 50  $\mu\text{m}$ . Ces données, statistiquement solides, conduisent à la mise en évidence immédiate de la composition des peuplements analysés, première étape de la connaissance des peuplements microbiens de l'échantillon. De fait, elles permettent ensuite d'accéder à la « diversité cytométrique » du (ou des) peuplement(s) analysé(s) (Li, 1997 ; Legendre *et al.*, 2001), diversité qui s'avère particulièrement utile pour le suivi spatio-temporel de ces peuplements. Ce sera le cas lors de l'étude de l'environnement d'une ferme aquacole, pour celle de ses canaux d'alimentation (cf. exemple de la fig. 4) ou des bassins en cours de production afin de s'assurer de la qualité biologique des eaux y circulant (cf. l'exemple de la fig. 5). De telles mesures pourraient être envisagées en Nouvelle-Calédonie sur les sites de production de la crevette *Litopenaeus stylirostris* afin de préciser la nature et le rôle des organismes unicellulaires photosynthétiques très abondants ( $10^6$  à  $10^7$   $\text{ml}^{-1}$ ) qui ont été mis en évidence en 1997 sur les sites de Ouano et de Sea Farm (J. Blanchot, IRD, comm. pers.).

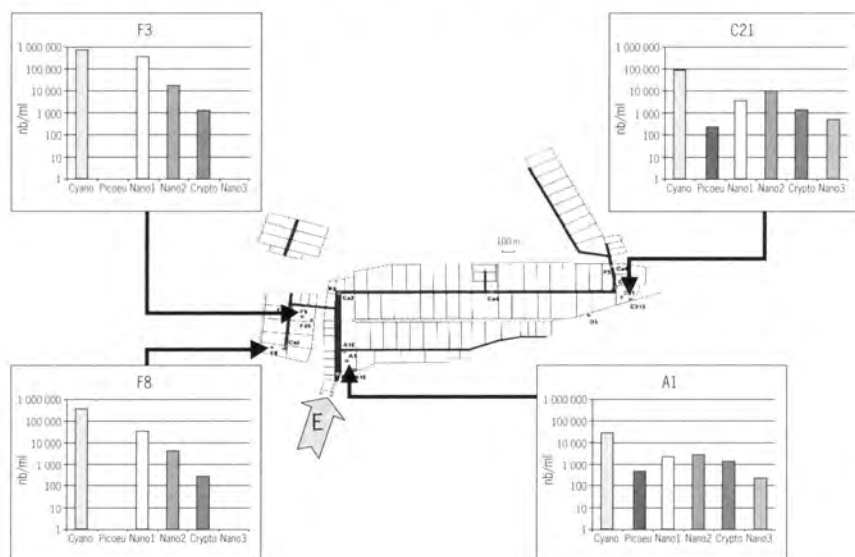


Figure 5 - Abondances et diversité du phytoplancton dans les bassins de production de crevettes *Penaeus monodon*. Quatre bassins ont été échantillonnés en fonction de leur situation géographique par rapport à l'arrivée de l'eau de la baie : en A1 et en C21, aux 2 extrémités du canal principal, en F3 et F8 sur 2 bassins périphériques desservis par un canal secondaire. La structure des peuplements phytoplanctoniques mesurés en A1 et C21 est semblable à celle décrite dans le canal principal (cf. fig. 4). On note seulement un doublement des abondances des cyanobactéries dans le bassin C21, le plus éloigné. L'eau baignant ces bassins conserve donc ses propriétés initiales, ce qui peut être interprété comme un élément positif pour l'élevage. En revanche, ce n'est pas le cas des bassins F3 et F8, plus excentrés par rapport à la circulation générale, qui montrent une dominance très accrue des cyanobactéries (proche de  $10^6$   $\text{ml}^{-1}$ ), et un développement important du groupe Nano1 (entre  $10^4$  et  $10^5$   $\text{ml}^{-1}$ ). Mais, c'est la disparition de 2 autres types cellulaires, les picoeucaryotes (< 2  $\mu\text{m}$ ) et le groupe Nano3 constitué des plus grandes cellules, qui apparaît comme le fait le plus marquant. Le développement privilégié d'un ou 2 types cellulaires, associé à une chute de la diversité cytométrique, indique une dégradation importante des conditions environnementales. L'eau dans ces bassins a perdu ses propriétés biologiques initiales. Probablement, elle n'y circule plus correctement, ce qui induit des conditions proches d'un confinement. Des accroissements importants des abondances bactériennes ( $10^6$  à  $10^7$   $\text{ml}^{-1}$ ) ainsi que la présence de virus ont été mesurés dans ces bassins (Courties, non publié), confirmant l'instauration de conditions trophiques particulières pouvant avoir des conséquences négatives sur la production des crevettes.

Dans un second temps, ces données sur les tailles apparentes des cellules, leurs fluorescences moyennes liées aux contenus pigmentaires ou aux contenus en acides nucléiques, pourront être utilisées pour évaluer les biomasses relatives des peuplements phytoplanctoniques (Jonker *et al.*, 1995; Cailliau *et al.*, 1996; Charpy & Blanchot, 1998) ou bactériens (Robertson *et al.*, 1998; Troussellier *et al.*, 1997; Bouvier *et al.*, 2001) dans les eaux considérées. Ces informations sont importantes pour estimer rapidement la charge trophique d'un milieu ou examiner, par exemple, à quelle vitesse il évolue vers un état d'eutrophisation qui peut s'avérer préjudiciable pour un élevage. Enfin, ces mesures cytométriques peuvent encore être interprétées afin de détecter l'activité de certaines cellules ou de groupes cellulaires plus ou moins complexes. C'est par exemple le cas pour les bactéries marines dont on sait maintenant, grâce à la cytométrie en flux, qu'elles se distribuent généralement en deux groupes cellulaires lorsqu'on considère leurs propriétés de taille et de fluorescence liée aux acides nucléiques: les bactéries « HNA » (pour High Nucleic Acid content) et les bactéries « LNA » (pour Low Nucleic Acid content). Les bactéries LNA ont des niveaux d'activité faibles, voire nuls, en termes de synthèse de protéines, alors que les HNA présentent de forts taux d'activité de synthèse et sont responsables de la production bactérienne (Servais *et al.*, 1999, 2003; Lebaron *et al.*, 2001, 2002). Sur les sites de Ouano et de Sea Farm en Nouvelle-Calédonie, des mesures globales d'incubation et d'incorporation à la thymidine tritiée ont montré un accroissement considérable ( $\times 6$ ) des activités bactériennes dans les bassins en cours de production crevette (Torréton, IRD, comm. pers.). Ces activités sont peut-être liées à de très fortes concentrations de bactéries pas encore mesurées dans ces bassins et dont l'impact en termes de qualité des eaux et de qualité des crevettes produites n'est pas précisé. Il semble important de pouvoir estimer, dans ces milieux d'élevage évoluant rapidement, ces concentrations de bactéries et la part de celles présentant une activité de synthèse forte qui ont un impact sur le niveau trophique et la physico-chimie des eaux. Ces mesures d'abondance sont réalisables en cytométrie en flux à la suite d'un simple marquage des échantillons à l'aide de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques (Lebaron *et al.*, 2001, 2002). Parallèlement à ces mesures, on peut envisager de compléter l'information « abondance globale » en recherchant au sein du peuplement bactérien les cellules que l'on soupçonne être à l'origine de certaines pathologies ou mortalités dans les bassins d'élevage. En effet, quand les méthodes culturales classiques s'avèrent longues ou inefficaces, la cytométrie en flux peut aider à la discrimination précoce de pathogènes *in situ* grâce à des méthodes de marquages par immunofluorescence (McClelland & Pinder, 1994; Lemarchand *et al.*, 2001) ou par sondes moléculaires. Dans le cas de la recherche de ces cellules pathogènes ou toxiques, souvent peu abondantes, une autre technique cytométrique, la cytométrie en phase solide (ou à balayage) pourra également être utilement mise en œuvre (Pougnard *et al.*, 2002; Lemarchand & Lebaron, 2003).



## Conclusion

---

En Nouvelle-Calédonie, la présence d'un cytomètre en flux sur les sites aquacoles devrait en premier lieu faciliter la connaissance des peuplements microbiens autotrophes et hétérotrophes, pico- et nanoplanctoniques qui sont mal connus aujourd'hui. En période de crise, la technique permettrait aussi le *monitoring* quotidien de ces peuplements en enregistrant les fluctuations à haute fréquence des microorganismes, méthode déjà pratiquée dans l'industrie pharmaceutique pour le contrôle de la qualité des eaux de procédés industriels (Brailsford & Jones, 1999; Gapp *et al.*, 1999). Par ailleurs, sur un site aquacole, l'outil peut encore être affecté à d'autres tâches. Il peut aider à mesurer *in situ* l'impact global d'organismes filtreurs (Cucci *et al.*, 1989; Desloup-Paoli *et al.*, 2002; Jordana *et al.*, 2001), ou à quantifier la capacité de broutage d'organismes en élevages expérimentaux (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1991; Bougrier *et al.*, 1997). De plus, sur un plan plus fondamental à ce jour, la caractérisation et la mesure des variations d'abondance des hémocytes chez l'huître ou la crevette, qui ont été initiées au laboratoire Arago en partenariat avec la DRIM (Montpellier) et le laboratoire Ifremer de la Tremblade, constituent une voie complémentaire à l'étude de la réponse immunitaire des individus soumis aux différents stress environnementaux au cours de leur élevage. Enfin, à propos de la gestion de tels outils, on note que leurs coûts d'achat et de maintenance diminuent fortement; il est même possible de trouver des appareils d'occasion parfaitement reconditionnés, fiables et bien adaptés aux mesures en milieu aquatique. L'utilisation au quotidien de ces appareils s'est beaucoup simplifiée, rendant plus facile la formation des biologistes affectés à leur fonctionnement (Roberts, 2003). Nous pensons donc que ces méthodologies apparaissent tout à fait adaptées à l'étude de l'environnement aquacole et qu'en crevetticulture, activité pour laquelle ces questions sont particulièrement délicates, elles semblent remarquablement pertinentes. Des programmes de recherche et de validation impliquant le laboratoire Arago pourraient donc être rapidement engagés avec les équipes de Nouvelle-Calédonie en relation avec les sites de production.

## Remerciements

Nos remerciements vont à l'Ifremer et au Territoire de la Nouvelle-Calédonie pour notre participation au colloque Styli 2003 à Nouméa, à Guy Besnardeau, PDG du Groupe Réfrigépêche (Madagascar) pour le financement de l'étude en cytométrie en flux du site Aquamas de Soalala, à Olivier Avalle, directeur du site et à son personnel pour leur assistance sur la ferme, à François Moreno et Olivier Guélorget (université de Montpellier II) pour l'échantillonnage.

# Évolution des paramètres physico-chimiques et biologiques de bassins d'élevage de crevettes soumis à deux régimes de renouvellement en eau avant et pendant des mortalités de type « Syndrome 93 »

J. Lefèvre, H. Lemonnier, C. Goarant, J. Blanchot

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Hugues.Lemonnier@ifremer.fr

## Résumé

Le Syndrome 93 est une pathologie qui affecte les élevages de crevettes de Nouvelle-Calédonie pendant la phase de grossissement aux inter-saisons. Dans le cadre d'une recherche des mécanismes qui contribuent à son déclenchement, une attention particulière a été accordée à l'évolution physico-chimique et biologique du milieu d'élevage. Une expérimentation a été conduite de février à mai 1997 dans deux groupes de bassins soumis à deux taux de renouvellement. La maladie s'est déclarée simultanément dans tous les bassins après une chute de température au moment où l'eau atteignait une température minimale de 20,5 °C le matin et de 24 °C le soir. L'intensité des mortalités est bien corrélée à l'abondance en picoplancton et en flore vibronacée, à la concentration en phéopigments et, dans une moindre mesure, à la concentration en chlorophylle *a* et en matière organique particulaire.

## Abstract

Syndrome 93 is a disease that affects shrimp grow outs during the inter-seasons in New Caledonia. In a study aimed at determining the mechanisms that lead to its expression in ponds, a particular attention was given to the biological and physico-chemical parameters of the rearing environment. This study was conducted from February to May 1997 in two sets of ponds exposed to two water exchange rates. Syndrome 93 appeared simultaneously in all experimental ponds after a temperature drop with minimal temperatures observed of 20.5°C in the morning and 24°C in the evening. The mortality correlates to the abundances of both the picoplankton and vibrios and to pheopigments concentration and to a lesser extend to chlorophyll *a* and particulate organic matter concentrations.

## Introduction

Au cours du développement de la filière crevette de Nouvelle-Calédonie, une maladie est apparue en 1993 lors de la saison froide. Elle a été décrite simultanément sur deux sites de production dans une même zone géographique et s'est très rapidement généralisée à l'ensemble des fermes. Elle a conduit à terme à un abandon progressif des élevages de saison froide (Goarant *et al.*, 1996). Cette mala-

die nommée « Syndrome 93 », s'exprime essentiellement aux inter-saisons et apparaît sous forme de brèves flambées épizootiques, touche aussi bien les fermes intensives que les fermes semi-intensives. Le Syndrome 93 est une vibriose septicémique attribuée à *Vibrio penaeicida* (Saulnier *et al.*, 2000b). Ce *Vibrio* a un pouvoir pathogène élevé et son épidémiologie correspond à celle d'agents opportunistes (Goarant, 2000) et l'agent pathogène apparaît être véhiculé par l'eau (Goarant *et al.*, 1999). Dans de nombreux cas, les mortalités liées au Syndrome 93 font suite à une chute de température (Goarant *et al.*, 1996) et on considère la température comme un facteur déterminant pour expliquer l'émergence de la maladie. Toutefois, celle-ci ne semble pas être le seul facteur en cause et il semble exister des facteurs propres à chaque bassin. Une expérimentation conduite en 1996 avait montré qu'une augmentation des renouvellements en eau avait conduit à une diminution des mortalités pour des élevages ensemencés à 20 crevettes au mètre carré (Lemonnier *et al.*, 2003b). Dans une même ferme de grossissement, deux bassins adjacents peuvent avoir des mortalités différentes alors que les températures de l'eau sont identiques (Mermoud *et al.*, 1998). La « qualité » du milieu d'élevage pourrait influencer sur l'intensité de la maladie comme facteur de stress pour les animaux et/ou comme facteur de croissance et/ou de virulence pour le pathogène. Afin de tester cette hypothèse, nous nous proposons de suivre l'écosystème bassin au moment de la chute de température dans deux séries de bassins soumis à des régimes de renouvellement différents.

## **Matériel et méthodes**

### **Conduite des élevages**

Les élevages ont été réalisés de février à mai 1997 au laboratoire d'aquaculture de Calédonie dans cinq bassins de terre adjacents et identiques, de 1 400 m<sup>2</sup> de surface et de profondeur moyenne de 1 mètre. Après 20 jours d'assec, les bassins ont été remis en eau. Ils ont été ensemencés avec des post-larves de *Litopenaeus stylirostris*. La densité initiale était de 25 animaux.m<sup>-2</sup>. Le poids moyen des animaux a été suivi une fois par semaine. Les animaux ont été nourris avec un aliment commercial (35 à 40 % de protéines). Les rations ont été ajustées sur la base des vitesses de croissance et des restes évalués sur mangeoires. L'eau des cinq bassins a été renouvelée quotidiennement avec la même eau et en une seule fois le matin. Les taux de renouvellement moyens au cours de cette expérience ont été de 5 % pour les bassins 1 et 2 (Traitement 1) et de 12 % pour les bassins 3, 4 et 5 (Traitement 2). Les bassins n'ont été ni aérés, ni fertilisés. La mortalité a été suivie par comptage des crevettes mortes et moribondes sur les bords des digues à 6 h 00 et 15 h 00.

### **Paramètres physico-chimiques**

La température et la concentration en oxygène dissous ont été mesurées deux fois par jour à 6 h 00 et 15 h 00 avec un oxymètre portable. Des échantillons d'eau ont été prélevés deux fois par semaine à 8 h 00 à mi-hauteur d'eau dans chaque bassin. La salinité et le pH ont été mesurés à l'aide d'un réfractomètre et d'un pH-mètre de laboratoire. Les matières en suspension ont été collectées sur des filtres Whatman GF/C pré-pesées et calcinées pour la mesure des matières minérales (MM) et de la matière organique particulaire (MOP) après calcination à 450 °C pendant 4 heures.

### Paramètres phytoplanctoniques et bactériologiques

Afin d'estimer la biomasse chlorophyllienne (chl *a*), 25 ml d'eau ont été filtrés sur filtres Whatman GF/C 25 mm et analysés par fluorimétrie selon la méthode de Holm-Hansen *et al.* (1965). Les pigments ont été extraits avec du méthanol et analysés avec un fluorimètre à 665 nm avant et après acidification. Pour le comptage des effectifs du picoplancton, 3 ml d'eau ont été congelés dans de l'azote liquide après ajout de 60 µl de paraformaldéhyde à 10 % pour conservation en attendant l'analyse par cytométrie en flux. Pour discriminer les populations dans ce picoplancton, on a utilisé essentiellement la fluorescence rouge (chlorophylle) et la fluorescence orange (phycoérythrine) et les critères de taille (Blanchot & Rodier, 1996). L'erreur sur le comptage a été estimée à 2,37 %. Pour le microplancton, un comptage semi-quantitatif sur cellule de Malassez a été réalisé. Trois principaux groupes ont été déterminés (Stafford, 1999): les Bacillariophycées (Diatomophycées), les Dinophycées et les Cyanophycées.

La flore vibronacée cultivable a été évaluée par mise en culture des échantillons sur milieu TCBS, milieu spécifique pour la mise en évidence de cette flore (Moriarty, 1998). Il est à noter que *Vibrio penaeicida* ne se cultive généralement pas sur ce milieu, qui ne donne donc qu'une indication des variations d'abondance de la flore vibronacée dans son ensemble, mais non de la concentration en pathogène dans le milieu d'élevage.

### Résultats

#### Aspects zootechniques

L'épizootie s'est manifestée simultanément dans les cinq bassins à partir du 73<sup>e</sup> jour d'élevage. Le déroulement de la mortalité dans les différents bassins a été similaire à ce qui a été observé dans le bassin 1 (fig. 1) avec toutefois un nombre de cadavres observés plus important à faible renouvellement qu'à fort renouvellement (tab. 1). Quel que soit le bassin, les mortalités ont été nombreuses à partir de J77. Elles ont duré 18 jours pour une durée des élevages de 107 jours. Les survies finales étaient comprises entre 40 % et 41 % pour les bassins les moins renou-

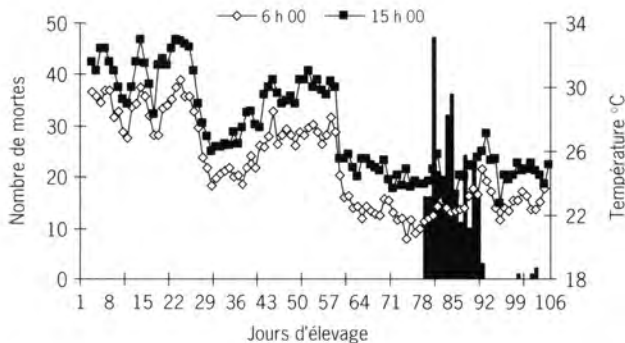


Figure 1 - Nombre de crevettes mortes observées sur le bord du bassin 1 et évolution des températures à 6 h 00 et à 15 h 00 en fonction des jours d'élevage.



velés et de 42 % à 50 % pour les bassins les plus renouvelés. La corrélation entre le nombre de mortes et la survie finale est bonne bien que non significative au seuil de 5 % ( $P = 0,07$ ) ( $\text{Survie} = 51,816 - 0,038 * \text{nombre de mortes}$ ;  $R^2 = 0,72$ ).

Tableau 1 - Données zootechniques générales moyennes  $\pm$  écart type en fonction du traitement.

Renouvellement (%/jour)	4	12
Densité finale ( $\text{anx.m}^{-2}$ )	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 1
Biomasse finale ( $\text{g.m}^{-2}$ )	138 $\pm$ 6	143 $\pm$ 11
Survie finale (%)	41 $\pm$ 1	45 $\pm$ 5
Nombre de mortes observées	320 $\pm$ 35	181 $\pm$ 64
Poids final (g)	13,6 $\pm$ 1,4a	12,9 $\pm$ 1,6b
Aliment distribué ( $\text{g.m}^{-2}$ )	344 $\pm$ 25	332 $\pm$ 8
Indice de conversion	2,5 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2
Production ( $\text{t.ha}^{-1}$ )	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1

### Effet du renouvellement en eau sur le milieu d'élevage

On note un effet significatif du renouvellement en eau sur les valeurs moyennes en oxygène à 6 h 00, le pH et la salinité (tab. 2). Sur toute la durée des élevages, les concentrations en oxygène à 6 h 00 n'ont jamais été inférieures à 2  $\text{mg.l}^{-1}$  pour les bassins les moins renouvelés. Ce seuil est de 2,6  $\text{mg.l}^{-1}$  pour les bassins les plus renouvelés. Les valeurs de 15 h 00 n'ont jamais dépassé 9,3  $\text{mg.l}^{-1}$  quel que soit le traitement. La salinité est restée dans une gamme comprise entre 33 et 39‰. Le pH était compris entre 7,7 et 8,5 en fonction des bassins. Pour ces deux derniers paramètres, on ne note pas ou peu d'effet du renouvellement en eau sur les valeurs minimales et maximales atteintes. L'augmentation du renouvellement s'est accompagnée d'une dilution significative des particules dans la colonne d'eau avec une baisse des abondances en picoplancton, des concentrations en chl *a* et en phéopigments, de la MOP et des MM mais aussi de la flore vibrionacée.

### Évolution du milieu d'élevage en relation avec les mortalités

La température a fortement chuté une première fois à J28 (fig. 1) ( $\Delta T = 5,1$  °C sur 2,5 j) puis une seconde fois à J57 ( $\Delta T = 5,5$  °C sur une nuit). La maladie s'est déclarée 14 jours après la seconde chute de température au moment où l'eau atteignait une température minimale de 20,5 °C le matin et de 24 °C le soir. Toutes les mortalités observées l'ont été pour des températures inférieures à 24 °C à 6 h 00 et de 26 °C à 15 h 00. Lors de l'observation des premières crevettes mortes, les valeurs d'oxygène à 6 h 00 étaient toutes supérieures à 4  $\text{mg.l}^{-1}$ , les valeurs à 15 h 00 étaient comprises entre 7,1 et 8,2  $\text{mg.l}^{-1}$ , le pH entre 7,9 et 8,2 et la salinité entre 36 et 39‰.

Les concentrations en chl *a* et en phéopigments (fig. 2) présentent une évolution similaire quel que soit le renouvellement en eau. Elles ont fortement augmenté à partir de J72 pour atteindre des concentrations maximales en période de mortalité. Les concentrations atteintes sont beaucoup plus élevées à faible renouvellement. La figure 3 présente un exemple caractéristique de cytotogramme obtenu lors de ce suivi.

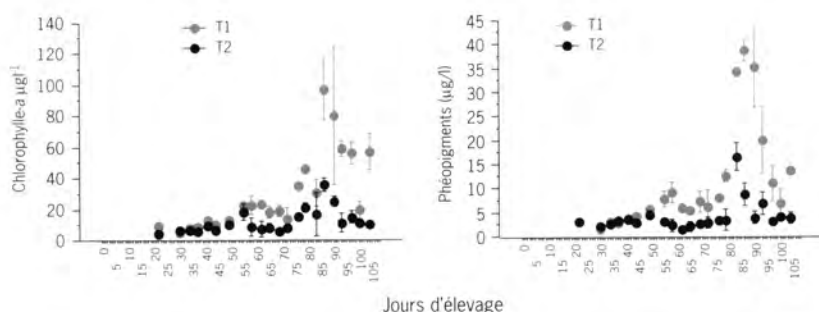


Figure 2 - Évolution des concentrations moyennes en chlorophylle a et en phéopigments en fonction du jour d'élevage (T1 : traitement 1, renouvellement moyen de 4% par jour; T2 : traitement 2, renouvellement moyen de 12% par jour).

Tableau 2 - Moyennes  $\pm$  écarts types (minima-maxima) des paramètres physico-chimiques et biologiques de l'eau en fonction des taux de renouvellement.

Renouvellement (%/jour)	4	12
Oxygène 6 h 00 (mg.l <sup>-1</sup> )	4,4 $\pm$ 0,9* (2,0-6,6)	4,7 $\pm$ 0,7* (2,6-6,7)
Oxygène 15 h 00 (mg.l <sup>-1</sup> )	7,3 $\pm$ 0,8 (4,4-9,2)	7,2 $\pm$ 0,7 (5,4-9,3)
pH	8,2 $\pm$ 0,1* (7,9-8,5)	8,0 $\pm$ 0,1* (7,7-8,3)
Salinité	37 $\pm$ 2* (33-40)	35 $\pm$ 1* (33-38)
Matière organique particulaire (mg.l <sup>-1</sup> )	10,6 $\pm$ 5,9* (4,4-24,0)	6,6 $\pm$ 3,3* (2,2-20,0)
Matières minérales (mg.l <sup>-1</sup> )	5,8 $\pm$ 4,1* (2,0-27,0)	8,3 $\pm$ 5,0* (1,3-32,5)
Chlorophylle a totale (µg.l <sup>-1</sup> )	30,2 $\pm$ 26,4* (3,4-111,2)	12,2 $\pm$ 8,2* (3,1-40,4)
Phéopigments (µg.l <sup>-1</sup> )	11,2 $\pm$ 11,1* (0,8-41,1)	4,0 $\pm$ 3,3* (1,1-18,9)
Densité cellulaire picophytoplanctonique x 10 <sup>6</sup> (cellules.ml <sup>-1</sup> )	6,15 $\pm$ 4,12* (1,40-14,17)	2,57 $\pm$ 1,63* (0,60-7,69)
Eucaryotes à chlorophylle x 10 <sup>6</sup> (cellules.ml <sup>-1</sup> )	0,91 $\pm$ 0,54 (0,15-2,49)	0,18 $\pm$ 0,15* (0,00-0,84)
Cyanobactéries x 10 <sup>6</sup> (cellules.ml <sup>-1</sup> )	2,63 $\pm$ 1,74 (0,41-6,25)	0,96 $\pm$ 0,47* (0,11-2,12)
Population A x 10 <sup>6</sup> (cellules.ml <sup>-1</sup> )	2,61 $\pm$ 2,13* (0,42-7,05)	1,40 $\pm$ 1,38* (0,20-5,94)
Flore vibronacée (CFU.ml <sup>-1</sup> )	625 $\pm$ 929* (0-4400)	234 $\pm$ 297* (0-1655)

\* Les différences entre les moyennes sont significatives avec  $P < 0,01$ .

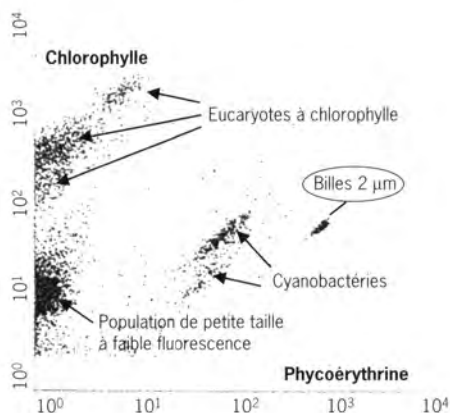


Figure 3 - Exemple de cytochrome obtenu : cas du bassin 1 après 62 jours d'élevage.

Plusieurs groupes de cellules peuvent être distingués en fonction de leurs caractéristiques pigmentaires. Il est probable qu'il y ait deux populations de cyanobactéries, une population majoritairement représentée de petites cellules à faible fluorescence dans le rouge (population A) et plusieurs populations chlorophylliennes de taille plus grande. Le suivi de l'abondance cellulaire totale (fig. 4) met en évidence une période de latence de J30 à J55, suivie d'une période de lente augmentation des abondances de J55 à J69, d'une période de forte augmentation de J69 à J83, d'une phase de plateau de J83 à J97 et d'une décroissance à partir de J97.

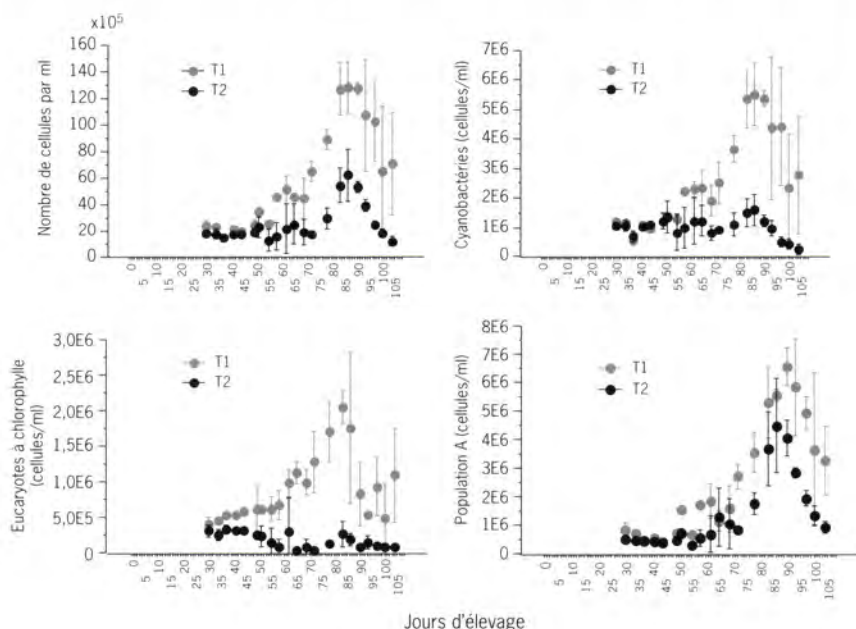


Figure 4 - Évolution des abondances moyennes en picoplancton et plus particulièrement en cyanobactéries, en eucaryotes à chlorophylle et d'une population de petite taille à faible fluorescence dans le rouge (population A) en fonction du jour d'élevage.

À partir de J50, l'abondance en cellules est plus élevée à faible renouvellement qu'à fort renouvellement. Cette augmentation des abondances est à relier à un développement des populations de cyanobactéries et de la population A (fig. 4). L'intensité des mortalités est significativement corrélée à cette abondance en picoplancton et aux différents groupes discriminés par cytométrie, aux phéopigments et dans une moindre mesure à la chl *a* (tab. 3). Il est à noter que la corrélation entre la chl *a* et l'abondance en picoplancton est très significative, montrant ainsi la part importante que représente le picoplancton dans la biomasse chlorophyllienne totale ( $r = 0,81$ ). Pour le phytoplancton observé sur cellule de Malassez, les Dinophycées ont augmenté avant l'observation des premières, mortes entre J60 et J65 puis en fin de mortalité, vers J90. Les Cyanophycées en chaîne ont proliféré en fin de mortalité, après J85. Une augmentation de la flore vibrionacée a été observée (fig. 5), quel que soit le bassin, de J0 à J80, pour atteindre une valeur supérieure ou égale à  $10^3$  CFU.ml<sup>-1</sup> entre J80 et J90. Après J90, on note une décroissance des comptages. L'intensité des mortalités augmente significativement avec l'augmentation de la flore vibrionacée (tab. 3).

	<b>Mortalité</b>
T° 6h00	-0,35
T° C. 15h00	-0,32
pH	-0,36
Oxygène 6h00	-0,16
Oxygène 15h00	0,27
Salinité	0,28
Chlorophylle <i>a</i>	0,36
Phéopigments	0,45
Matière organique particulaire	0,28
Matières minérales	-0,09
Flore vibrionacée	0,50
Picoplancton	0,50
Eucaryotes à chlorophylle	0,55
Cyanobactéries	0,46
Population A	0,45

Tableau 3  
Coefficients de corrélation entre les paramètres du milieu et le nombre de crevettes mortes observées sur le bord des bassins. Les valeurs en gras sont significatives ( $P < 0,01$ ).

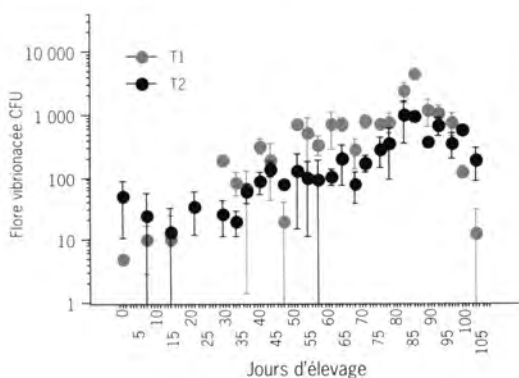


Figure 5  
Évolution moyenne de la flore vibrionacée en fonction du jour d'élevage.



## Discussion

### Relation milieu-crevette

La température est aujourd'hui considérée comme le facteur déclenchant du Syndrome 93 et permet d'expliquer la simultanéité de pics de mortalité sur des fermes parfois distantes de plus de 100 kilomètres. La température peut agir de différentes manières : en atteignant un seuil ou par de grandes variations nyctémérales. Dans le cadre de ce travail, les températures les plus froides sont associées au déclenchement des mortalités (< 22 °C le matin et < 24 °C le soir). Cette température est proche de la limite écologique de l'espèce qui est de 21 °C (Fast & Lester, 1992). Notons qu'une augmentation des amplitudes thermiques avant l'apparition des mortalités peut engendrer un stress chez la crevette et l'affaiblir, la rendant plus fragile face au pathogène (Le Moullac & Haffner, 2000 ; Lemaire *et al.*, 2002). L'oxygène, le pH et la salinité sont aussi considérés comme des facteurs de stress importants pour les animaux en élevage. Ainsi, l'exposition de crevettes infectées avec un *Vibrio* moyennement pathogène (*Vibrio alginolyticus* Z1) à de faibles valeurs d'oxygène (1 mg/l pendant 24 h) accroît la mortalité par vibriose (Le Moullac *et al.*, 1998). Au cours de notre expérience, les concentrations, les minima et les maxima pour l'oxygène, le pH et la salinité sont restés relativement proches quel que soit le bassin et généralement dans des limites acceptables pour ce type d'élevage. La dilution appliquée au cours de ce travail n'a eu qu'un effet limité sur ces paramètres et n'a pas permis de différencier suffisamment les bassins entre eux.

### Relation milieu-pathogène

La maladie s'est déclarée au moment où la température atteignait une valeur minimale de 20,5 °C le matin et de 24 °C le soir. La température a un effet direct dans la relation hôte-pathogène. Goarant *et al.* (2000) ont montré expérimentalement que des exotoxines sont exprimées par *V. penaeicida* à 20 °C alors qu'elles ne le sont pas à 30 °C. Ces résultats suggèrent qu'un effet seuil pourrait être considéré comme le facteur déclenchant de la maladie. L'intensité des mortalités est corrélée positivement à l'abondance en picoplancton et en flore vibrionacée. L'augmentation de la biomasse en picoplancton, lui-même corrélé aux valeurs de chl *a* alors que les filtres GF/C laissent passer une partie significative de ces petites cellules, pourrait favoriser l'intensité de la maladie en favorisant la croissance des *Vibrios*, notamment du pathogène. Les deux phénomènes pourraient aussi être concomitants sans être forcément liés, seule la concentration en pathogène serait dans ce cas dangereuse. L'hypothèse d'une toxicité du picoplancton devra également être étudiée bien qu'à notre connaissance aucune toxicité n'ait été décrite pour ce groupe de phytoplancton (Alonso-Rodríguez & Paez-Osuna, 2003). Il est également vrai que ce groupe n'a pas ou peu été étudié dans de tels systèmes (Courties & Boeuf, cet ouvrage) et que de telles concentrations de picoplancton n'ont à ce jour jamais été décrites (Blanchot, in prép.). Des travaux complémentaires devront être réalisés et plus particulièrement sur les groupes discriminés en cytométrie en flux pour déterminer le rôle éventuel de ce phytoplancton dans l'expression de la maladie.

### **Effet des renouvellements en eau sur les résultats zootechniques**

Dans ce travail, on peut considérer que les survies finales reflètent l'intensité des mortalités qui, elles, diminuent avec l'augmentation des renouvellements. Toutefois, les résultats zootechniques ne montrent statistiquement pas de meilleure survie en fin d'élevage avec l'augmentation du renouvellement. Le faible nombre de réplicats ne nous permet pas de conclure sur une éventuelle influence des renouvellements et de confirmer ou non les résultats obtenus en 1996 sur ce même site, à savoir une augmentation des mortalités qui s'était accompagnée en finale d'une diminution des survies avec la diminution des renouvellements (Lemonnier & Brizard, 1998).

### **Conclusion**

---

Il n'est aujourd'hui pas possible d'expliquer les différences d'intensité des mortalités dues au Syndrome 93 par l'action d'un seul facteur. Les mortalités résultent de conditions environnementales particulières découlant des pratiques culturales (densité, renouvellement), des conditions météorologiques, de la présence ou de la concentration et de la virulence du pathogène, ainsi que de l'état physiologique de la crevette. Les multiples paramètres en jeu et la complexité des processus étudiés rendent nécessaire dans l'avenir la juxtaposition de compétences complémentaires afin de progresser dans la connaissance des phénomènes observés, de mieux cerner les interactions milieu-hôte-pathogène et, à terme, de mieux appréhender la relation entre gestion zootechnique et maladie. Toutefois, ce travail permet de montrer que les mortalités liées au Syndrome 93 (i) apparaissent après une chute de température et pour des températures inférieures à 22 °C le matin et (ii) s'accompagnent d'une modification du milieu d'élevage et particulièrement d'une augmentation des abondances de cellules picophytoplanctoniques de petites tailles, qu'il conviendra de décrire plus précisément, ainsi que de la flore vibronacée.

### **Remerciements**

Ce travail est en partie financé par les Provinces Nord et Sud de Nouvelle-Calédonie. Les auteurs remercient les Dr. R. Leborgne et M. Rodier pour l'utilisation des installations du laboratoire de chimie océanologie de l'IRD Nouméa et P. Gérard pour son aide technique. Merci au Dr. Della Patrona et à l'équipe de zootechnie du LAC pour son assistance technique.

## Méiobenthos et indicateurs de la qualité des écosystèmes. Quel intérêt pour l'aquaculture des crevettes ?

G. Boucher

Muséum national d'histoire naturelle (MNHN), UMR 5178 BOME-USM 0401, Département milieux et peuplements aquatiques, 61 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France  
boucher@mnhn.fr

### Résumé

La méiofaune constitue un groupe fonctionnel de métazoaires benthiques passant un tamis de 500  $\mu\text{m}$  et retenus sur 45  $\mu\text{m}$ . Bien que très abondant, ubiquiste et diversifié dans tous les sédiments, ce groupe a été largement négligé dans les programmes de surveillance de l'environnement aquatique. Cet article fournit des arguments pour sélectionner (i) des indicateurs de réponse biologique dans l'ensemble du spectre phylogénique; (ii) des traits de vie et de démographie favorables pour suivre les perturbations de l'environnement; (iii) des critères permettant d'optimiser l'inclusion de la méiofaune dans les programmes de gestion des écosystèmes naturels ou aménagés.

Cette notion de bio-indicateur peut être appliquée à la surveillance des bassins aquacoles dédiés notamment à la production crevettière. Elle peut permettre de suivre l'évolution temporelle des bassins après leur mise en eau, leur état moyen d'anoxie, leur charge organique et l'importance de la méiofaune dans le régime alimentaire des crevettes. Plusieurs espèces de crevettes sauvages consomment, en effet, la méiofaune, principalement des copépodes, polychètes et nématodes. Certains travaux ont montré une réduction des densités par prédation sur la méiofaune alors que d'autres suggèrent curieusement une stimulation des densités par rétroaction positive liée au comportement fouisseur des crevettes. De nouvelles techniques d'investigation permettent de préciser la contribution du méiobenthos au régime alimentaire des Invertébrés et confirment une forte utilisation par les crevettes.

### Summary

Meiofauna, as a functional group constituted of small benthic metazoans 45 to 500  $\mu\text{m}$  in size, has largely been neglected in monitoring programmes of the aquatic environment although so abundant, ubiquitous and diverse. This contribution sets out arguments to select (i) biological response indicators from across the whole spectrum of phylogenetic organisation; (ii) the aspects of meiofaunal life-history and demography that render this group suitable for monitoring environmental disturbance; (iii) criteria to include meiofauna in monitoring programmes of natural and modified ecosystems.

This concept of bioindicator can be applied to shrimp pond monitoring. It allows to check the temporal changes occurring in ponds after water flooding, their anoxic status, organic matter accumulation, importance of meiofauna in the diet of shrimps. Many wild shrimps are known to feed on meiofauna mainly on copepods, polychaetes

and nematodes. Some studies suggest a decrease of meiofauna density related to predation and some others a stimulation of densities related to a positive feedback associated with digging activities. New technics allow to determine meiofauna contribution to the diet of invertebrates and confirm a large ingestion by shrimps.

## **Introduction**

---

Les techniques de production des crevettes d'élevage en milieu tropical sont en constante amélioration avec pour corollaire une emprise de plus en plus forte des exploitations dans les zones de mangrove. Dans de nombreux pays, la production a pourtant décliné du fait de la détérioration des conditions environnementales dans et autour de certaines exploitations crevettières mais surtout de vibrioses septicémiques se déclenchant en période de fragilisation de la crevette. Il devient indispensable, pour assurer un développement durable de ces pratiques aquacoles, de déterminer et hiérarchiser les facteurs favorables aux conditions de croissance et de survie, et de proposer des indicateurs écologiques de qualité des milieux d'élevage. Cette contribution a pour objet de préciser l'intérêt des caractéristiques biologiques et écologiques du méiobenthos (organismes benthiques retenus par un tamis de 40  $\mu\text{m}$  et d'une taille inférieure à 2 000  $\mu\text{m}$ ) en tant qu'indicateur de qualité des bassins (Dale & Beyeler, 2001) et de souligner ses potentialités en tant que fourrage susceptible de fournir aux crevettes d'élevages les éléments essentiels pour une croissance optimale (Fochken *et al.*, 1998). Il est, en effet, actuellement admis que le méiobenthos, et tout particulièrement le groupe des nématodes libres, constitue l'un des paramètres clés de la caractérisation des conditions de milieu et de son altération (Platt & Warwick, 1980). Il est aussi connu en aquaculture que la fourniture d'acides gras essentiels durant les premiers stades de croissance permet un développement ultérieur optimal des organismes.

## **État des connaissances sur la contribution du méiobenthos au réseau trophique des mangroves**

---

Les investigations sur la méiofaune de mangroves tropicales favorables à l'aquaculture des crevettes restent encore limitées à quelques travaux qui mentionnent tous une prédominance des nématodes dans les sédiments cohésifs caractéristiques de ces milieux (Kondal Rao, 1984; Fell *et al.*, 1975; Ansari, 1978; Varshney, 1985). Les densités de méiobenthos trouvées sont cependant extrêmement variables (200 à 6 000 ind. 10  $\text{cm}^{-2}$ ) avec une saisonnalité plus ou moins marquée selon la zone tropicale considérée, sujette aux moussons ou aux cyclones (Krishnamurthy *et al.*, 1984; Sultan Ali *et al.*, 1983; Alongi, 1987b, 1988).

La zonation est souvent plus déterminante que la saisonnalité: plus fortes densités dans l'intertidal moyen en Afrique du Sud (Dye, 1983) et décroissance marquée vers les hauts niveaux en Australie (Alongi, 1987b). Les facteurs responsables sont l'immersion tidale, la température, la salinité et la dessiccation. De bonnes corrélations des densités avec le pH et la teneur en azote sont signalées dans les forêts intertidales de bas niveau alors qu'elles sont faibles avec la teneur en pélites, la température, la salinité. Dans les forêts intertidales moyennes, de bonnes corrélations apparaissent avec les pélites, l'azote et le potentiel d'oxydo-réduction. Dans



l'intertidal supérieur, peu de corrélations sont observées, à l'exception de celles des densités de nématodes notées avec la granulométrie. Les nématodes des litières semblent être représentés par des suceurs d'épistrates et des prédateurs omnivores, particulièrement des Enoplidae du genre *Viscosia* et *Adoncholaimus*.

Deux phénomènes déterminants, la mousson saisonnière et la présence de tannins, semblent réguler les populations de méiofaune des mangroves tropicales. En Australie, la saison humide estivale, en dépit des apports d'eau douce, semble plus favorable à la méiofaune. Il est maintenant clair que les tannins dérivés de la décomposition des feuilles de mangrove ont un effet négatif sur les peuplements de méiofaune (Alongi, 1987a). Les feuilles fraîches de *Rhizophora stylosa* empêchent le développement de *Terschellingia longicaudata* notamment (Alongi, 1989). Une zonation très nette de la composition faunistique des nématodes de mangroves a été mise en évidence par Krishnamurthy *et al.* (1984) en Inde, doublée d'une séparation des contingents faunistiques entre sédiments, feuilles, racines et épiphytes. La diversité est relativement faible avec une dominance de dépositores. Elle atteste de conditions relativement drastiques en comparaison d'autres écosystèmes intertidaux.

La mangrove contribue peu aux apports en matière organique des zones côtières (Kathiresan & Bingham, 2001) et bénéficierait plutôt des apports océaniques. La méiofaune se nourrit des débris formés dans les mangroves et sa composition change avec la dégradation des feuilles (Gee & Somerfield, 1997). Les invertébrés épibenthiques, et notamment les crevettes pénéides, bénéficient de cette source de nourriture complétée par des épiphytes, des cyanobactéries et microalgues associés à la litière.

#### **État des connaissances sur le méiobenthos des bassins aquacoles à crevettes en zone de mangrove**

Les bassins aquacoles sont des systèmes soumis à une forte eutrophisation, d'autant plus marquée que la pratique culturale est intensive. L'équilibre du système est contrôlé par le renouvellement des masses d'eau au cours du cycle d'élevage (Martin, 2002). En l'absence de renouvellement, la matière organique s'accumule en créant des conditions d'eutrophie pouvant conduire à des crises dystrophiques catastrophiques pour les élevages. L'aquaculture extensive atteint sa production maximale en phase eutrophe juste avant que n'apparaisse la dystrophie.

Les connaissances sur la dynamique du benthos associé, et particulièrement le méiobenthos des bassins d'élevage, proviennent de quelques rares travaux (Moriarty, 1985). En Thaïlande, de fortes densités de méiobenthos sont signalées dans les zones d'élevage de crevettes (4 386 à 13 378 individus par 10 cm<sup>2</sup>), particulièrement des nématodes, copépodes, nauplii et rotifères (Aryuthaka, 1994). Ces densités peuvent être nettement plus faibles dans certains élevages de Chine mais les nématodes constituent toujours le groupe dominant (Yu & Zhang, 1994). Cependant, une décroissance très marquée des densités est trouvée dans les bassins d'élevage et les bassins collectant les eaux de rejet. Les facteurs limitant le méiobenthos sont la salinité, le chaulage et l'assec entre les cycles de culture et les fluctuations de la teneur en particules fines sur le fond de bassins (Ansari & Parulekar, 1993; Aryuthaka, 1994).

En Nouvelle-Calédonie, des données actuellement non publiées résultent d'estimations des densités des principaux groupes réalisées par les chercheurs de l'Ifremer Saint-Vincent (Della Patrona, comm. pers). Les pratiques culturales locales sont caractérisées par un assec de plusieurs mois des bassins à fond de terre creusés dans les tannes de mangrove suivi d'une mise en eau de mer, d'un ensemencement avec des post-larves de *Litopenaeus stylirostris* et d'une phase de grossissement de l'ordre de 150 jours. La succession des groupes faunistiques constitutifs de la méiofaune semble marquée dans les fonds de bassins lors de cycles d'élevage que ce soit en conditions normales ou en condition d'enrichissement en sels nutritifs. L'analyse faunistique montre la présence de fortes densités de nématodes, copépodes, rotifères Brachionidés et Bdelloidés, ainsi que de protozoaires *Folliculina*. Il semble qu'un enrichissement en urée + triphosphates ( $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{semaine}^{-1}$ ) soit favorable au développement de la méiofaune, stimule sa densité et affecte la composition faunistique en privilégiant les nématodes (pics du 30<sup>ème</sup> au 67<sup>ème</sup> jour).

### **Intérêt du méiobenthos en tant qu'indicateur écologique**

Les caractéristiques biologiques du méiobenthos (abondance, diversité, distribution, métabolisme, production, place dans le réseau trophique, rôle dans la minéralisation et la stabilité du sédiment) en font un excellent candidat comme compartiment indicateur de la qualité des milieux (Platt & Warwick, 1980).

Un indicateur écologique doit en effet intégrer la complexité du système tout en restant d'un suivi facile (Dale & Beyeler, 2001). Le méiobenthos réunit les critères suivants :

- 1) facilité de mesure dans des volumes restreints de sédiment, abondant quelles que soit les conditions environnementales et donc sujet à traitement de données même dans les conditions d'eutrophisation extrême où tous les autres groupes du macrobenthos ont disparu ;
- 2) réponse rapide aux perturbations à l'échelle de la semaine par des modifications de son abondance (temps de génération court) et de la composition faunistique : l'extrême diversité du méiobenthos permet à des groupes ou à des espèces d'intégrer très finement les pressions subies par le milieu ;
- 3) intégration des effets complexes, aussi bien ceux résultant des apports de la colonne d'eau que ceux résultant de la biogéochimie du sédiment ;
- 4) distribution spatiale à une échelle compatible avec la taille des bassins aquacoles permettant de distinguer zones perturbées et non perturbées ;
- 5) susceptible d'investigations préalables suffisantes dans des conditions standards d'élevage ;
- 6) rôle dans le fonctionnement de l'écosystème qui lui confère un intérêt particulier dans la stimulation de la minéralisation de la matière organique et la bioturbation du sédiment.

Les peuplements méiobenthiques, et particulièrement ceux de nématodes, sont ainsi connus pour répondre fortement aux perturbations liées aux apports de matière organique des installations aquacoles (Mirto *et al.*, 2002).

Diverses méthodes uni- et multivariées permettent de suivre les modifications des faunes susceptibles d'intégrer la qualité de l'environnement. Elles reposent sur des mesures d'abondance absolue, de biomasse, du rapport nématodes/copépodes, des

indices de diversité, des espèces indicatrices, des courbes de dominance, des indices de maturité (Bongers *et al.*, 1991) de la diversité trophique (Heip *et al.*, 1985), du niveau taxonomique minimal requis pour détecter une altération et des techniques multivariées. Les diverses alternatives sont discutées par Warwick (1993).

### **Place du méiobenthos dans le régime alimentaire des crevettes**

La contribution du méiobenthos au régime alimentaire des Invertébrés et poissons a longtemps fait l'objet de controverses, à tel point que ce compartiment a pu être considéré comme un cul-de-sac écologique (Mc Intyre, 1969). Il est maintenant démontré que la méiofaune participe largement au réseau trophique (Gee, 1989; Coull, 1990). Sa forte productivité (P/B pouvant atteindre 60 chez les nématodes: Heip *et al.*, 1985; Vranken & Heip, 1986) permet de mettre à disposition des prédateurs des quantités très significatives de fourrage naturel, jusqu'à  $5 \text{ g m}^{-2}$  pour des densités de l'ordre de  $10^7 \text{ ind.m}^{-2}$ , soit une production potentielle de  $300 \text{ g m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ .

Les crustacés sont des prédateurs importants de ce compartiment (Bell & Coull, 1978) mais des incertitudes demeurent quant à la quantification de la biomasse ingérée et à l'impact des prédateurs sur les populations. Les proies sont en effet peu détectables dans le bol alimentaire des crevettes et les analyses de contenu intestinal se révèlent inappropriées pour estimer la quantité de proies absorbées. Les études réalisées ont donc tenté de quantifier l'impact sur les proies présentes dans le milieu au travers d'expériences de prédation en mésocosmes ou en cages dans le milieu naturel. Les résultats obtenus sur diverses espèces de crevettes sont contradictoires, allant d'une réduction nette de la densité des proies (principalement les copépodes et/ou les nématodes: Bell & Coull, 1978 sur *Palaemonetes pugio*; Hedqvist-Johnson & André, 1991 sur *Crangon crangon*), de l'absence d'effet (Smith & Coull, 1987; Nilsson *et al.*, 1993) à une stimulation des densités par un effet de la bioturbation plus marqué que celui de la prédation (Escavara & Castel, 1990). Un certain nombre de facteurs peuvent moduler l'importance de la prédation assurée par les crevettes. Bien que le régime alimentaire soit en général omnivore, chaque espèce peut avoir des préférences plus marquées pour certains groupes constitutifs de micro et méiobenthos. Les milieux vaseux sont en général plus favorables à un transfert de la méiofaune dans le réseau trophique (Smith & Coull, 1987) puisque la méiofaune est alors concentrée dans l'interface eau-sédiment.

L'apport récent de nouvelles techniques permet de mieux quantifier l'importance de la prédation des crevettes sur le méiobenthos, notamment par approches immunologiques (Hunter & Feller, 1987). Hoyt *et al.* (2000) ont pu ainsi réaliser une estimation du temps de résidence des protéines des proies et une quantification du bol alimentaire de la crevette d'herbier *Palaemonetes pugio* par des expériences de transit de billes de latex fluorescentes dans l'intestin et des méthodes sérologiques. Les résultats indiquent des temps de transit extrêmement variables selon les individus allant de 30' à 4 heures et des taux d'ingestion de l'ordre de 100 individus par heure. Les mesures isotopiques du rapport du carbone et de l'azote commencent à être utilisées sur la méiofaune (Couch, 1989). Elles indiquent que les crevettes des mangroves des Philippines, de Malaisie et de Puerto Rico se nourrissent de plancton et d'algues plutôt que de feuilles et de détritus. (Kathiresan & Bingham, 2001).

Les résultats ne permettent cependant pas de savoir si le compartiment qualifié de plancton comporte des organismes méiobenthiques se développant dans les films formés sur les feuilles et racines ou à l'interface eau-sédiment.

### **Perspectives d'utilisation du méiobenthos pour le suivi des élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie**

Lors d'un cycle d'élevage de crevettes, un bassin aquacole est soumis à une eutrophisation majeure due à la sédimentation des particules d'origine pélagique, aux surplus de nourriture artificielle et à l'excrétion et défécation des crevettes. La séquence d'élevage provoquée initie une succession de populations sauvages pélagiques et benthiques dont la composition est fondamentale pour la qualité du milieu (Pearson & Rosenberg, 1978). Cette succession n'est contrôlable que par dilution de l'eau du bassin, pratique qui permet de réduire les densités des organismes planctoniques et de rétablir certains équilibres géochimiques (rapports de Redfield notamment). Le compartiment benthique des bassins aquacoles n'est pas contrôlable au cours du cycle d'élevage et ne peut être traité qu'au cours de l'assec par chaulage, enlèvement des boues et surtout hersage indispensable à une aération du sol favorable à la minéralisation. La pratique d'un bon assec est un gage de réussite des élevages ultérieurs. Le fond des bassins constitue très probablement la « bombe à retardement » des dysfonctionnements observés que ce soit lors des syndromes d'été ou d'hiver.

Disposer d'organismes susceptibles de constituer des traceurs reproductibles de la succession du bassin dont le développement est suffisamment rapide (semaine) pour constituer des avertissements précoces est donc vital. Les organismes méiobenthiques peuvent jouer ce rôle puisqu'ils sont susceptibles de développer des populations caractéristiques même dans les conditions les plus extrêmes d'une eutrophisation. Il semble donc important de déterminer les séquences des populations méiobenthiques dans différentes conditions standards de mise en élevage en saisons chaude et froide.

En termes de fourrage pour les crevettes, il conviendra de déterminer les sources de nourriture naturelles par la méthode des isotopes stables, puis de calculer des taux d'ingestion de proies benthiques sauvages en fournissant aux crevettes une nourriture contrôlée obtenue par la méthode d'extraction massive (Couch, 1988) pour les nématodes ou d'extraction à la lumière pour les copépodes harpacticoides. L'importance du fourrage pourra être évaluée par dosage des lipides de réserve dans l'hépatopancréas sur des crevettes nourries uniquement de ce fourrage et celles nourries aux granulés.

La stimulation du développement d'un méiobenthos de qualité dans les fonds de bassin constitue certainement un enjeu pour le contrôle et l'amélioration des performances des cycles d'élevage.

#### **Remerciements**

La contribution de Luc Della Patrona, agent Ifremer du laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), a largement contribué à la réflexion entreprise.



## Stimulation de la chaîne trophique naturelle dans les bassins d'élevage de *Litopenaeus stylirostris* : influence sur les performances zootechniques

L. Della Patrona, L. Chim, S. Capo, P. Lemaire, P. Brun, J.L.M. Martin

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Luc.Della.Patrona@ifremer.fr

### Résumé

La production naturelle joue un rôle majeur dans le maintien de la qualité de l'eau et dans la nutrition des crevettes d'élevage. Cette production naturelle peut être stimulée par apport d'engrais minéraux ou organiques. Cependant, l'application de ces principes aux élevages industriels nécessite auparavant la connaissance d'informations telles que les proies préférentielles de *L. stylirostris*. La quantité et la diversité des proies retrouvées dans l'estomac des crevettes reflètent étroitement celles du bassin qui varient avec la température (saison) et la fertilisation. La saisonnalité apparaît être un élément important dans les performances liées à la fertilisation (urée et super-phosphate). La stimulation de la production naturelle a permis des gains de croissance des crevettes allant jusqu'à +57 % et une réduction de l'indice de conversion du granulé de -43 %. Les résultats obtenus font l'objet de discussion et d'hypothèses, en particulier concernant le rôle des aliments naturels dans l'apport de nutriments essentiels pour la crevette qui pourraient être absents ou limitants dans les granulés commerciaux.

### Abstract

This work aimed to show the influence of fertilization (urea and phosphate) of rearing ponds on growth performances of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. The results have shown that, all along the rearing cycle, *L. stylirostris* feeds abundantly on the natural food web, on top of the pelleted feed. Its preferred preys are, in order of importance, benthic copepods (harpacticoids), protozoans, insects, foraminiferans. It has also been shown that unfed shrimp isolated from the pond bottom, were able to catch various pelagic preys in the water column. The amount and diversity of preys found in the shrimp stomach are closely related to the ones in the pond which vary with temperature (season) and fertilization. Thus, the number of benthic copepods in fertilized ponds, compared to unfertilized ponds, increased by 15% during the warm season and 80% during the cold one. Shrimp growth gain related to the stimulated natural production during warm and cold seasons was +28% and +57% respectively. In parallel, the feed conversion index decrease was -20% and -43% during the warm and cold season respectively.

## Introduction

Les crevettes des élevages extensifs, avec un rendement annuel de 100 à 200 kg par hectare, se nourrissent exclusivement de la production naturelle du bassin (Pruder, 1987). Le fourrage consommé par la crevette est principalement composé de débris végétaux et d'organismes benthiques et planctoniques (Chen & Chen, 1992; Focken *et al.*, 1998).

En élevage semi-intensif, dont les rendements peuvent atteindre plusieurs tonnes par hectare et par an, la contribution de la productivité naturelle du bassin dans l'alimentation de la crevette reste importante. Cela a été montré par les études des contenus stomacaux (Reymond & Lagardère, 1990; Focken *et al.*, 1998) et également à travers des travaux utilisant les rapports des isotopes stables où il apparaît notamment que 40 à 70 % du carbone des crevettes provenaient de la productivité naturelle du bassin (Anderson *et al.*, 1987; Parker *et al.*, 1989). En Nouvelle-Calédonie, les élevages de la crevette *Litopenaeus stylirostris* suivent le schéma semi-intensif avec ou sans aération supplémentaire. La crevetticulture dans ce pays est soumise à deux saisons bien marquées avec des températures moyennes de l'eau comprises entre 29 °C et 19 °C respectivement entre avril et septembre et entre octobre et mai. Sur ces températures moyennes viennent se greffer les fluctuations nyctémérales pouvant atteindre une amplitude de 7 °C. Les saisons intermédiaires, entre l'été et l'hiver, se caractérisent par des changements rapides de la température de l'eau et correspondent à d'importantes mortalités des crevettes associées au « Syndrome 93 » (Mermoud *et al.*, 1998).

Au cours de ce présent travail, nous avons cherché à évaluer l'influence des saisons d'élevage et de la fertilisation minérale sur la productivité naturelle du bassin et les conséquences sur quelques indicateurs de performance zootechnique. Une meilleure compréhension de l'utilisation de la productivité naturelle du bassin par la crevette *L. stylirostris* en différentes saisons et de l'influence des régimes thermiques et de la fertilisation minérale sur la disponibilité en proies naturelles pour les animaux en élevage devrait nous apporter des éléments de réponse au problème posé par le « Syndrome 93 ».

## Matériel et méthodes

Les crevettes, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874), utilisées dans nos expérimentations sont élevées à la station Ifremer (LAC, Nouvelle-Calédonie) dans des bassins de terre de 1 000 m<sup>2</sup> suivant la méthode semi-intensive sans aération.

### Expérimentation en cages

L'objectif de cette première expérience était de vérifier la prédation de *L. stylirostris* sur la productivité naturelle du bassin. Cette expérimentation a été réalisée dans un bassin unique où les différents traitements (lots de crevettes) étaient isolés dans des cages en métal galvanisé (2 m x 1 m x 1 m; ouverture de maille = 2,3 mm x 1,1 mm) soit posées sur le fond du bassin, soit surélevées par des parpaings afin d'éviter l'accès au sédiment. L'indice de réserves de l'hépatopancréas (IH) correspond à la teneur en matière sèche de cet organe (Chim *et al.*, en préparation).

L'hépatopancréas prélevé chez l'animal est pesé avant et après dessiccation à 70 °C pendant 24 heures. L'estomac est prélevé sur l'animal et disséqué sous loupe binoculaire. Une coloration au rose de Bengale permet de distinguer la faune et tissus vivants des autres éléments du bol alimentaire.

### Expérimentations en bassins

Au cours de cette étude, 8 élevages en bassins de terre (1 000 m<sup>2</sup>) ont été réalisés et ont été ensemencés en deux saisons : 4 bassins en hiver et 4 bassins en été. La durée des élevages était de 137 jours et de 153 jours respectivement pour les ensemencements d'été et d'hiver. La densité initiale d'élevage était de 20 post-larves par mètre carré. Pour chacune des deux saisons d'élevage, deux traitements ont été réalisés : non fertilisés (deux élevages) *vs* fertilisés (deux élevages). La fertilisation était à base d'urée et de super triple phosphate à raison de, respectivement, 9 kg et 0,6 kg par semaine. Les températures et les concentrations d'oxygène étaient prises tous les jours à 8 h et à 16 heures. Des échantillons d'eau et de sédiment étaient prélevés une fois par semaine pour le dosage des sels nutritifs et le comptage du plancton. Enfin, les crevettes étaient échantillonnées chaque semaine et leur poids moyen déterminé. Un unique aliment commercial a été utilisé pour l'ensemble des élevages.

### Résultats et discussion

#### Expérimentations en cages

Les résultats présentés ici proviennent d'une expérimentation réalisée avec des animaux de 8 g ± 0,5 g enfermés dans les cages positionnées dans un bassin en terre. Au cours des trois premiers jours d'élevage, les cages sont surélevées avec des parpaings, les crevettes n'ont donc pas accès au sédiment. Au troisième jour, les cages sont posées sur le fond et enfoncées de quelques centimètres dans le sédiment du bassin. Chez les crevettes à jeun et isolées du sédiment, les contenus stomacaux comprenaient de 1 à 16 copépodes pélagiques. Ainsi, *L. stylirostris* juvénile est capable de s'alimenter sur le zooplancton. Chen & Chen (1992) ont fait la même observation chez *P. monodon* (2 g de poids moyen) qui ingère jusqu'à 5 410 copépodes par jour. L'importance trophique du zooplancton a également été montrée pour les post-larves de *P. merguensis* (Chong & Sasekumar, 1981) et de *P. japonicus* (Reymond & Lagardère, 1990).

Deux heures après avoir replacé les crevettes en contact avec le sédiment, le zooplancton n'est plus observé dans le contenu stomacal ; il laisse place à des restes de méiobenthos. Les proies étaient alors représentées principalement par des foraminifères mous (22 ind. par estomac) et des copépodes harpacticoides (36 ind. par estomac). Les nématodes, pourtant présents dans le sédiment, n'ont jamais été retrouvés dans les contenus stomacaux des crevettes observées. L'absence des nématodes du bol alimentaire s'expliquerait par le fait qu'ils seraient rapidement détruits dans l'estomac de la crevette. *L. stylirostris* semble donc privilégier la prédation de la méiofaune à celle du zooplancton dès lors qu'elle a accès au sédiment du bassin. La consommation du méiobenthos a été montrée pour différentes espèces de crevette d'intérêt commercial (Bell & Coull, 1978 ; Rubright *et al.*, 1981 ; Moriarty *et al.*, 1987).

La valeur moyenne de l'indice des réserves de l'hépatopancréas (IH) en fin de la période de jeûne dans les cages surélevées était de 26,5 % (ES = 0,9). Chez les crevettes remises en contact avec le sédiment, le IH, après 48 h et 72 h, passait respectivement à 27,5 % (ES = 0,011) et à 33,7 % (ES = 0,013). Cette augmentation sensible du IH après 72 h ( $p < 0,0001$ ) correspond à la mise en réserve dans l'hépatopancréas des produits de la digestion de la productivité naturelle consommée par la crevette.

### Expérimentations en bassin

La figure 1 montre l'évolution journalière des températures de l'eau des bassins pour les deux saisons d'ensemencement. Les élevages ensemencés en été et en hiver se terminent respectivement en saison froide et en saison chaude. Afin de bien séparer les effets liés à la température de ceux liés à la fertilisation, nous avons distingué 3 périodes d'élevage dont les températures moyennes sont présentées dans le tableau 1 :

- la période 1, comprise entre le jour 1 et le jour 70, se caractérise par une température moyenne de l'eau de 5 °C supérieure pour les élevages ensemencés en été ;
- sur la période 2, qui débute au jour 71 et se termine au jour 98, les températures moyennes des différents élevages sont similaires ;
- enfin, sur la période 3, qui va du jour 99 jusqu'à la fin de l'élevage les températures moyennes s'inversent, elles sont en effet inférieures de 4 °C dans les bassins ensemencés en été.

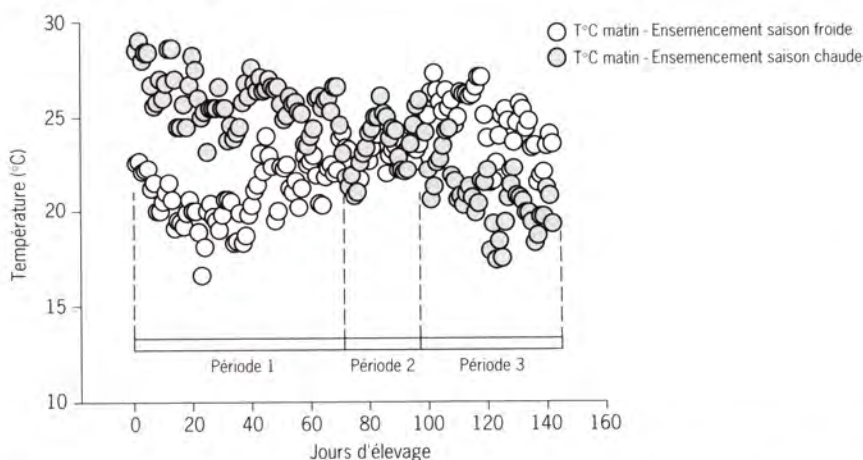


Figure 1 - Températures matinales de l'eau des bassins ensemencés en saison froide et en saison chaude en fonction du jour d'élevage.

Tableau 1 - Températures moyennes matin et soir des élevages ensemencés en hiver et en été pour les 3 périodes considérées.

	Ensemencements hiver		Ensemencements été	
	T°C matin ( $\pm$ ES)	T°C soir ( $\pm$ ES)	T°C matin ( $\pm$ ES)	T°C soir ( $\pm$ ES)
Période 1	21,11 (0,098)	23,20 (0,127)	26,45 (0,084)	28,69 (0,102)
Période 2	23,35 (0,096)	26,04 (0,140)	23,95 (0,150)	25,59 (0,182)
Période 3	25,09 (0,106)	27,93 (0,117)	20,95 (0,127)	22,78 (0,132)



### Influence de la température d'élevage

La figure 2 montre, pour les deux saisons d'élevage, les croissances instantanées des crevettes aux 3 périodes définies. Chez les animauxensemencés en hiver, la vitesse de croissance est doublée entre la période 1 ( $0,10 \text{ g.j}^{-1}$ ) et la période 3 ( $0,20 \text{ g.j}^{-1}$ ) corrélativement à une augmentation de  $4^\circ\text{C}$  de la température. Pour les élevagesensemencés en été c'est le contraire, la croissance des crevettes ralentit, passant de  $0,19 \text{ g.j}^{-1}$  en période 1 à  $0,14 \text{ g.j}^{-1}$  en période 3 concomitamment à une baisse de la température de  $3^\circ\text{C}$ . Bien que la température joue un rôle prépondérant, elle n'apparaît pas être l'unique facteur influençant la croissance des crevettes élevées en bassin. Ainsi, si l'on compare, à  $21^\circ\text{C}$ , les vitesses instantanées de croissance, elles apparaissent plus lentes chez les crevettesensemencées en hiver ( $0,1 \text{ g.j}^{-1}$ ) que chez cellesensemencées en été ( $0,14 \text{ g.j}^{-1}$ ).

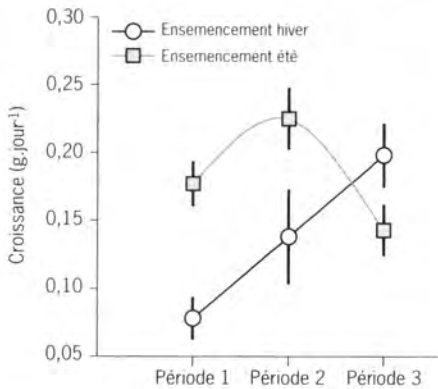


Figure 2  
Taux de croissance des crevettesensemencées en hiver et en été aux différentes périodes d'élevage.

La température a de même une influence considérable sur la productivité naturelle des bassins. Les résultats de comptage des groupes les plus représentatifs du plancton et du benthos sont présentés dans le tableau 2. Par mesure de simplification, nous avons considéré dans ce tableau uniquement la période 1 des élevages non fertilisés. Ainsi, on observe en saison chaude ( $26-28^\circ\text{C}$ ) des populations de plancton et de zoobenthos beaucoup plus nombreuses qu'en saison froide ( $21-23^\circ\text{C}$ ). C'est notamment vrai pour les populations de copépodes benthiques et de rotifères *bdelloïdes* qui sont des proies abondamment retrouvées dans l'estomac de *L. stylirostris* (Della Patrona *et al.*, en préparation).

Tableau 2 - Concentrations moyennes du phytoplancton, zooplancton et zoobenthos, sur la période 1 des élevagesensemencés en hiver et en été.

		Ensemencements hiver		Ensemencements été	
		Moyenne	Err. Std	Moyenne	Err. Std
Phytoplancton	Diatomophycées ( $\epsilon.\text{ml}^{-1}$ )	15 900	3 800	87 500	20 600
Zooplancton	Copépodes pélagiques ( $\text{ind.l}^{-1}$ )	15	2,8	40	3,9
Zoobenthos	Copépodes benthiques ( $\text{ind.m}^{-2}$ )	239	94	24 631	5 805
	Rotifères bdelloïdes ( $\text{ind.m}^{-2}$ )	52	34	6 906	2 019
	Nématodes ( $\text{ind.m}^{-2}$ )	1 993	812	68 584	16 835

### Influence de la fertilisation

La fertilisation minérale a permis d'enrichir très significativement l'eau des élevages en sels nutritifs (tab. 3). Notons ici que les plus faibles concentrations estivales en ammoniacque traduisent sa plus forte consommation par une population de phytoplancton plus développée en saison chaude. L'enrichissement en sels nutritifs de l'eau des bassins est clairement associé à une augmentation des densités de phytoplancton, de zooplancton et de la méiofaune (tab. 4). Ainsi, la fertilisation induit une multiplication par 4 et 5 respectivement des populations de *Coccus* spp. et de Diatomophycées. À cette augmentation du phytoplancton coïncide un développement du zooplancton, notamment de la population des copépodes pélagiques qui est 4 fois plus importante dans les bassins fertilisés. Par ailleurs, comme le suggère Rubright *et al.* (1981), la transformation des populations planctoniques en détritus contribue également à enrichir les populations de zoobenthos. Notre étude confirme cela : on observe, dans les bassins fertilisés, une augmentation sensible de la densité du zoobenthos. Néanmoins, la fertilisation apparaît stimuler davantage le zooplancton que le zoobenthos.

Tableau 3 - Concentrations moyennes des sels nutritifs des élevages non fertilisés et fertilisés ensemencés en saison froide en saison chaude.

	Bassins non fertilisés		Bassins fertilisés	
	Saison froide	Saison chaude	Saison froide	Saison chaude
Ammoniacque (mg.l <sup>-1</sup> ± ES)	0,019 ± 0,005	0,012 ± 0,005	0,294 ± 0,061	0,094 ± 0,019
Nitrates (mg.l <sup>-1</sup> ± ES)	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,02 ± 0,004	0,004 ± 0,001
Nitrites (mg.l <sup>-1</sup> ± ES)	-	-	0,002 ± 0,001	-
Phosphates (mg.l <sup>-1</sup> ± ES)	0,013 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,067 ± 0,01	0,061 ± 0,009

Tableau 4 - Comparaison des populations de phytoplancton, zooplancton et zoobenthos des élevages non fertilisés et des élevages fertilisés.

		Élevages non fertilisés		Élevages fertilisés	
		Moyenne	Err. Std	Moyenne	Err. Std
Phytoplancton	<i>Coccus</i> spp. (ε.ml <sup>-1</sup> )	2 000 000	130 000	8 700 000	1 380 000
	Diatomophycées (ε.ml <sup>-1</sup> )	8 700	2 000	56 200	15 900
Zooplancton	Rotifères (ind.l <sup>-1</sup> )	0,90	0,28	38,40	9,99
	Larves de cirripèdes (ind.l <sup>-1</sup> )	0,81	0,36	3,49	2,57
	Copépodes pélagiques (ind.l <sup>-1</sup> )	40,54	3,93	156,13	13,53
Zoobenthos	Copépodes harpacticoides (ind.m <sup>-2</sup> )	24 600	5 800	38 600	5 100
	Nématodes (ind.m <sup>-2</sup> )	68 500	16 800	77 900	12 200
	Rotifères bdelloïdes (ind.m <sup>-2</sup> )	6 900	2 000	13 500	2 000

L'enrichissement du milieu d'élevage par l'application d'engrais est également associé à une forte stimulation de la croissance des crevettes comme l'indique la figure 3. Quelle que soit la température considérée, les taux de croissance sont systématiquement supérieurs chez les crevettes élevées en bassins fertilisés. L'effet positif de la fertilisation sur la croissance et la production des crevettes a été montré en d'autres occasions mais pour des densités d'élevage plus faibles, inférieures à 15 animaux par mètre carré (Rubright *et al.*, 1981 ; Chakraborti *et al.*, 1986 ; Garson *et al.*, 1986 ; Lanari *et al.*, 1989 ; Allan *et al.*, 1995).

Les crevettes apparaissent être des prédateurs opportunistes bien qu'elles exercent une pression de prédation sur toute la faune du milieu étudié (Reymond & Lagardère, 1990). Ainsi, la composition et l'abondance de la méiofaune retrouvée dans l'estomac de *L. stylirostris* reflètent étroitement celles du milieu d'élevage (Della Patrona *et al.*, en préparation). Notre étude a montré notamment une plus grande abondance de proies ingérées chez les animaux élevés en bassins fertilisés (Della Patrona *et al.*, en préparation). La part de la productivité naturelle dans l'alimentation des crevettes peut être très importante, elle atteint ainsi 50 % et 40 % du contenu stomacal respectivement chez *P. monodon* (Focken *et al.*, 1998) et *P. japonicus* (Reymond & Lagardère, 1990) au cours des 3 premiers mois d'élevage.

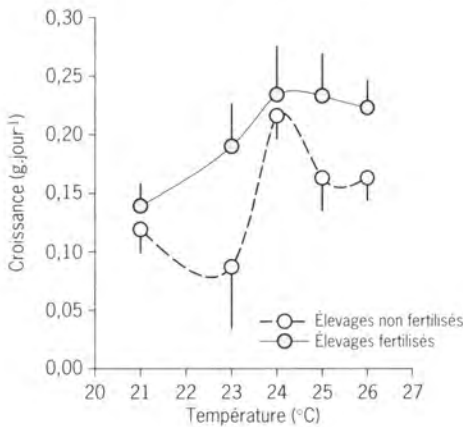


Figure 3  
Taux de croissance des crevettes suivant la température moyenne de l'eau des élevages non fertilisés et fertilisés.

L'enrichissement de l'apport trophique du milieu d'élevage apparaît être à l'origine du gain de croissance des crevettes élevées en bassins fertilisés (Coman *et al.*, 2003). La composition biochimique de cet apport trophique a été déterminée par Dall *et al.* (1991, 1992) dans le cadre d'une étude effectuée avec la crevette *P. esculentus*; les principales proies qui ont été analysées sont riches en protéines (70 à 80 %) et pauvres en carbohydrates (11 %) et en lipides (12 %). Cependant, la fraction lipidique renferme des teneurs particulièrement élevées en acides gras essentiels pour les crevettes. Ainsi, l'apport trophique du milieu d'élevage contiendrait des nutriments qui pourraient faire défaut ou être limitants dans le granulé commercial (Tidwell *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1992).

Tous les élevages de Nouvelle-Calédonie sont basés sur le système semi-intensif aéré ou non. Dans un tel système, l'aliment des crevettes est constitué d'un mélange de granulé commercial et de proies vivantes produites par l'écosystème bassin (Tacon, 1996). Pour comprendre réellement la nutrition de *L. stylirostris* dans son milieu d'élevage, il est donc essentiel d'identifier et de qualifier la contribution trophique de la productivité naturelle en différentes saisons. Ce n'est qu'ainsi que nous serons en mesure de formuler des aliments granulés répondant réellement aux besoins nutritionnels de la crevette en conditions commerciales de production. En outre, la formulation des aliments de saison froide doit tenir compte de l'appauvrissement trophique du milieu, conséquence des baisses de température. La compensation, en hiver, de la baisse trophique du bassin par un aliment granulé enrichi en nutriments essentiels devrait participer à maintenir la santé du cheptel aux saisons de « Syndrome 93 ».

## Influence des pratiques zotechniques de la crevette (*Litopenaeus stylirostris*) et de l'âge des bassins sur la qualité des sédiments

H. Lemonnier, R. Brizard, A. Legrand

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Hugues.Lemonnier@ifremer.fr

### Résumé

La dégradation de la qualité des fonds de bassin avec le nombre d'élevages est souvent mise en cause par les biologistes des fermes d'élevage de crevettes de Nouvelle-Calédonie pour expliquer une baisse de production, qu'elle soit associée ou non à une pathologie. Pour évaluer cette hypothèse, une étude sur la qualité des fonds de bassin a été réalisée sur douze bassins gérés de manières semi-intensive ou intensive, et dont le nombre d'élevages successifs était compris entre 2 et 21. Les objectifs étaient d'estimer le niveau d'envasement des bassins, l'enrichissement organique des sédiments, et d'évaluer leur qualité chimique et physico-chimique en relation avec les paramètres de production. La quantité de sédiment accumulé ne diffère pas entre les bassins, quel que soit le nombre d'élevages, suggérant pas ou peu d'envasement des bassins dans le temps. Une réorganisation des sols a parfois été observée avec des zones d'accumulation et d'érosion, aussi bien pour des élevages intensifs que semi-intensifs. Une diminution de la perte au feu totale et de la porosité de l'horizon intermédiaire (M) par rapport à l'horizon profond (P) a été mesurée en relation avec le nombre d'années d'élevage, suggérant un tassement des sols dans le temps. Aucun enrichissement organique de l'horizon M n'a été observé en fonction de l'âge des bassins. Un enrichissement organique de l'horizon S apparaît avec l'augmentation des rendements et des indices de conversion du dernier élevage. Les sédiments à l'interface eau-sédiment des bassins intensifs présentent en général des concentrations en azote ammoniacal total plus élevées, des pH *in situ* et des potentiels d'oxydoréduction plus faibles que ceux des bassins semi-intensifs.

### Abstract

The degradation of pond bottom with time is usually forwarded by shrimp farm managers in New Caledonia to explain a decrease in production, associated or not with a pathology. To evaluate this possibility, a study was carried out on the pond bottom of 12 earthen ponds aged 2 to 21 crops, and managed in a semi-intensive or intensive way. The aim of this work was to assess the silting up in the ponds, measure the organic matter accumulation in the sediment, and estimate the chemical and physico-chemical quality of the sediment. Results of our study did not show an increase in siltation of the ponds with successive crops. However, a heterogeneity of sediment distribution was sometimes observed, characterised by zones of sludge deposition and zones of erosion. A decrease of porosity and total loss by ignition of the M horizon with time were measured, suggesting a packing down. Organic accumulation with number of crops was not observed. Organic mat-



ter concentration in the S horizon increased in relation with production and food conversion ratio of the last crop. The water-sediment interface (first cm) in the intensive ponds commonly showed higher total ammonia nitrogen concentration, lower pH *in situ*, and lower redox than in semi-intensive ponds.

## Introduction

Une diminution de la production de crevette (*Litopenaeus stylirostris*) a été observée à plusieurs reprises sur différentes fermes de Nouvelle-Calédonie. Les éleveurs l'associent généralement à une dégradation des fonds de bassin. Différentes pratiques ont été mises en place plus ou moins empiriquement en Nouvelle-Calédonie, comme à travers le monde, dans le but de préserver la qualité des sols des bassins: assec, labour, curage, chaulage et fertilisation (Boyd & Teichert-Coddington, 1994; Boyd, 1995a,b). Toutefois, dans bien des cas, elles semblent être inefficaces. Les travaux sur les relations entre les propriétés physiques et chimiques des sols et la qualité de l'eau sus-jacente, d'une part, et entre les propriétés des sols et la production animale, d'autre part, sont encore aujourd'hui trop peu nombreux (Boyd, 1995a), rendant l'interprétation de l'analyse des sols difficile et ce malgré de nombreuses études (Morales *et al.*, 1991; Boyd *et al.*, 1994a,b; Munsiri *et al.*, 1996; Ritvo *et al.*, 1998; Sonnenholzner & Boyd, 2000a). L'objectif de ce travail était, à partir d'analyses et de méthodes simples (Hussenot & Martin, 1995), (i) de déterminer le niveau d'envasement des bassins, (ii) de mesurer l'enrichissement organique des sédiments et (iii) d'évaluer la qualité des sédiments en relation avec les paramètres de production.

## Matériel et méthodes

Douze bassins dont cinq gérés de manière intensive (bassins de 3 à 4 ha, aérés, ensemencés avec 30 à 35 animaux.m<sup>-2</sup>) et sept de manière semi-intensive (bassins de 7 à 10 ha non aérés, ensemencés avec 20 à 25 animaux.m<sup>-2</sup>) appartenant à 6 fermes ont été échantillonnés entre mai et octobre 1996. L'échantillonnage du sédiment a été réalisé le jour des vidanges finales des bassins. De neuf à quinze stations ont été choisies de manière à couvrir l'ensemble de la surface des bassins. Sur chaque station ont été mesurés: l'accumulation de sédiment par rapport au sol initial (précision 2,5 mm), l'épaisseur des différents horizons (Munsiri *et al.*, 1995), le pH *in situ* du sédiment superficiel, le potentiel d'oxydoréduction (Eh) (Hussenot & Martin, 1995). Des prélèvements de sédiment ont été réalisés à l'aide d'un carottier. Chaque carotte a été découpée en segments correspondant aux épaisseurs: 0-1 cm, 1-2 cm, 2-4 cm, 4-8 cm et parfois 8-12 cm, 12-16 cm et 16-20 cm. Rapidement, après un retour des échantillons sous glace, ont été réalisés la densité par pesée de 20 ml de sédiment (Avnimelech *et al.*, 2001), la teneur en eau (% du poids humide), la porosité par perte de poids consécutive à un séchage de cinq jours à 60 °C, la matière organique (MO) par perte au feu PF (350 °C, 8 h) (Ayud & Boyd, 1994), la perte au feu totale (PFt) (550 °C, 5 h) et le pH dans un rapport sol sec/eau distillée de 1/2,5 (Pétard, 1993). Une autre fraction de l'échantillon a été utilisée pour récupérer l'eau interstitielle par centrifugation (2000 g, 30 min) et l'analyse de l'azote ammoniacal total a été effectuée par la méthode de Koroleff (1976) sur une chaîne d'auto-analyse à flux continu (Tréguer & Le Corre, 1975).

## Résultats et discussion

### Description des horizons

Les sédiments des bassins d'élevage ont des horizons distincts à l'image de ce que l'on observe pour les sols terrestres. Trois horizons principaux (tab.) ont pu être distingués lors de l'échantillonnage. Leur dénomination est adaptée de l'étude réalisée par Munsiri *et al.* (1995) sur des bassins de production de poissons. L'horizon superficiel (S) était généralement de couleur noire sur une épaisseur de 1 à 3 cm. L'horizon intermédiaire (M), plus profond, gris à noir, était d'épaisseur variable en fonction de la station d'échantillonnage. L'horizon profond (P) était compact et généralement de couleur marron. Il correspond au sol initial du fond de bassin, non perturbé.

Épaisseur moyenne  $\pm$  écart type des différents horizons identifiés selon la nomenclature de Munsiri *et al.* (1995).

Code ferme	Code bassin	N° du cycle	Profondeur pour atteindre P (cm)	Épaisseur de M (cm)	Épaisseur de S (cm)
OA	OA5 <sup>(1)</sup>	1	2,0 $\pm$ 0,8	-	-
OA	OA1	2	4,7 $\pm$ 2,7	-	-
AM	AM1	2	5,0 $\pm$ 6,3	-	-
AM	AM5	3	4,8 $\pm$ 2,0	3,1 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 1,3
VH	VH2	3	5,2 $\pm$ 2,1	3,0 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 1,2
VH	VH4	3	5,1 $\pm$ 2,6	3,3 $\pm$ 2,3	1,7 $\pm$ 0,5
SF	SF1	7	5,7 $\pm$ 2,0	4,0 $\pm$ 1,8	2,0 $\pm$ 2,0
SF	SF5	7	6,3 $\pm$ 2,5	4,2 $\pm$ 2,3	2,2 $\pm$ 0,7
AQ	AQF	8	5,7 $\pm$ 2,6	3,1 $\pm$ 2,2	2,6 $\pm$ 1,1
SO	SOG	11	5,0 $\pm$ 1,4	3,2 $\pm$ 1,1	1,8 $\pm$ 0,9
AQ	AQC	12	5,8 $\pm$ 3,3	4,0 $\pm$ 1,9	1,7 $\pm$ 1,5
SO	SOW	18	5,5 $\pm$ 3,6	4,1 $\pm$ 3,3	1,3 $\pm$ 0,5
FA	FAK	21	6,7 $\pm$ 1,2	4,8 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,9

(1) Les résultats sur ce bassin ont été tirés d'une précédente étude (Lemonnier & Brizard, 1997).

L'horizon S se caractérise par une teneur en eau élevée (> 40%), une densité faible (< 1,1 g/cm<sup>3</sup>) et un taux de MO élevé (> 1,8%). Il est bien homogénéisé par des agents physiques et biologiques (Lemonnier *et al.*, 2001). En surface, il est aérobie puis devient très rapidement anaérobie avec la profondeur. L'horizon M, avec une teneur en eau de 35 à 40 % et une densité intermédiaire de 1,1 à 1,4 g/cm<sup>3</sup>, est plus ou moins riche en matière organique, hétérogène et anaérobie. Il contient des agrégats noirâtres. L'horizon P a une teneur en eau plus faible (< 35%), un taux de matière organique variable en fonction des stations et une densité élevée (> 1,4 g/cm<sup>3</sup>). Il est compact, non remué et anaérobie.

### Envasement des bassins

Initialement, les bassins sont construits en arrière de mangrove par des levées de digues. Les fonds sont généralement constitués sur leur plus grande partie d'une argile jaune-marron compacte et imperméable. À la première vidange, on observe une accumulation de sédiment sur le fond initial du bassin ayant pour origine l'éro-

sion des digues (Boyd, 1995a). Elle a été estimée à 2 cm après un premier élevage dans un bassin de Nouvelle-Calédonie (Lemonnier & Brizard, 1997). Au cours de l'assec, l'aquaculteur effectue un labour plus ou moins profond en fonction des zones et mélange ainsi du sol initial avec du sédiment provenant des digues. Au cours du second élevage, l'érosion des digues semble se poursuivre et implique un apport de matière supplémentaire. Au cours des élevages suivants, l'apport par les digues devenant négligeable, l'envasement n'augmente plus significativement dans le temps (Lemonnier *et al.*, 2001).

### Distribution des vases

La circulation de l'eau sous l'action du vent, des aérateurs et de l'emplacement des moines de renouvellement va entraîner le maintien dans la colonne d'eau et le transport des particules qui vont se déposer dans les zones de moindre courant. La figure 1 présente la distribution des vases, selon les stations, par rapport à l'horizon P pour différents bassins. Les données sur les épaisseurs de sédiment ont été classées selon les intervalles suivants : 0-2 cm, 2-4 cm, 4-6 cm, 6-8 cm, 8-10 cm, 10-15 cm et 15-20 cm. On note différents cas en fonction des bassins avec une forte concentration des vases dans certaines zones et pas, ou peu, de vase dans d'autres quelle que soit la pratique d'élevage.

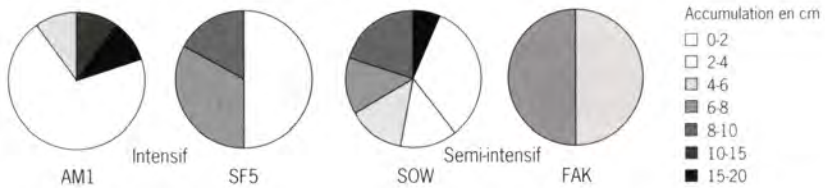


Figure 1 - Diagramme en secteur de la distribution des fréquences des épaisseurs de sédiments de 4 bassins de 4 fermes (AM1, SF5, SOW et FAK) par rapport au sol initial.

Pour les bassins intensifs, une très forte concentration des vases peut conduire à une dégradation de la qualité des sédiments avec une accumulation d'ammoniaque et une diminution du potentiel d'oxydoréduction sur plusieurs cm (fig. 2). Cette concentration des vases est suspectée comme étant l'une des causes de la chute de production d'une ferme de Nouvelle-Calédonie en 1992 (Lemonnier & Brizard, 2001).

### Enrichissement organique des vases

La MO dans cette étude varie de 0,55 à 4,93 %. On estime à 58 %, le taux de carbone contenu dans la MO (Nelson & Sommers, 1982; Ayud & Boyd, 1994). En termes de carbone, les valeurs varient donc de 0,32 % à 2,86 %. Cette gamme est proche de celle observée dans des bassins d'élevage et dans la mangrove en Australie (Smith, 1996). Elle était plus étendue et comprise entre 0,25 à 14 % dans une étude réalisée par Sonnenholzner & Boyd (2000a) et entre 0,18 % à 7,20 % dans des bassins de crevettes d'Amérique du Sud de (Boyd, 1992). Sur les 5 premiers cm, on peut estimer à 1,44 % le taux de carbone moyen des sols calédoniens en fin d'élevage. Cette valeur est proche des valeurs mesurées par Boyd *et al.* (1994a,b), Smith (1996), Munsiri *et al.* (1996) et Sonnenholzner & Boyd (2000a), sur des bassins non construits sur la mangrove.

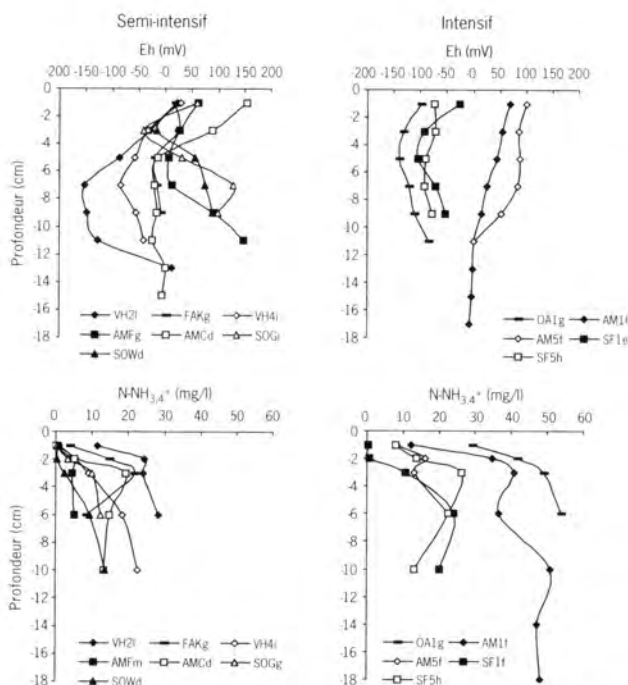


Figure 2 - Profils du potentiel d'oxydoréduction et des concentrations en azote ammoniacal en fonction de la profondeur dans des bassins semi-intensifs et intensifs. Les stations choisies correspondent aux zones à forte accumulation sédimentaire. Les lettres à la suite des codes bassin représentent les stations d'échantillonnage.

Outre le matériel allochtone correspondant aux déchets issus des élevages, le matériel autochtone utilisé pour la construction des bassins et le site lui-même influencent la concentration de la MO dans les bassins aquacoles (Boyd, 1992). Afin d'estimer l'enrichissement organique des sédiments dans le temps, les valeurs de l'horizon M ont été soustraites à leur valeur d'origine, celle de l'horizon P. La différence est en moyenne de 0,19 %. Aucun enrichissement organique en relation avec le nombre d'années d'élevage n'a été observé. De même, Ritvo *et al.* (1999) n'ont pas trouvé d'augmentation de MO dans les sols d'un élevage sur l'autre, contrairement à Munsiri *et al.* (1996) qui ont observé une augmentation de la MO avec l'âge des bassins. Toutefois, ces auteurs considèrent que les élevages accumulent peu de MO, comme Boyd *et al.* (1994b) et Munsiri *et al.* (1995).

Pour l'enrichissement organique lié au dernier élevage, la valeur de l'horizon M a été considérée comme référence. La figure 3 présente l'enrichissement organique de l'horizon S en fonction des indices de conversion obtenus au cours du dernier élevage. On note un enrichissement important dans deux cas distincts : les bassins à fort rendement et les bassins dont l'indice de conversion est élevé. La quantité de MO accumulée peut être estimée respectivement à 240 et à 120 g.m<sup>-2</sup>. Les bassins intermédiaires accumulent beaucoup moins de matière organique, soit environ 40 g.m<sup>-2</sup>. Cet enrichissement a pour origine l'élevage lui-même et cette MO peut être considérée comme fortement labile (Munsiri *et al.*, 1995 ; Sonnenholzner & Boyd, 2000b). Elle est normalement rapidement décomposée lors des assecs (Ayud *et al.*, 1993 ; Boyd & Teichert-Coddington, 1994).



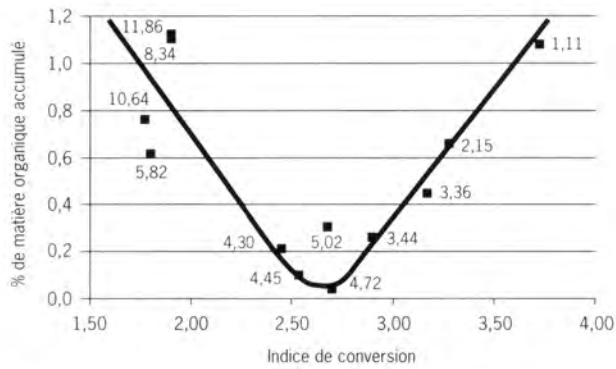


Figure 3 - Bilan de matière organique de l'horizon S par rapport à l'horizon M en fonction des indices de conversion du dernier élevage. Les chiffres indiqués sur les points correspondent aux rendements (en t/ha/an) du dernier élevage.

**Propriété et évolution des vases dans le temps**

L'horizon P, caractéristique de l'état initial du bassin, est pris comme référence. La figure 4A présente l'évolution de la Pft en fonction de l'âge des bassins. Entre 3 et 5 ans, on observe une augmentation de la Pft. Par la suite, les valeurs deviennent toutes négatives pour des bassins âgés entre 6 et 14 ans. Techniquement, cette Pft conduit à (i) l'oxydation de la MO en CO<sub>2</sub>, (ii) une perte en eau provenant des feuillets d'argile et (iii) la décomposition du CaCO<sub>3</sub> en CaO et en CO<sub>2</sub> (Boyd, 1995a). La diminution de la Pft aurait pu s'expliquer par une diminution de la MO mais les mesures de MO ne valident pas cette hypothèse. Elle pourrait s'expliquer soit par une diminution de l'eau contenue dans les feuillets d'argile, soit par une diminution des concentrations en CaCO<sub>3</sub>. La figure 4B montre une baisse de la porosité avec l'âge des bassins. Elle implique une diminution des échanges des composés dissous entre le sédiment et la colonne d'eau (Avnimelech *et al.*, 2001) et pourrait avoir des conséquences sur le fonctionnement même de l'écosystème bassin. Ces résultats suggèrent en outre un tassement des sols dans le temps qui pourrait s'expliquer par une perte de la capacité d'humidification des sédiments à la suite d'assecs prolongés et successifs (Gouleau *et al.*, 1995).

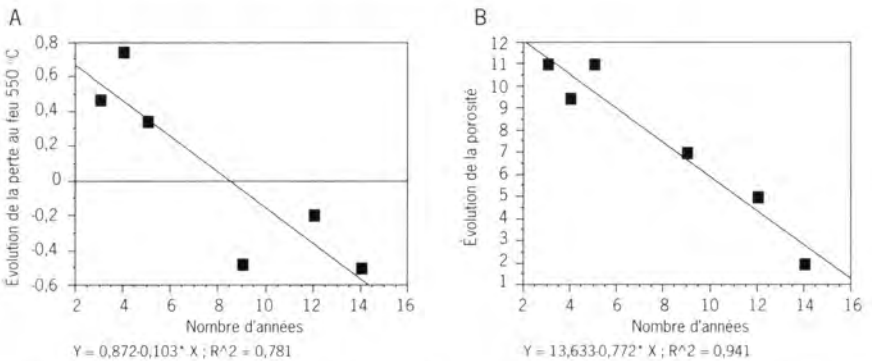


Figure 4 - Évolution de la perte au feu totale (A) et de la porosité (B) en fonction du temps d'exploitation des bassins.

### Qualité de l'interface eau-sédiment

L'analyse factorielle discriminante réalisée sur la matrice des 9 paramètres x 127 observations (fig. 5) a montré que les deux premiers axes factoriels représentaient respectivement 40 et 20 % de la variabilité.

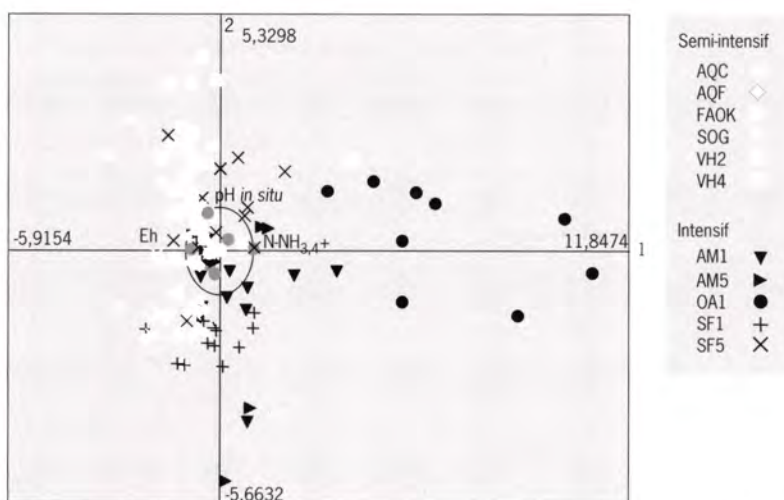


Figure 5 - Cercle de corrélation et plan factoriel 1-2 de l'AFD menée sur les 9 variables (perte au feu totale, matière organique, densité, porosité, pH, teneur en eau, pH *in situ*, N-NH<sub>3,4</sub><sup>+</sup>, potentiel d'oxydo-réduction (Eh) et les 127 observations de l'interface eau-sédiment.

La première composante principale, fortement corrélée à la concentration en ammoniac et inversement corrélée au potentiel d'oxydoréduction, traduit l'opposition entre les deux paramètres. La seconde composante est corrélée au pH relevé *in situ*. La position des individus permet de distinguer deux groupes en fonction de l'axe horizontal : les individus issus du système intensif, fort producteur de déchets et les individus issus du système semi-intensif avec une plus faible production de déchets. La seconde composante principale, dont l'importance est deux fois moindre, permet de dissocier les bassins au sein de l'un des deux systèmes : intensif et semi-intensif. Dans le cadre du système semi-intensif, les bassins d'une même ferme (VH et AQ) ont des caractéristiques proches suggérant ainsi un effet ferme. Il est à noter généralement une plus faible variabilité intra-bassin pour les bassins semi-intensifs que pour les bassins intensifs. Les sédiments des bassins intensifs se révèlent plus dégradés (pH *in situ*, ammoniac, potentiel d'oxydoréduction) en fin d'élevage que les bassins semi-intensifs. L'intensification pourrait être à l'origine de conditions stressantes des animaux en élevage, d'autant plus dangereuse qu'elle cumule les facteurs négatifs.

## Environnement bassin et vibriose dans des élevages de crevettes de saison chaude en Nouvelle-Calédonie : résultats préliminaires du programme Désans

H. Lemonnier et le personnel du LAC

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Hugues.Lemonnier@ifremer.fr

### Résumé

Le syndrome d'été est une pathologie qui affecte les élevages sur une ferme de crevettes de Nouvelle-Calédonie pendant la phase de grossissement de saison chaude. Cette maladie correspond à une vibriose septicémique due à *Vibrio nigripulchritudo* et s'exprime après 50 jours d'élevage. Un suivi (i) des conditions environnementales, (ii) des caractéristiques biologiques, physiologiques et immunitaires des crevettes, (iii) et du pathogène a été réalisé au cours de l'été austral 2002-2003, sur deux fermes, l'une présentant des problèmes de mortalité (ferme A), l'autre non (ferme B). Pour le « suivi environnement », l'objectif était de chercher au cours de l'élevage les conditions qui risquaient d'être défavorables pour la crevette et/ou favorables pour le développement du pathogène et/ou de sa virulence. Ce papier décrit la méthodologie employée pour le suivi de l'environnement et les premiers résultats. Ils concernent l'évolution des valeurs de différentes variables mesurées au cours de l'élevage, leur variabilité instantanée (spatiale et temporelle) sur la colonne d'eau et à l'interface eau-sédiment. Quel que soit le compartiment étudié, l'évolution des paramètres est généralement similaire dans les deux bassins mais avec des amplitudes de variations plus importantes sur la ferme A. Les bassins se distinguent par une différence de concentration en azote organique dissous et par un plus fort déséquilibre du rapport N/P dans la colonne d'eau sur la ferme A.

### Abstract

The "summer syndrome" is a pathology which affects the shrimp livestock during the phase of growth. This disease corresponds to a septicemic vibriosis due to *V. nigripulchritudo*. It is expressed after 50 days of rearing. During the 2002-2003 summer, a field survey about evolutions of (1) the pond ecosystem, (2) the biological characteristics, physiological and immunological status of the shrimps and (3) the pathogen was conducted on two farms, one being affected by the disease (farm A) as the other one is not (farm B). The aim of the environmental study was to look after the environmental parameters which may be stressful for the shrimps and/or favourable to the pathogen growth and/or its virulence. This paper describes the methodology and shows the first results. It will concern evolution of environmental parameter values, spatial variability, daily variability of the water column and evolution and variability of the sediment parameters at the interface with water (first cm). Whatever the compartment, water or sediment, both ponds



present relatively similar profiles. However, a higher variability of the values is observed in farm A. The difference between ponds is linked to higher dissolved organic nitrogen concentrations and an imbalance of the N/P ratio in the water column in farm A compared to farm B.

## **Introduction**

---

Le syndrome d'été est une pathologie qui affecte depuis 1998 tous les élevages de saison chaude sur une ferme de crevettes de Nouvelle-Calédonie pendant la phase de grossissement (Goarant *et al.*, 2003). Les processus qui conduisent à l'émergence de cette maladie sont aujourd'hui mal connus, rendant toute prédiction et toute recherche de solutions problématiques. Cette pathologie résulterait à la fois de conditions environnementales particulières (découlant des pratiques culturales, de la saison et de la météorologie du moment), de la présence et de la virulence de pathogènes, ainsi que de l'état physiologique de la crevette. Dans le cadre du programme Désans, on se propose de procéder à une étude globale du système d'élevage en prenant en compte les trois compartiments: environnement, pathogène et crevette. Par étude globale, nous entendons des recherches dont l'objet est le fonctionnement de l'ensemble du système d'élevage et qui prennent en compte les phénomènes perceptibles et significatifs à l'échelle du bassin (Amanieu *et al.*, 1989). Une campagne d'observation a été menée en parallèle sur les trois compartiments au cours de la saison chaude 2002-2003. L'objectif général était d'expliquer le pourquoi de l'apparition de la maladie et d'élaborer un scénario de la dynamique du phénomène dans son ensemble. Pour l'étude de l'environnement, une stratégie d'échantillonnage des variables chimiques et biologiques a été mise en place (i) afin de recueillir le maximum d'information quant à leur variabilité spatio-temporelle, variabilité qui pouvait être considérée comme source de stress pour les animaux en élevage et/ou favoriser l'émergence du pathogène (Sung *et al.*, 2001) et (ii) pour l'étude des processus écologiques.

## **Matériel et méthodes**

---

### **Sites d'étude et zootechnie**

La campagne d'observation a été menée simultanément sur deux sites, l'un présentant un fort risque d'apparition de la maladie (ferme A), l'autre pas (ferme B). Après 5 mois d'assez, les bassins d'environ 3 ha ont été mis en eau le 1<sup>er</sup> octobre 2002 (J-17). Ils ont étéensemencés le 18 octobre 2002 (J0) avec le même lot de post-larves (*Litopenaeus stylirostris*). La densité initiale était de 28 animaux.m<sup>-2</sup> pour la ferme A et de 35 animaux.m<sup>-2</sup> pour la ferme B. Les animaux ont été nourris avec le même aliment commercial (35 à 40 % de protéine). La gestion quotidienne était assurée par les éleveurs sans aucune intervention de l'équipe scientifique. L'eau des bassins a été renouvelée quotidiennement. Les bassins ont été fertilisés avec de l'urée (230 kg pour la ferme A distribués entre J10 et J30; 200 kg pour la ferme B distribués entre J16 et J0). Les deux bassins étaient aérés (AirO<sub>2</sub> et Paddlewheel).



### Choix des paramètres

Le tableau liste les variables de la colonne d'eau et indique pour chacune d'elles l'objectif recherché. Pour les paramètres sédimentaires, il a été étudié le pH *in situ*, le redox, l'ammoniaque dans l'eau interstitielle, le carbone total, l'azote total, le phosphore total ainsi que la composition de la méiofaune.

Listing des variables des différents compartiments étudiés en fonction de l'objectif recherché.

Paramètres suivis	Évolution temporelle, min. et max.	Variabilité spatiale	Variabilité journalière	Stratification	Cycles 24 h	Suivi en continu	Étude des processus
<b>Physico-chimie</b>							
Température	X	X	X	X	X	X	X
Oxygène	X	X	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X	X	X
Conductimétrie	X	X	X	X			X
Redox	X	X	X	X		X	X
Turbidité	X	X	X	X		X	X
<b>Le « particulaire »</b>							
MES	X	X	X	X	X		X
MOP	X	X	X	X	X		X
MM	X	X	X	X	X		X
Carbone				X			X
Azote				X			X
<b>Les sels nutritifs</b>							
N-NH <sub>3,4</sub> <sup>+</sup>	X	X	X	X	X		X
N-NO <sub>2</sub> <sub>2</sub>	X	X	X	X			X
N-NO <sub>3</sub> <sub>3</sub>				X			X
P-PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	X	X		X			X
S <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sub>2</sub>				X			X
<b>La matière organique dissoute</b>							
MOD				X			X
COD				X			X
NOD				X			X
<b>Le compartiment phytoplanctonique</b>							
Abondance par genre				X			X
Comptage en cytométrie				X			X
Chl <i>a in vivo</i>	X	X	X	X			X
Chl <i>a</i> totale	X	X	X	X	X		X
Chl <i>a</i> < 2 µ	X			X			X
2 µ < Chl <i>a</i> < 20 µ	X			X			X
Chl <i>a</i> > 20 µ	X			X			X
Pigments							X
<b>Le compartiment zooplanctonique</b>							
Abondance par ordre							X
<b>Le compartiment bactérien</b>							
Abondance				X			X
Production				X			X
Concentration en pathogène				X			X

MES: matières en suspension; MOP: matière organique particulaire; MM: matière minérale; Chl *a*: chlorophylle *a*.

### Stratégie d'échantillonnage

L'eau a été prélevée sur trois stations en surface et au fond à environ 5 cm de la surface du sédiment chaque jour, à 6h00 et à 16h00, en alternance sur la ferme A et sur la ferme B avec pour objectifs l'étude de la variabilité temporelle, la recherche des valeurs minimales et maximales et l'étude de la variabilité journalière. Sur les prélèvements de l'une de ces trois stations (dénommée station de référence), un suivi temporel plus approfondi de la colonne d'eau a été réalisé pour permettre l'étude de certains processus écologiques. Trois stations supplémentaires ont été échantillonnées une fois par semaine sur chaque ferme pour étudier la variabilité spatiale. Des suivis en continu sur la station de référence ont été réalisés en surface et au fond sur la ferme A. Pour des raisons techniques, ce suivi n'a pu être réalisé sur la ferme B, excepté pour la température. Toutefois, des suivis discrets ont été réalisés à J11, J32, J46 et J60 sur la ferme A et à J12, J33, J47 et J61 sur la ferme B. Les prélèvements ont eu lieu toutes les 4 heures sur une durée de 28 heures à chaque cycle. Le sédiment (premier centimètre) a été prélevé une fois par semaine sur chaque ferme sur six stations afin d'étudier sa variabilité spatiale et son évolution.

### Résultats

#### La zootechne

Les premières mortalités ont été observées à J50 à un poids moyen de 5,8 g sur le bassin de la ferme A et ont été importantes autour de J59 et de J77 (fig. 1). Le syndrome d'été ne s'est pas exprimé sur la ferme B. La survie finale a été respectivement sur les fermes A et B de 27 % et de 62 %. La quantité d'aliment distribuée à J50 était similaire sur les fermes et d'environ de 200 kg pour une quantité totale cumulée distribuée depuis le début de l'élevage d'environ 5 tonnes par bassin.

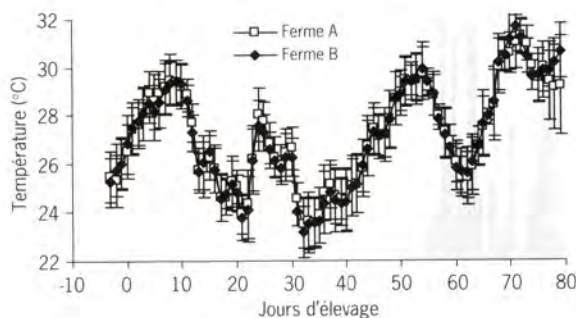


Figure 1  
Évolution de la température moyenne journalière (N = 96) sur les deux fermes au niveau de la station de référence, surface et fond (mesures en continu). L'histogramme comptabilise le nombre de mortes observées sur le bord du bassin de la ferme A chaque matin.

#### La colonne d'eau

La maladie s'est déclarée à une période où la température de l'eau était élevée (fig. 1). La moyenne journalière était de 28,8 °C. La figure 2A montre l'évolution des concentrations moyennes journalières en oxygène. Les écarts types augmentent entre J40 et J50, dénotant ainsi une augmentation de la variabilité. À partir de J40, les valeurs d'O<sub>2</sub> matinales sont plus faibles sur la ferme A (fig. 2B) et l'amplitude des variations matin - soir y est plus élevée que sur la ferme B (fig. 2C). Présentée

de manière cumulée (fig. 2D), on note deux ruptures de pente pour la ferme A : entre J20 et J30 et entre J50 et J60. La fig. 2E présente l'évolution de la variance pour les valeurs du fond à 06 h 00. Cette variance est généralement supérieure sur la ferme A. Toutefois, cette source de variabilité peut être considérée comme faible comparativement à la variabilité temporelle et à la variabilité journalière. La stratification (fig. 2F) est plus variable sur la ferme A que sur la ferme B. Toutefois, elle reste relativement faible avec des écarts entre la surface et le fond inférieurs à 0,5 mg.l<sup>-1</sup>.

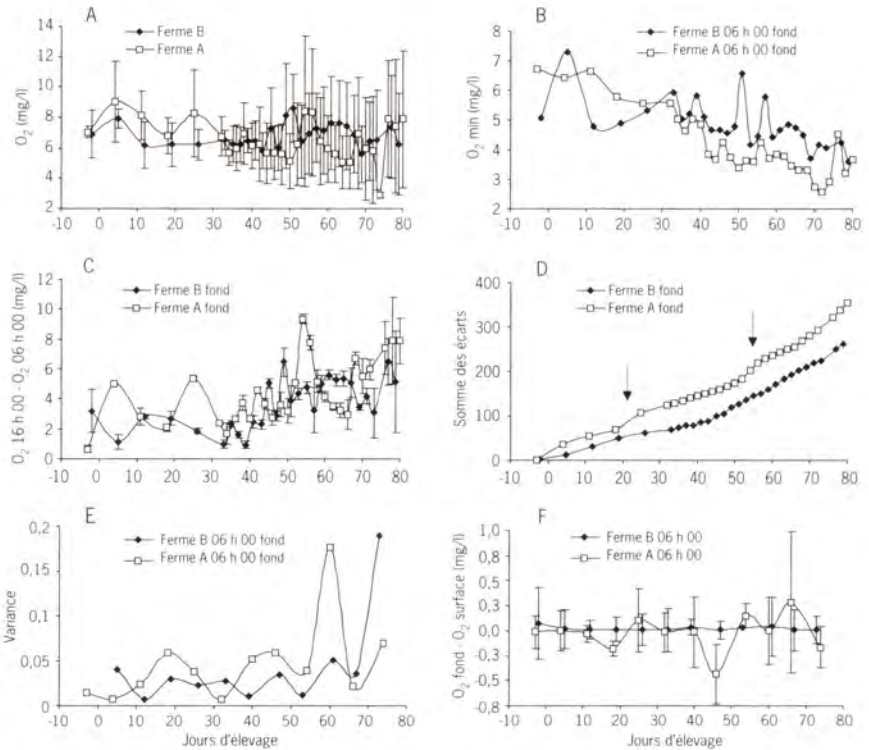


Figure 2 - Evolution (A) des concentrations moyennes en oxygène (N = 12), (B) des minima sur le fond des bassins (N = 3), (C) des écarts moyens soir - matin (N = 12), (D) de la somme des écarts soir-matin, (E) de la variance à 6 h 00 sur le fond des bassins (N = 6) et (F) des écarts moyens fond-surface à 06 h 00 (N = 6).

Pour les sels nutritifs dissous, la variabilité liée à l'évolution temporelle est prédominante. Trois pics d'azote minéral, composé en moyenne de 83 % de N-NH<sub>3,4</sub>+ (fig. 3A), ont été observés sur la ferme A à J36, J50 et J64 et pas sur la ferme B. Ils sont concomitants à une forte augmentation des rapports N/P (fig. 3B). Les profils de concentrations en N organique dissous (fig. 3C) sont similaires entre les deux fermes mais les valeurs sont généralement plus élevées sur la ferme A (autour de 30 µM contre 20 µM sur la ferme B). L'évolution générale des paramètres liés à la matière organique particulaire (C, N, MOP) est la même sur les deux bassins. La figure 3D présente l'évolution de l'azote particulaire. Les valeurs absolues et l'amplitude des variations d'un jour sur l'autre sont plus fortes sur la ferme A que

sur la ferme B. Cette évolution est à relier à celle de la biomasse chlorophyllienne avec des pics de concentrations sur la ferme A à J44, J56 et J80 (fig. 4A) qui ont atteint des valeurs supérieures à  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pour ce paramètre, la variabilité liée à l'évolution temporelle est prédominante. L'apparition des mortalités sur la ferme A est concomitante d'une forte croissance phytoplanctonique et d'une augmentation du rapport C/N (fig. 4B). Ces rapports évoluent de manière significative à partir de J55. Le nombre de rotifères (fig. 5A) augmente à J57 et J77 sur la ferme B au moment où les concentrations en chlorophylle *a* sont les plus fortes. Les copépodes (fig. 5B) apparaissent dans la colonne d'eau dès J30 pour la ferme A et dès J40 pour la ferme B.

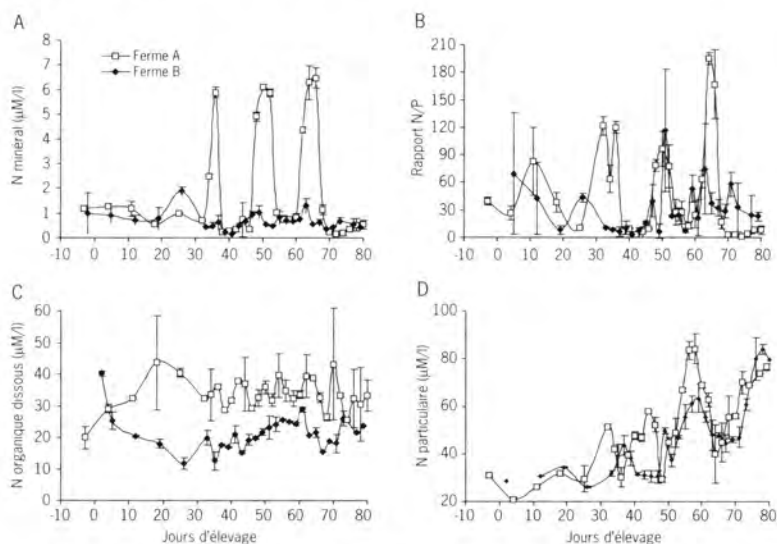


Figure 3 - Évolution des concentrations en azote minéral (A), du rapport N/P (B), des concentrations en azote organique (C) et en azote particulaire (D) dans la colonne d'eau des deux bassins au niveau de la station de référence. Les symboles représentent les moyennes entre surface et fond et les barres les écarts types.

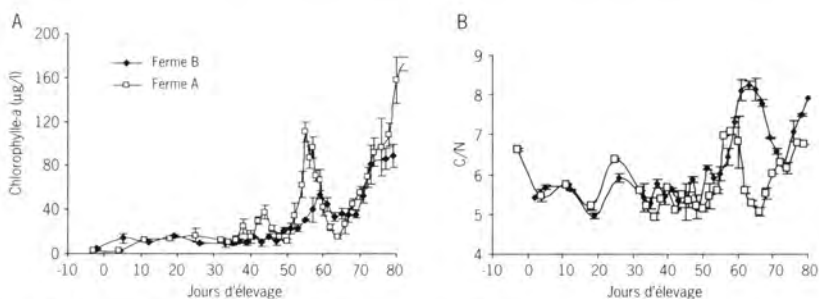


Figure 4 - Évolution de la chlorophylle *a* (A) et du rapport C/N (B). Les symboles représentent les moyennes (N = 12) et les traits les écarts types.



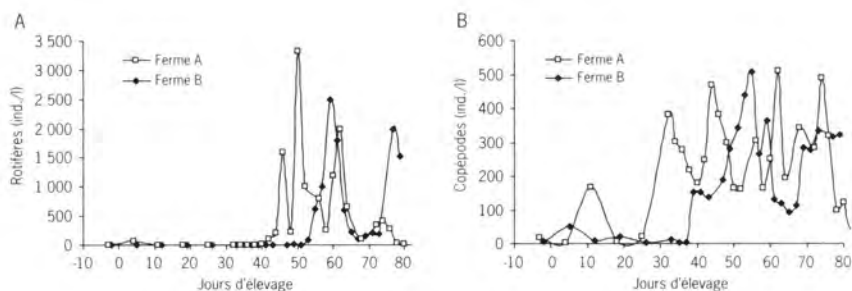


Figure 5 - Évolution du nombre de rotifères (A) et de copépodes (B) au niveau de la station de référence.

### L'interface eau-sédiment

Les valeurs moyennes du pH *in situ* (fig. 6A) sont plus faibles sur la ferme A entre J0 et J50 puis deviennent similaires avec celles de la ferme B par la suite. Après J50, les concentrations moyennes en azote ammoniacal (fig. 6B) sont plus élevées sur la ferme A que sur la ferme B. On note un enrichissement des sédiments en azote (fig. 6C) au cours de l'avancement de l'élevage pour les deux bassins. Il s'accompagne aussi d'une baisse du rapport C/N pour atteindre une valeur moyenne comprise entre 7,3 (ferme B) et 8,1 (ferme A) autour de J50. Les concentrations en phosphore total (fig. 6D) sont plus fortes sur la ferme B que sur la ferme A quelle que soit la date d'échantillonnage.

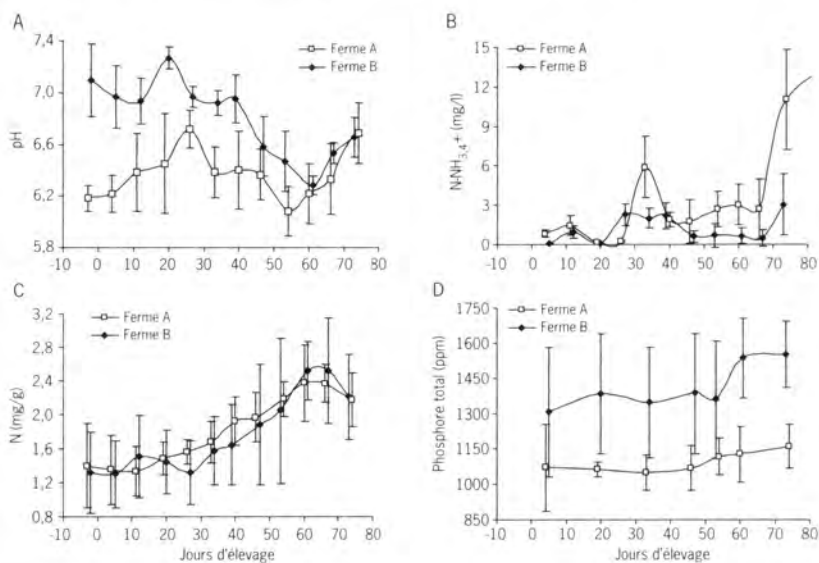


Figure 6 - Évolution de pH *in situ* (A), de la concentration en  $N-NH_{3,4}^{+}$  dans l'eau interstitielle (B), en azote total (C) et en phosphore total (D) dans le premier centimètre du sédiment. Les symboles représentent les moyennes et les barres les écarts types.

## Discussion et conclusion

La démarche comparative entreprise dans cette étude a réussi puisque, sur la ferme témoin, nous n'avons pas observé de mortalité type syndrome d'été alors que, sur la ferme habituellement affectée, le déroulement des mortalités a été similaire à ce qui a été observé au cours des années précédentes (Brock, 2000; Goxe, 2001; Lemonnier *et al.*, 2002, 2003a; Goarant *et al.*, 2003). En effet, la première mortalité apparaît généralement à un poids moyen d'environ 5 g pour une biomasse inférieure à 1 500 kg.ha<sup>-1</sup> et en moyenne après 53,4 jours d'élevage (Brock, 2000). La survie était en moyenne sur les élevages de 1998, 1999, 2000 et 2001 de 33,5 %, de 37,4 %, de 25,5 % et de 22,4 % (Goxe, 2001) et donc comparable à celle obtenue sur le bassin suivi dans la présente étude.

Les vibrioses chez les pénéides sont généralement connues comme une infection secondaire à la suite d'un stress et/ou d'un problème environnemental et/ou d'une forte concentration en bactéries potentiellement pathogènes (Nash *et al.*, 1992; Mohney *et al.*, 1994; Ruangpan *et al.*, 1995). La variabilité d'un milieu d'élevage peut être considérée comme source de stress pour les animaux et/ou favoriser l'émergence du pathogène (Sung *et al.*, 2001). Deux suivis conduits sur la ferme A en 2001 et 2002 ont montré une augmentation de la variabilité spatiale et journalière du milieu d'élevage, un enrichissement organique du système et une forte augmentation de la biomasse chlorophyllienne parallèlement à l'apparition des mortalités (Lemonnier *et al.*, 2002, 2003a). Dans le cadre de ce suivi, nous retrouvons ces mêmes résultats sur la ferme A comme sur la ferme B. Toutefois, s'il existe de fortes similitudes dans l'évolution de beaucoup de variables, les amplitudes de variations sont supérieures sur la ferme A (chlorophylle *a* et azote particulaire). Nous retrouvons aussi une plus forte variabilité journalière sur cette même ferme pour l'oxygène dissous, paramètre sensible pour les animaux en élevage. Ces premiers résultats montrent une variabilité essentiellement d'origine temporelle et journalière comme observé par Burford (1997). Les autres sources de variabilité ne devront cependant pas être négligées comme, par exemple, la stratification de la colonne d'eau et la variabilité spatiale qui avaient été mises en évidence pour les variables sestoniques sur la ferme A pendant les mortalités (Lemonnier *et al.*, 2002).

La température est citée comme un facteur important pour expliquer le déclenchement des vibrioses: chute de température dans le cas du Syndrome 93 (Goarant, 2000) ou augmentation au-delà d'un seuil dans le cas des mortalités estivales d'huîtres en France (Samain *et al.*, cet ouvrage). Colwell (1983) a également mis en évidence une corrélation entre la présence de *V. parahaemolyticus* dans la baie de Chesapeake et une température hivernale comprise entre 10 et 14 °C (Chowdhury *et al.*, 1990). Dans le cadre du syndrome d'été, le rôle potentiel de la température n'est pas clair. En effet, contrairement à ce qui avait été observé en 2001 sur la ferme A où une chute de température de 5 °C en 48 h avait été enregistrée juste avant l'apparition des premières mortes (Lemonnier *et al.*, 2003a), les mortalités se sont déclenchées à la suite d'une augmentation de température. Une analyse des données historiques devrait permettre de mieux décrire l'effet et la gamme de températures pour laquelle se déclare cette pathologie.

Si on observe une évolution similaire de la biomasse phytoplanctonique dans les deux bassins, l'évolution du rapport N/P et des concentrations en ammoniacque est beaucoup plus fluctuante sur la ferme A. Burford (1997) indique, dans le cadre d'élevages de crevettes, que ces changements coïncident avec un changement de la structure phytoplanctonique. L'évolution des rapports C/N suggère une nature différente des populations entre les deux fermes au moment des mortalités. Le suivi zooplanctonique montre une prolifération des rotifères précédant l'apparition des mortalités sur la ferme affectée. Le rôle du zooplancton comme hôte des *Vibrio* dans l'environnement a été décrit par Montanari *et al.* (1999): ainsi, *V. alginolyticus* est facilement cultivable à partir du zooplancton de grande taille (>200 µm copépodes et tuniqueés dans l'Adriatique. *Vibrio vulnificus* a été associé au plancton de petite taille comprenant les tintinnides, les nauplii de crustacés et les exuvies de copépodes. L'hypothèse d'une association zooplancton-pathogène devra être explorée. Le suivi des sédiments montre un enrichissement organique similaire sur les deux fermes. Toutefois, des pH *in situ* plus faibles et des concentrations en ammoniacque plus élevées ont été observés sur la ferme A. Ces paramètres sont susceptibles d'être des facteurs de stress pour les animaux en élevage (Cochard *et al.*, 1997; Legrand *et al.*, in prep). En 2002, les plus fortes mortalités avaient été observées pour des concentrations en ammoniacque [(NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)-N] supérieures à 6 mg/l (Lemonnier *et al.*, 2003a). Il est à noter des concentrations en phosphore total plus fortes sur la ferme B que sur la ferme A.

Il est aujourd'hui beaucoup trop tôt pour décrire un scénario précis conduisant à l'expression de cette maladie. On peut toutefois indiquer que les variations et les valeurs absolues de beaucoup de variables considérées comme stressantes pour les crevettes sont plus importantes dans le bassin dans lequel s'est développée la maladie.

### Remerciements

Ce travail est en partie financé par les Provinces Nord et Sud de Nouvelle-Calédonie. Les auteurs remercient A. Herbland, C. Bacher, H. Chartois, G. Guillou, J. Hussenot, L. Joassard et J.L.M. Martin du Crema L'Houmeau, J.P. Torréton, S. Jacquet, S. Chifflet et P. Gérard de l'IRD Nouméa pour l'aide méthodologique et technique apportée et les fermiers et leur personnel pour leur accueil et leur aide (surtout par 25 nœuds de vent).

## Vers une étude épidémiologique des vibrioses

M. Gay, D. Saulnier, N. Faury, F. Le Roux

Ifremer, laboratoire de génétique et pathologie, 17390 La Tremblade, France  
Frederique.Leroux@ifremer.fr

### Résumé

Les vibrioses sont les infections bactériennes les plus courantes chez les espèces marines d'intérêt aquacole. Certaines espèces sont pathogènes et ont été associées à d'importantes pertes économiques pour l'industrie aquacole en Europe et dans le Pacifique. L'objectif principal de notre projet de recherche est de développer des outils diagnostiques pertinents permettant d'évaluer l'impact des vibrioses sur le terrain et en éclosérie. Le problème majeur est l'extraordinaire diversité des espèces appartenant à ce genre bactérien, compliquant considérablement leur caractérisation en termes de spéciation et de virulence. Nous développons une double approche pour corrélérer le phénotype et le génotype de pathogènes potentiels par : 1) une clarification taxonomique des souches de *Vibrio*, déterminant si certaines espèces sont systématiquement associées à des maladies ; 2) une caractérisation des mécanismes de virulence, recherchant les gènes supports de la pathogénèse. Notre approche sera illustrée par l'exemple de l'étude de souches de *Vibrio splendidus*, pathogènes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les marqueurs génétiques ou de virulence mis au point pourront alors être utilisés pour une étude épidémiologique de ces maladies.

### Abstract

Vibriosis is the main bacterial disease affecting farmed fish, shellfish and crustacea. A wide variety of *Vibrio* species are the cause of disease and the associated mass mortalities are the source of major economic loss to aquaculture industries both in Europe and the Pacific region. The project seeks to develop better tools for disease diagnosis and improved means to evaluate the impact of vibriosis on farmed marine animals. A major problem is the enormous diversity of *Vibrio* species associated with disease which leads to difficulties in identification and the determination of their pathogenic capacity. We propose a double approach to correlate the phenotype and genotype of potential pathogens by: 1) taxonomic clarification of the *Vibrio* genus to determine if specific strains are associated with disease; and 2) by evaluating likely virulence mechanisms by characterising the genes implicated in pathogenesis. Acquisition of improved diagnostic tools will be of major benefit in disease management, health surveillance and monitoring and will contribute to maintaining sustainable aquaculture industries.

### Introduction

L'émergence de nouvelles vibrioses associées à des mortalités d'animaux marins est un sujet de plus en plus préoccupant en raison des pertes économiques qu'elles impliquent et du manque de connaissances sur ces pathogènes (Harvell *et al.*, 1999).



En Nouvelle-Calédonie, la production de crevettes a débuté à la fin des années 1970. Son expansion a été rapide et spectaculaire jusqu'en 1993, année au cours de laquelle une pathologie saisonnière à caractère épizootique a fait son apparition dans les élevages de saison fraîche (Boemare *et al.*, 1978; Goarant *et al.*, 1999). Cette maladie, qui a reçu le nom de Syndrome 93, a pu être attribuée à une bactérie, *Vibrio penaeicida*. Les contraintes induites, principalement l'abandon des élevages de saison fraîche, ont entraîné une baisse de la production, malgré l'augmentation des surfaces exploitées. Ce n'est qu'en 1995 que la production annuelle a rattrapé et dépassé le niveau atteint en 1992, et à partir de 1998 que les rendements ont dépassé ceux atteints en 1992. Toutefois, c'est également au cours de cette année 1998 qu'une nouvelle pathologie bactérienne, attribuée à un autre *Vibrio* (*Vibrio nigripulchritudo*), a fait son apparition sur une ferme de production dont elle menace sérieusement la survie économique. Cette nouvelle maladie, si elle devait se généraliser à l'ensemble des sites de production, risquerait fort de conduire la filière aquacole de Nouvelle-Calédonie à la banqueroute.

Chez les mollusques, les *Vibrios* apparaissent comme le genre bactérien le plus impliqué dans des épisodes de mortalités dues à des infections bactériennes. Dans la plupart des cas, ces vibrioses surviennent au stade larvaire et en éclosion (Tubiash *et al.*, 1965; Brown & Losee, 1978; Disalvo *et al.*, 1978; Elston & Leibovitz, 1980a,b; Jeffries, 1982; Hada *et al.*, 1984). *Vibrio pectenecida*, par exemple, est un pathogène des larves de coquille Saint-Jacques (Lambert *et al.*, 1998). Une souche de *Vibrio splendidus* biovar II a été associée à des mortalités de larves d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* (Sugumar *et al.*, 1998). D'autres souches apparentées à *V. splendidus* ont été associées à des mortalités de larves de coquilles Saint-Jacques (Nicolas *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1999).

Uniquement deux espèces de *Vibrio* ont pour le moment été clairement définies comme pathogènes de mollusques adultes : *Vibrio tapetis* et *Vibrio harveyi*. *V. tapetis*, agent causal de la maladie de l'anneau brun, est responsable depuis quelques années de mortalités massives chez la palourde japonaise adulte. Si la pathogénèse associée à ce *Vibrio* a fait l'objet de plusieurs publications (Paillard & Maes, 1990; Oubella *et al.*, 1994; Paillard *et al.*, 1994; Borrego *et al.*, 1996a,b; Allam *et al.*, 2000a,b), les mécanismes de virulence impliqués font encore l'objet d'études. *Vibrio harveyi/carchariae* a été associé à une épizootie récente d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) en éclosion. Ce *Vibrio*, pathogène de plusieurs poissons marins et de crevettes, est probablement à l'origine des mortalités massives d'ormeaux dans le milieu naturel sur les côtes bretonnes (Pedersen *et al.*, 1998; Nicolas *et al.*, 2002). Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité de naissains d'huître creuse (60 à 100 %) sont observés régulièrement en milieu naturel et en éclosion. Cette « mortalité estivale » ne peut s'expliquer par l'unique intervention d'un agent infectieux (épizootie) et la piste d'une étiologie multifactorielle (environnement, hôte, pathogène) est à privilégier (Gouletquer *et al.*, 1998). Plusieurs observations nous ont conduits à caractériser la flore vibriocécée isolée de naissain de *C. gigas* subissant des épisodes de mortalités estivales : i) de nombreux cas de mortalité d'huîtres sont associés à des infections bactériennes principalement au stade larvaire et en éclosion. Le genre *Vibrio* apparaît le plus fréquemment impliqué dans ces phénomènes ; ii) deux souches de *V. splendidus*, potentiellement pathogènes de naissains de *C. gigas*, ont été isolées de naissains subissant des mortalités estivales dans deux régions françaises distinctes (Lacoste *et al.*, 2001; Waechter *et al.*,

2002); iii) des concentrations anormalement élevées de *Vibrios* ont été détectées dans l'hémolymphe d'animaux subissant des mortalités estivales. Ces *Vibrios* sont en général très diversifiés chez les survivants alors, que chez la majorité des moribonds, une souche apparaît dominante (Nicolas, comm. pers.).

L'étude du rôle des *Vibrios* dans les mortalités de *C. gigas* est confrontée à deux problèmes majeurs : leur identification en terme d'espèce et la caractérisation de leur statut vis-à-vis de l'hôte, commensaux, opportunistes ou pathogènes. Dans le cas des souches apparentées à *V. splendidus*, les outils de classification des *Vibrios* (tests biochimiques proposés par Alsina & Blanch, 1994) ne sont pas utilisables en raison de la variabilité/versatilité des phénotypes des souches environnementales et du nombre important d'espèces en cours de description (Le Roux *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2001, 2003a,b). La taxonomie des espèces appartenant à ce groupe doit être clarifiée par une approche polyphasique. De plus, si les *V. splendidus* semblent très répandus dans le milieu marin, peu de souches semblent virulentes (Le Roux *et al.*, 2002; Gatesoupe *et al.*, 1999). L'infection expérimentale est actuellement le seul moyen de définir la pathogénicité des souches isolées. Cependant, l'animal n'étant pas domestiqué, des problèmes de reproductibilité sont à prendre en compte.

Si les *Vibrios* apparaissent comme les bactéries les plus importantes dans les infections d'espèces aquacoles, des problèmes d'identification ne sont pas encore élucidés. Le développement d'outils de caractérisation basés sur la spécification mais aussi sur la virulence des souches est une étape préliminaire essentielle à une étude épidémiologique de l'impact de ces bactéries sur les élevages ou à toute démarche prophylactique. Les objectifs de ce projet sont donc : i) de clarifier la taxonomie des *Vibrios* isolés d'espèces d'intérêt aquacole subissant un épisode de mortalité; ii) de clarifier leur rôle dans la pathogénèse : pathogène ou opportuniste ? iii) de décrire au niveau cellulaire et moléculaire les mécanismes de pathogénicité; iv) de développer des outils diagnostiques spécifiques des souches virulentes.

## Résultats

### Origine de la collection de *Vibrios* isolés de *C. gigas*

Au cours de l'été 2001, des animaux vivants voisins d'huîtres creuses subissant des mortalités estivales et provenant de différents sites géographiques ont été placés en aquarium avec des animaux de l'écloserie de l'Ifremer (sains) pour des expériences de cohabitation. Dans 9 cas sur 12, une transmission du syndrome « mortalité » a été observée, laissant supposer une origine infectieuse du phénomène. Dans 6 cas sur 9 le virus herpes OHV, autre agent infectieux associé aux mortalités estivales, n'a pas été détecté. Un isolement de la flore vibrionacée a été effectué à partir d'hémolymphe d'huîtres moribondes des 6 expériences sélectionnées précédemment. Quatre colonies de chaque type morphologique ont été prélevées au hasard et repiquées deux fois pour purification des souches. Nous avons ainsi isolé 125 souches de *Vibrio*.

### Taxonomie des souches isolées de *C. gigas* par une approche polyphasique

Ces souches ont été caractérisées par une approche polyphasique : phylogénie moléculaire des gènes 16S, *gyrB* voire *rpoD*, hybridation ADN/ADN et phénotypage basé sur 31 tests biochimiques. Cette étude a montré que la majorité des *Vibrios*



isolés d'animaux sains ou malades partagent le même phénotype que *V. splendidus* mais appartiennent en fait à un groupe polyphylétique incluant les espèces *V. lentus*, *V. splendidus*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, *V. tasmaniensis* et au moins un nouveau taxon à définir (fig. 1) (Le Roux *et al.*, sous presse). La taxonomie basée sur la phylogénie du gène *gyrB*, contrairement au gène 16S, est congruente avec les hybridations ADN/ADN, technique de référence en systématique bactérienne (Grimont, 1984). L'étude de ce gène permet une meilleure discrimination et donc une identification des souches apparentées à *V. splendidus*.

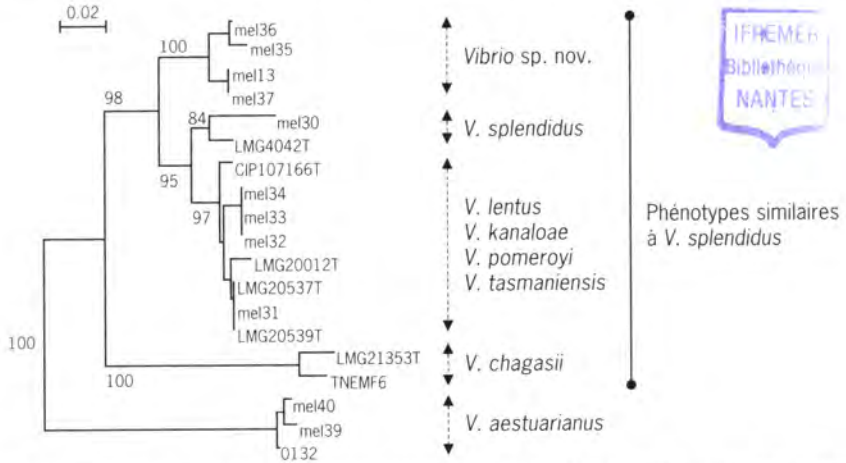


Figure 1 - Analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène *gyrB* de souches apparentées à *Vibrio splendidus* sur la base de 31 tests biochimiques. Des souches appartenant à *V. aestuarianus* sont utilisées comme groupe externe. Les séquences (1 248 pb) ont été alignées par le programme clustalW-bioedit, l'analyse est réalisée par la méthode Neighbour joining, les bootstraps sont basés sur 1 000 répliqués.

### Criblage des souches virulentes en pathologie expérimentale

En raison du grand nombre de souches à étudier, un premier criblage a été effectué en regroupant par 4 des souches isolées d'une même expérience de cohabitation. Ces groupes de souches ont été injectés dans le muscle adducteur de palourdes puis d'huîtres creuses (au total :  $4 \cdot 10^7$  CFU). Seize souches (4 groupes de 4) ont ainsi été sélectionnées pour un second criblage dans l'huître. Elles ont été classées en trois catégories selon les taux de mortalité cumulés obtenus au bout de 3 jours (fig. 2) : virulence faible (< 10 %, n = 3), virulence moyenne (< 30 % ; n = 12), virulence forte (> 50 % ; n = 1). Curieusement, certaines souches injectées en couple ( $2 \cdot 10^7$  CFU +  $2 \cdot 10^7$  CFU) présentent une plus forte virulence. Des études statistiques basées sur quatre expériences effectuées en triplicats ont été menées pour le couple Mel 31 et Mel 32 qui a été retenu comme modèle d'étude en raison de la reproductibilité des résultats obtenus (Gay *et al.*, soumis). Ces souches entraînent toujours des mortalités de naissain quand elles sont injectées ensemble quel que soit l'état de l'hôte (pathogène) alors que leur virulence individuelle varie selon la sensibilité des huîtres (opportuniste).

### Histopathologie du couple modèle Mel 31 + Mel 32

Des expériences d'injection en intrapalléale ont confirmé l'effet pathogène de ces souches. Des études en histologie ont montré que dans les deux cas (injection

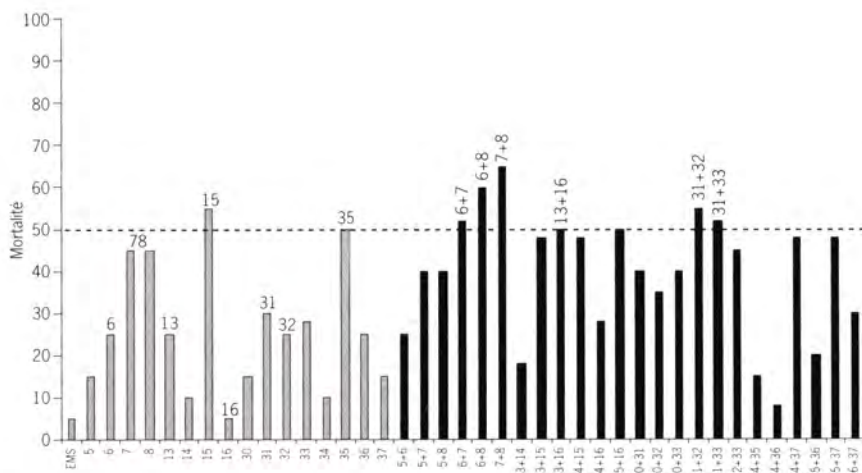


Figure 2 - Taux de mortalité cumulés 3 jours après injection à des juvéniles de *C. gigas* en intramusculaire d'une (grisé) souche ( $4.10^7$  CFU/animal) ou de deux (noir) souches de *Vibrio* ( $2.10^7 + 2.10^7$  CFU/animal).

intramusculaire ou intrapalléale) les bactéries Mel 31 et/ou Mel 32 entraînent de fortes altérations des fibres musculaires et qu'elles sont localisées principalement au pourtour du muscle. Ce résultat a été confirmé en microscopie électronique. Par contre, un effet différentiel entre Mel 31 et Mel 32 sur les hémocytes a été observé. L'injection de Mel 31 est associée à la présence d'hémocytes à noyaux anormaux alors que Mel 32 semble entraîner une forte infiltration d'hémocytes apparemment normaux dans le muscle (Gay *et al.*, en préparation).

### Sécrétion d'homosérine lactone

Depuis une dizaine d'années, un grand nombre de travaux a montré l'existence d'une communication entre bactéries, contrôlée par la densité cellulaire et régulant des fonctions biologiques importantes comme la bioluminescence, la sporulation, la conjugaison, la virulence et la formation de biofilm. Ce phénomène appelé « quorum sensing » est médié par des molécules diffusibles appelées phéromones (Kaprelyants & Kell, 1996; Wirth *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1997; Fuqua & Greenberg, 1998; Bassler, 2002). Chez les bactéries Gram négatif, les phéromones isolées jusqu'à présent appartiennent au groupe des homosérines lactones.

Plusieurs résultats nous permettent de supposer un effet de type « quorum sensing » dans la virulence et/ou collaboration des souches Mel 31 Mel 32. Ces deux souches sécrètent un même type d'homosérine lactone. La quantité seuil de Mel 31 + Mel 32 à injecter par huître est de  $10^7$  CFU en dessous de laquelle les taux de mortalité sont presque nuls. La souche Mel 31, cultivée en milieu conditionné par Mel 32, présente une virulence plus importante qu'en milieu non conditionné.

### Discussion

Nous avons sélectionné deux souches pathogènes de *C. gigas* proches de *V. lentus*. Ces souches vraisemblablement opportunistes collaborent pour tuer l'animal. Leur pouvoir pathogène, comme celui d'autres souches apparentées à *V. splendidus*, ne



semble pas spécifique de *C. gigas*, elles sont donc ubiquistes. L'ensemble de nos résultats nous a conduit à proposer une hypothèse de mécanisme de virulence pour Mel 31 et Mel 32 (fig. 3).

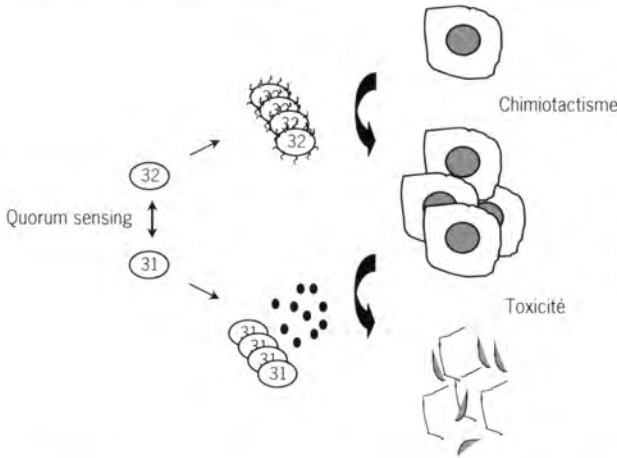


Figure 3  
Mécanisme hypothétique de l'action de souches virulentes Mel 31 et Mel 32 sur les hémocytes.

Nous désirons maintenant caractériser les bases moléculaires de la virulence et de la collaboration de ces souches. Plusieurs approches moléculaires sont envisageables.

Chez *Vibrio anguillarum*, par des expériences de délétion de plasmide, il a été montré que la présence de cet élément extra-chromosomique est corrélée avec la virulence d'une souche. Ce plasmide porte les gènes impliqués dans la séquestration du fer ou sidérophores (Crosa, 1980). L'analyse de souches délétées en plasmide, en admettant que cela n'altère pas la vie de la cellule, est un préalable nécessaire à l'étude de gènes de virulence.

Après caractérisation de la pathogenèse *in vivo* et/ou *ex vivo*, des mécanismes de virulence peuvent être proposés: adhérence, infiltration tissulaire, mise en évidence d'exotoxine ou d'endotoxine (Farell & Crosa, 1991; Goarant *et al.*, 2000; Milton *et al.*, 1992, 1995, 1996; Norqvist *et al.*, 1990; Norqvist & Wolf-Watz, 1993). Des gènes spécifiques de ces mécanismes sont alors recherchés par PCR avec des amorces dégénérées, choisies sur la base de séquences d'autres bactéries pathogènes (Farell & Crosa, 1991; Goarant *et al.*, 2000; Milton *et al.*, 1992, 1995, 1996): métalloprotéase, hémolysine, lécithinase, piline, flagelline... Le principal inconvénient de cette démarche est que, peu de séquences de gènes de virulence sont publiées chez *Vibrio* jusqu'à présent, les travaux étant focalisés sur *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*, deux pathogènes humains. De plus, peu de biotests permettant de caractériser les mécanismes de virulence sont disponibles chez les mollusques et plus particulièrement chez *C. gigas*.

Une approche complémentaire, dite de protéomique, est envisageable si une fraction protéique (produit extracellulaire par exemple) présente une activité toxique (Norqvist *et al.*, 1990). La protéine est purifiée par chromatographie ou gel acrylamide (1 ou 2D) et analysée par spectrométrie de masse et microséquençage. La séquence peptidique permettra alors de cribler le gène par des oligonucléotides dégénérés. Cette approche nécessite l'expression *ex vivo* du gène de virulence d'intérêt.

Une approche classique, dite de génétique, consiste à muter au hasard des segments du génome, à sélectionner les mutants et à en observer les conséquences sur le phénotype (transformation/recombinaison) (Norqvist & Wolf-Watz, 1993). Pour le moment, le seul moyen d'évaluer la virulence des souches est d'effectuer des injections d'animaux. En raison de la variabilité de sensibilité de *C. gigas*, il est nécessaire d'injecter 30 animaux, en triplicat, et de reproduire l'étude deux fois pour pouvoir conclure sur la virulence des souches. Il nous est donc impossible actuellement de tester un grand nombre de mutants en pathologie expérimentale.

Dans l'approche appelée génomique soustractive, les génomes de souches très proches d'un point de vue taxonomique mais de virulence variable (vir+/vir-) sont comparés par hybridation soustractive (Lisitsyn, 1995). Les fragments différentiels sont séquencés et analysés dans les banques de données. Il existe aujourd'hui des kits commercialisés permettant d'effectuer une banque soustractive en quinze jours. L'inconvénient majeur de ces techniques est la quantité importante de faux positifs, dus à des insertions de type transposons ou phages, très fréquentes chez les bactéries.

Depuis quelques années, l'approche globale de séquençage de génome apparaît comme la méthode la plus informative. Les génomes bactériens sont petits par rapport aux génomes eucaryotes (de l'ordre de 5 mégabases pour les *Vibrios*) et peuvent donc être séquencés plus rapidement. Actuellement, seuls *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* ont été entièrement séquencés (Heidelberg *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2003). Cette approche de génomique reste très onéreuse mais la quantité d'information acquise est telle qu'elle ouvre des champs d'investigations énormes aussi bien en connaissance fondamentale sur la biologie cellulaire et moléculaire de l'espèce étudiée que pour les perspectives appliquées comme les diagnostics ou la prévention de maladies.

Quelle que soit l'approche choisie pour cribler des gènes, elle doit être suivie par une démonstration fonctionnelle de l'importance du (des) gène(s) sur un mécanisme cellulaire (ici la virulence). Pour cela, différentes méthodes de mutagenèse dirigée permettent d'abolir l'expression du gène afin d'associer sa fonction à un phénomène physiologique (Milton *et al.*, 1992, 1995, 1996).

En ce qui concerne nos perspectives, une collaboration entre le LGP et l'équipe du Dr D. Mazel (Institut Pasteur, Paris) vient d'être initiée pour le séquençage du génome complet de la souche Mel 32 et la mise au point d'une technique de mutagenèse. La première cible de la mutagenèse dirigée sera les gènes de la famille *lux*, responsable de la synthèse des homosérines lactones. La virulence des mutants Mel 31 et/ou Mel 32 sera alors analysée en infection expérimentale. En parallèle, une approche de génomique soustractive est menée au laboratoire pour identifier les gènes de virulence portés par la souche Mel 31. De plus, une analyse par cytométrie en flux va être conduite pour caractériser *in vitro* l'effet différentiel de ces deux souches sur les hémocytes.

Dans le cadre de notre collaboration avec le LAC en Nouvelle-Calédonie, nous nous proposons de caractériser, par la même approche polyphasique décrite précédemment, les souches *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo* isolées d'animaux malades ou non et de l'environnement. Les mécanismes de virulence de *V. nigripulchritudo* pourront être abordés dans le cadre d'une thèse par une approche de protéomique (purification de la toxine et micro-séquençage) et de génomique soustractive.

## ***Vibrio penaeicida* et le Syndrome 93 dans les fermes de crevettes de Nouvelle- Calédonie : revue et perspectives**

C. Goarant, J. Herlin, D. Ansquer, R. Brizard, A.L. Marteau

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Cyrille.Goarant@ifremer.fr

### **Résumé**

En 1993 apparaît la première pathologie de l'aquaculture calédonienne de la crevette. Baptisée « Syndrome 93 », elle provoque une mortalité de juvéniles dans les élevages de grossissement sous forme de brèves flambées épizootiques. Des centaines de crevettes moribondes sont observées chaque jour sur les bords des bassins ou en train de nager en surface. Les survies, habituellement de l'ordre de 45 à 60 %, tombent à environ 20 % et la rentabilité de la filière est menacée. Les élevages géniteurs, menés à faible densité, ne sont par contre pas ou très peu affectés.

Cette pathologie apparaît saisonnière et les élevages qui se déroulent intégralement en saison chaude ne sont pas affectés. Les flambées épizootiques, simultanées sur des fermes distantes, sont observées aux intersaisons après des chutes de la température de l'eau des bassins de plusieurs degrés en quelques jours. L'activité des fermes, qui devient saisonnière, se répercute sur l'ensemble de la filière, depuis les écloséries jusqu'à l'atelier de conditionnement.

Les symptômes ne sont pas spécifiques d'une pathologie précise. L'examen clinique et anatomo-pathologique montre une vibriose septicémique. L'histologie révèle également la présence de corpuscules basophiles dans de nombreux organes, évocateurs d'une pathologie virale. Cependant, aucune entité virale (décrite ou nouvelle) n'a pu être associée à cette pathologie. À l'opposé, une association très significative a pu être montrée entre la mortalité et une septicémie bactérienne, impliquant majoritairement l'espèce *Vibrio penaeicida*. Des infections expérimentales de crevettes saines à l'aide d'isolats cliniques de *V. penaeicida* reproduisent l'ensemble du tableau clinique et anatomo-pathologique, permettant de le considérer comme l'agent étiologique de cette pathologie.

Des travaux de typage ont montré que les isolats calédoniens de *V. penaeicida* sont distincts des isolats japonais. Les données montrent également que l'eau de pompage constitue la source infectante : absent des larves qui apparaissent de plus résistantes à l'infection expérimentale, *V. penaeicida* est retrouvé fréquemment dans l'eau de pompage et des bassins, ainsi que dans les hémolymphe des juvéniles à une prévalence élevée, sans caractère saisonnier décelable. Ces éléments soulignent l'importance des facteurs déclenchant la maladie en bassin, sur des populations quasi systématiquement porteuses du pathogène.

Des facteurs extracellulaires toxiques ont été mis en évidence dans les surnageants de culture de souches de *V. penaeicida* lorsque celles-ci sont cultivées à une température basse, alors que ceux-ci sont absents lors d'une culture à température élevée. Ceci peut contribuer à expliquer le déclenchement des épisodes de mortalité à l'occasion des chutes de température.



Des essais d'antibiothérapie en bassins expérimentaux se sont montrés inefficaces du fait de l'anorexie relative qui accompagne les chutes de température. Les essais de sélection génétique de souches de crevettes plus résistantes à cette vibriose donnent par contre des résultats encourageants.

### Abstract

---

In 1993, "Syndrome 93" was the first pathology to hit the New Caledonian prawn farming industry. It causes epizootic mortalities in growout ponds. Hundreds of moribund prawns are seen daily on the edges of affected ponds, or swimming near the surface. Survival rates, usually in the range of 45 to 60% drop near 20% and profitability is thus seriously threatened. Broodstock ponds, reared at low density are not affected by this pathology.

This disease is seasonal and summer crops are not affected. Mortality occurs as simultaneous epizootics on distant shrimp farms, following sudden temperature drops during the transition seasons. As a consequence, the whole industry has become seasonal, from hatcheries to the packing plant.

The observed symptoms are non-specific. Clinical and histological results point out a septicæmic vibriosis. Histology also reveals basophilic inclusions evoking a viral aetiology. However, no viral agent (either known or new) could be consistently isolated nor related to this pathology. On the contrary, mortality could be consistently related to the vibriosis, mostly implying *Vibrio penaeicida*. Experimental infections using *V. penaeicida* field isolates in healthy *Litopenaeus stylirostris* reproduce both clinical signs and histopathology of natural "Syndrome 93". *V. penaeicida* is therefore considered the etiological agent of this disease.

A molecular typing study allowed to discriminate between New Caledonian and Japanese isolates. Data also demonstrated that the incoming water pumped from the bays was the infectious source: *V. penaeicida* is frequently found in pumping and rearing waters and in juveniles haemolymph at a high prevalence, both regardless of any seasonal pattern. On the other hand, larvae are not only free of *V. penaeicida* but also resistant to experimental infection. This particular epidemiology highlights the major role of the factors that trigger and aggravate the disease in growout ponds, where prawn populations carry the pathogen all year round.

Interestingly, extracellular toxic factors were found in *V. penaeicida* culture supernatants only when cultures were grown at low temperatures. This phenomenon may play a role in the triggering of Syndrome 93 after temperature falls.

Antibiotic pellets were tested in experimental ponds but were unsuccessful in minimizing Syndrome 93 impact because of prawn anorexia following temperature falls. However, genetic selection trials for more resistant prawn strains appear to give promising results.

### Introduction

---

#### *Vibrio penaeicida* au Japon

*Vibrio penaeicida* a été identifié pour la première fois au Japon au début des années 1980: la bactérie qui causait des mortalités de *Marsupenaeus japonicus* en grossissement, appartenant au genre *Vibrio* mais à aucune espèce décrite, a été initialement baptisée *Vibrio* sp. puis *Vibrio* sp. PJ. Sa description comme nouvelle espèce,



longtemps plus tard, lui vaut le nom de *Vibrio penaeicida* (Ishimaru *et al.*, 1995). Son pouvoir pathogène a été montré en infection expérimentale sur *M. japonicus* (Takahashi *et al.*, 1985a) et le traitement par aliment médicamenteux à l'aide d'oxytétracycline s'est avéré efficace dans les élevages (Takahashi *et al.*, 1985b). Le tableau histopathologique est celui d'une vibriose septicémique classique, avec pycnose des noyaux de la majorité des hémocytes ainsi qu'un tropisme particulier pour l'organe lymphoïde (Egusa *et al.*, 1988). L'étude de l'épidémiologie de ce pathogène, à l'aide de cultures suivies d'identification par séro-agglutination, montre une augmentation des concentrations du pathogène dans le milieu (eau et sédiment) et dans les crevettes au moment des pics de températures ou des chutes qui les suivent (de la Peña *et al.*, 1992). L'étude de la pathogénie par infection expérimentale montre la possibilité d'une voie d'entrée digestive (de la Peña *et al.*, 1995) et accessoirement par voie transcuticulaire ainsi qu'au niveau de plaies (de la Peña *et al.*, 1998).

### **Le Syndrome 93 en Nouvelle-Calédonie**

En 1993, les aquaculteurs de la baie de Saint-Vincent en Nouvelle-Calédonie signalent une mortalité anormale. Cette mortalité affecte de façon synchrone, sous forme de flambées épizootiques, des fermes distantes. Elle fait suite à des chutes de température de l'eau des bassins de plusieurs degrés en quelques jours. Sa sévérité est variable selon les bassins au sein d'une même ferme et elle ne semble pas affecter les élevages de géniteurs, menés à très faible densité. Les crevettes atteintes sont léthargiques, présentent une coloration anormale et ont une nage désorientée, qui les amène à s'échouer au bord des digues ou à nager en surface où elles sont la proie des oiseaux. À l'examen, les crevettes moribondes présentent une hémolymphe trouble et fluide, dont le temps de coagulation est fortement augmenté. Cette maladie se traduit, sur le plan industriel, par des chutes de la survie des élevages et une augmentation des indices de conversion, causant une perte de production pour la filière et affectant la rentabilité des fermes. La production devient rapidement saisonnière, entraînant des contraintes biologiques, techniques et commerciales tout au long de la filière, des écloséries à la commercialisation, en passant par le conditionnement et la provende d'aliments.

### **Étiologie**

Des bactéries du genre *Vibrio* sont isolées des hémolymphes des crevettes moribondes, notamment des souches appartenant à l'espèce *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998a). Le tableau anatomo-pathologique est celui d'une vibriose septicémique avec pycnose des noyaux de nombreux hémocytes et atteinte sévère de l'organe lymphoïde, ainsi que présence dans de nombreux tissus, notamment conjonctifs, d'inclusions basophiles évocatrices d'une étiologie virale (Berthe *et al.*, 1995; Mermoud *et al.*, 1998). Toutefois, aucun agent viral n'a pu être purifié ou observé en MET de façon systématique et les infections expérimentales à l'aide d'ultrafiltrats de crevettes moribondes ne permettent pas de démontrer l'implication d'une entité virale. De plus, des infections expérimentales sur des *L. stylirostris* saines à l'aide des souches de *V. penaeicida* isolées reproduisent l'ensemble du tableau histologique, inclusions basophiles comprises (Aquacop, données non publiées; Garza, comm. pers.).

## **Épidémiologie**

### **Typage moléculaire (Goarant *et al.*, 1999)**

Afin d'améliorer la compréhension du phénomène « Syndrome 93 », une étude de typage moléculaire a été entreprise en collaboration avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, à l'aide d'une technique d'amplification arbitraire du génome (AP-PCR, Welsh & McClelland, 1990).

La collection de souches typées par cette méthode contenait 5 souches de *V. penaeicida* japonaises, dont la souche type, les souches types de *V. nigripulchritudo*, *V. alginolyticus* et *V. barveyi* ainsi que 50 isolats provenant d'hémocultures septicémiques de crevettes affectées par le Syndrome 93 entre mars 1994 et juin 1995, provenant de 6 fermes réparties le long de la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie, documentant notamment 4 pics de mortalité entre mars et juin 1995.

Cette technique a permis l'identification de 47 des isolats cliniques et montré la forte dominance de l'espèce *V. penaeicida*, représentant 38 isolats cliniques. Une seconde espèce, *V. nigripulchritudo*, qui représente 7 isolats, n'est retrouvée que dans les hémocultures provenant de 2 fermes voisines de la région de Moindou, où elle représente 7 des 15 souches étudiées. Ce second pathogène avait ainsi été considéré comme géographiquement limité et des préconisations sanitaires avaient été émises pour tenter de limiter son expansion.

Concernant *V. penaeicida*, le typage a permis une discrimination infra-spécifique démontrant i) que les isolats calédoniens sont facilement distingués des souches japonaises et que ce pathogène n'a probablement pas été importé et ii) que les isolats calédoniens peuvent être distingués en différents sous-groupes en fonction de leur origine géographique (« topotypes »). *V. penaeicida* serait donc présent dans l'eau des baies, laquelle constituerait ainsi la source de contamination des fermes.

### **Suivi de *V. penaeicida* dans les fermes et écloséries**

Le rôle prépondérant de *V. penaeicida* dans le Syndrome 93 ayant été montré, un outil diagnostique spécifique a été développé (Saulnier *et al.*, 2000b) et a permis d'entreprendre un vaste suivi épidémiologique portant sur 4 fermes et 4 écloséries et sur une année complète (du fait du caractère saisonnier). Le suivi, par amplification spécifique du gène *rrs* de *V. penaeicida*, a concerné les larves au stade nauplius, les post-larves en sortie d'éclosérie et à l'ensemencement puis l'hémolymphe de 10 juvéniles 2 fois par mois sur chacun des bassins suivis. Les eaux de renouvellement et de bassin sont également étudiées au même moment. Les résultats du suivi du milieu d'élevage montrent la présence fréquente de *V. penaeicida* dans les eaux de pompage des fermes (31 % de 52 prélèvements) ainsi que dans l'eau des bassins (40 % de 52 prélèvements). Concernant le suivi des animaux, il a pu être montré que les larves ne sont pas porteuses de ce pathogène (0 sur 9 prélèvements de 100 nauplii). Concernant les post-larves, des problèmes d'inhibiteurs de PCR ont pu être mis en évidence sur plusieurs des échantillons. Toutefois, sur les échantillons où l'absence d'inhibition a été vérifiée (par amplification effective du gène de l'ARNr 18S de Décapodes), *V. penaeicida* n'a jamais été mis en évidence (0 sur 6 échantillons).

À l'opposé, le portage est fréquent chez les géniteurs (68 % sur 100 individus) ainsi que chez les juvéniles en élevage (64 % sur 980 individus). Pourtant, la prévalence ne semble liée ni aux épisodes de mortalité ni aux conditions de l'élevage, notamment saisonnières (fig. 1).

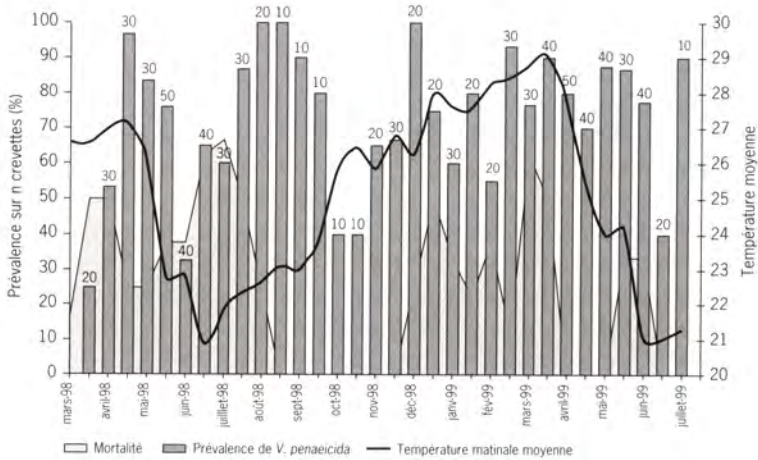


Figure 1 - Évolution des prévalences de *Vibrio penaeicida* dans 4 bassins de 4 fermes de Nouvelle-Calédonie, température matinale moyenne et mortalité due au Syndrome 93.

Ce suivi confirme donc que les animaux sont sains lors de l'ensemencement en bassins et que l'eau de pompage constitue la source de contamination, en accord avec les interprétations faites des résultats du typage. De plus, il montre que le portage sain est extrêmement fréquent, soulignant ainsi l'importance des facteurs déclenchant et des conditions favorisant l'expression de la maladie.

### Pathogénie et facteurs de virulence

#### Pouvoir pathogène de *V. penaeicida* en fonction du stade de développement de *Litopenaeus stylirostris* (Goarant et al., 1998)

Des infections expérimentales de post-larves de *L. stylirostris* par balnéation ont été effectuées de façon sérieuse en comparaison de témoins non infectés. Le stade post-larvaire a été déterminé à l'aide de la formule rostrale. Les résultats montrent que les post-larves ne sont pas sensibles à l'infection par *V. penaeicida*. L'acquisition de la sensibilité coïncide avec la métamorphose imaginale et le passage au stade juvénile, caractérisé par la formule rostrale définitive. Il est ainsi montré i) qu'un stress de manipulation des post-larves (comme un ensemencement en bassin par exemple) ne risque pas de déclencher de Syndrome 93, tant que les animaux n'ont pas acquis leur formule rostrale définitive; ii) qu'un phénotype réfractaire peut être exprimé chez *L. stylirostris*. Ce phénotype pourrait être utilisé pour l'étude des mécanismes de la maladie et permettre ainsi de déboucher sur des applications à la sélection génétique.

#### Toxicité des surnageants de culture de *V. penaeicida* en fonction de la température

L'expression de facteurs extracellulaires toxiques par *V. penaeicida* a été étudiée par injection intramusculaire à des crevettes d'ultrafiltrats de surnageants de culture de *V. penaeicida* AM101 cultivés à différentes températures. Il a ainsi pu être montré que *V. penaeicida* AM101 exprimait des facteurs extracellulaires toxiques lorsqu'il était cultivé à 20 °C, alors que ces facteurs ne sont pas exprimés lorsque la



souche est cultivée à 25 ou 30 °C (Goarant *et al.*, 2000). La purification et le début de caractérisation biochimique de la fraction toxique du surnageant de culture montrent que celle-ci contient une sérine-protéase (Saulnier *et al.*, cet ouvrage).

### **Le support génétique de la virulence**

Bien que *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo* soient des espèces distinctes, leur pouvoir pathogène et le tableau anatomo-pathologique qu'ils induisent chez *L. stylirostris* sont extrêmement semblables. L'hypothèse a donc été émise que tout ou partie de leurs facteurs de virulence pouvait être porté par des éléments génétiques mobiles, présents dans les génomes des souches pathogènes des deux espèces. Ainsi, plusieurs gènes associés à la virulence ont un support plasmidique chez *V. anguillarum* (Crosa *et al.*, 1977, 1980). Des travaux préliminaires ont permis de mettre en évidence, en électrophorèse sur gel d'agarose, des bandes pouvant correspondre à de grands plasmides dans des isolats de *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*. Une description plus complète de la structure du génome sera effectuée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE), permettant d'une part la comparaison des profils plasmidiques d'une sélection de souches des 2 espèces, d'autre part un typage moléculaire de ces souches.

### **Synthèse**

---

Le Syndrome 93 apparaît ainsi comme une pathologie multifactorielle dans laquelle le facteur déclenchant (prépondérant, voire suffisant) est une chute de température. Cette chute de température de l'eau des bassins va avoir des effets conjugués sur chacun des 3 compartiments de l'élevage :

- i) au niveau de la crevette, elle entraîne un stress physiologique (Lemaire *et al.*, 2002) et immunitaire (Le Moullac & Haffner, 2000) et modifie les besoins nutritionnels (Chim *et al.*, cet ouvrage) ;
- ii) au niveau de l'écosystème, elle entraîne des remaniements écologiques profonds de la production naturelle du bassin : bactérioplancton, phytoplancton (Lefèvre *et al.*, cet ouvrage), zooplancton et méiofaune (Della Patrona *et al.*, cet ouvrage), susceptibles d'affecter à leur tour la crevette, notamment par l'appauvrissement des apports nutritionnels ;
- iii) au niveau du pathogène *V. penaeicida*, elle entraîne l'expression de facteurs de pathogénicité, notamment d'une exotoxine létale pour la crevette (Goarant *et al.*, 2000 ; Saulnier *et al.*, cet ouvrage).

Ce modèle complexe d'interactions sous l'effet d'un facteur météorologique non contrôlable justifie pleinement l'approche pluridisciplinaire mise en œuvre dans le cadre du programme Désans (Harache & Herbland, cet ouvrage).

### **Perspectives de lutte**

---

#### **Essais thérapeutiques en bassins expérimentaux**

L'origine bactérienne du Syndrome 93 étant admise, des essais d'antibiothérapie par aliment médicamenteux ont été envisagés : leur réussite aurait de fait constitué une forme de « diagnostic thérapeutique » validant les travaux précédents. Du fait de l'interdiction de l'utilisation d'antibiotiques, ces essais ont été entrepris dans les bassins expérimentaux du laboratoire d'aquaculture calédonien de l'Ifremer. Le premier



essai, réalisé en 1995, s'est heurté au mauvais choix de la forme pharmaceutique (oxytétracycline sous forme de chlorhydrate), très hydrosoluble et qui était lessivée du granulé avant sa consommation par les crevettes. Un second essai a utilisé un prémélange de sulfadiméthoxine + orméthoprime, dont la bonne résistance au lessivage a été vérifiée. Le suivi des concentrations tissulaires de l'antibiotique dans les crevettes par HPLC a permis de montrer que les crevettes, à l'occasion de la chute de température, ne consommaient plus suffisamment d'aliment pour maintenir des concentrations tissulaires thérapeutiques.

Par ailleurs, de nombreux produits commerciaux à visée immunostimulante ou « vaccinale » ont également été testés dans des bassins expérimentaux, sans qu'aucun de ceux-ci ne permette d'obtenir une amélioration de la survie des élevages.

### Perspectives actuelles : programmes en cours

Des travaux préliminaires ont montré que les besoins nutritionnels en lipides de *L. stylirostris*, du point de vue de la tolérance au régime thermique de saison fraîche et des défenses immunitaires, ne sont pas entièrement couverts par l'aliment granulé (Chim *et al.*, 2001). Une nutrition adaptée à la saison fraîche pourrait permettre une meilleure adaptation des animaux aux chutes de température et une amélioration de leurs défenses immunitaires et améliorer ainsi les performances des élevages soumis au Syndrome 93.

Enfin, la sélection de lignées de crevettes moins sensibles au Syndrome 93 est également une approche mise en œuvre actuellement. Les résultats d'infection expérimentale des générations G3 des lignées sélectionnées et témoins (voir fig. 2) sont particulièrement encourageants à cet égard (Goyard, données non publiées).

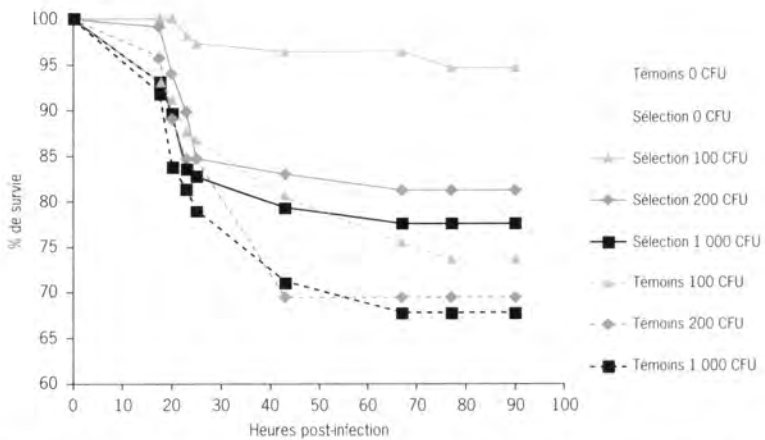


Figure 2 - Survies à une infection expérimentale par *Vibrio penaeicida* AM 101 de crevettes des générations G3 témoins et sélectionnées pour la résistance au Syndrome 93.

### Remerciements

Tous nos remerciements aux responsables des trois fermes étudiées au cours du suivi épidémiologique et à leurs employés pour l'accueil et l'aide qu'ils ont pu nous apporter. Merci également à Denis Saulnier du laboratoire d'aquaculture tropicale Ifremer de Tahiti pour son aide scientifique constante au cours de ce même suivi. Merci enfin à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie pour l'aide technique et l'accueil dans leurs laboratoires au cours de ce suivi.

## Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du syndrome d'été : résultats préliminaires du programme Désans

C. Goarant, J. Herlin, D. Ansqer, F. Imbert, D. Domalain, A.L. Marteau

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Cyrille.Goarant@ifremer.fr

### Résumé

En décembre 1997, une mortalité anormale sur un bassin de grossissement a retenu notre attention par son caractère atypique : dans des conditions de températures estivales, sa survenue ne correspondait pas aux épisodes du Syndrome 93. Cette pathologie a dès lors pris un caractère enzootique sur cette exploitation où elle affecte tous les élevages depuis cette première observation. Elle a reçu, du fait de son caractère saisonnier, le nom de « syndrome d'été ». Des souches de *Vibrio nigripulchritudo* ont pu être isolées de façon quasi systématique de crevettes moribondes, celles-ci présentaient une vibriose septicémique. Les souches bactériennes isolées montrent un pouvoir pathogène et toxigène expérimental important sur *Litopenaeus stylirostris*. Parallèlement, des infections expérimentales à partir d'ultrafiltrats de crevettes moribondes ont permis d'exclure une étiologie virale.

D'autres souches de *V. nigripulchritudo* avaient déjà été isolées au cours d'épisodes du Syndrome 93 dans deux fermes de la région de Moindou. À l'époque, l'étude d'un grand nombre de souches avait conduit à considérer l'implication de cette espèce comme un épiphénomène géographiquement localisé. Des mesures de contrôle sanitaire avaient été proposées pour limiter les risques de dissémination de souches pathogènes de cette espèce.

Depuis l'année 2000, une recherche spécifique de *V. nigripulchritudo* a permis de retrouver des souches de cette espèce dans de nombreux sites d'élevage, bien qu'une seule ferme soit affectée par le syndrome d'été. L'étude du pouvoir pathogène et toxigène expérimental de quelques souches a montré qu'il existe des isolats pathogènes et des isolats non pathogènes, cohabitant parfois dans le même site d'élevage. Les génomes de deux souches de *V. nigripulchritudo* (vir+/vir-) ainsi sélectionnées seront comparés par hybridation soustractive afin de caractériser les gènes supports de virulence, préalable indispensable au développement d'outils diagnostiques pertinents.

Le suivi réalisé sur deux fermes de crevettes au cours de l'été austral 2002-2003 a permis de préciser l'évolution spatio-temporelle de *V. nigripulchritudo* dans deux contextes d'élevage : avec ou sans déclenchement de mortalité.

### Abstract

In December 1997, a case of mortality was investigated due to its uncommon features: occurring in summer conditions, it did not fit the typical "Syndrome 93" profile, which affects shrimp farms in winter. This new disease turned out almost immediately enzootic in the shrimp farm involved and has affected all its crops ever since. Its occurrence in summer conditions led to the "Summer Syndrome" appellation as

opposed to Syndrome 93. *Vibrio nigripulchritudo* strains could be isolated from moribund shrimps and histological results pointed out a systemic vibriosis. Bacterial strains isolated from diseased shrimps showed a high pathogenicity in *Litopenaeus stylirostris* in experimental infection. Concurrent experimental infections with moribund shrimp carcasses ultrafiltrates allowed to exclude a viral aetiology.

Several *V. nigripulchritudo* strains had already been isolated from Syndrome 93 episodes in two adjoining farms near Moindou. They were at that time considered as a geographically restricted epi-phenomenon. Sanitary measures were recommended in order to minimize the risk of spreading of pathogenic strains of this species.

Since the year 2000, *V. nigripulchritudo* strains have been found in several shrimp farms, although summer syndrome is still limited to one particular farm. The study of pathogenic and toxinogenic characteristics of some isolates showed that pathogenic and non-pathogenic strains occur in the shrimp farms environment and that both may be found at the same time in one farm. These strains are currently being studied and the genomic comparison of pathogenic and non-pathogenic isolates should point out some virulence factors.

A survey was carried out during the summer 2002-2003 in two shrimp farms: the affected farm and another one in which pathogenic strains could be isolated but without any disease event. This survey was useful to extend our knowledge on the epidemiology of *V. nigripulchritudo* both in an affected environment and in one with no disease outbreak.

## Introduction

*Vibrio nigripulchritudo* a été identifié pour la première fois en Nouvelle-Calédonie en 1995 chez des crevettes moribondes de deux fermes voisines de la région de Moindou, associé à des épisodes de mortalité hivernale de type Syndrome 93 (Costa *et al.*, 1998a). Un grand nombre de souches étudiées dans une étude de typage moléculaire n'avait pas permis de démontrer l'implication de cette espèce bactérienne dans un contexte de pathologie en dehors de ces deux fermes (Goarant *et al.*, 1999). Il avait donc été considéré comme limité à cette zone géographique. À ce titre, des mesures zoosanitaires susceptibles de limiter son expansion géographique avaient été préconisées. *V. nigripulchritudo* a pourtant été isolé en décembre 1997 sur deux bassins d'une ferme en baie de Saint-Vincent, où il était associé à une mortalité estivale, atypique dans le contexte calédonien. Sur cette ferme, cette pathologie a depuis pris une épidémiologie particulière et stéréotypée, caractérisée par des flambées épi-zootiques après 50 à 60 jours d'élevage environ, sur tous les bassins ensemencés. Un portage asymptomatique fréquent a été mis en évidence sur cette ferme, précédant et accompagnant le déclenchement de la mortalité. Une étiologie virale sous-jacente a pu être exclue par la réalisation d'infections expérimentales à l'aide d'ultrafiltrats de crevettes moribondes, l'histologie confirmant également le diagnostic de vibriose septicémique (Brock, 2000; Lightner, comm. pers.). *V. nigripulchritudo* a été à nouveau isolé de l'hémolymphe de crevettes moribondes des deux fermes de la Province Nord en mars 1998, puis sur de nombreuses autres fermes, sur des crevettes saines ou moribondes. Sur les autres fermes toutefois, il n'est associé à aucune pathologie ou l'expression de la pathologie à laquelle il est associé reste discrète et se traduit par la mortalité de quelques individus, généralement à l'occasion de pics de mue.

Des souches de *V. nigripulchritudo* ont pu être isolées de l'eau de bassins, du sédiment, de l'eau de pompage en amont de la ferme affectée, ainsi qu'associé à de nombreux crustacés des bassins mais aussi du canal en amont des bassins, ainsi qu'au zooplancton des bassins. Les tests de pathologie expérimentale réalisés avec différentes souches ont permis de montrer qu'il existe des souches pathogènes et des souches non pathogènes, parfois présentes simultanément sur le même site et que la production de facteurs toxiques extracellulaires semblait bien corrélée à la virulence (Goarant *et al.*, 2003).

## **Matériel et méthodes**

---

### **Suivi**

Le suivi concernait un bassin de la ferme affectée par la maladie (ferme A) et un bassin d'une ferme non affectée, où des souches pathogènes avaient pourtant été mises en évidence au cours d'élevages précédents (ferme B). Le protocole général du suivi est présenté par ailleurs (Lemonnier et le personnel du LAC, cet ouvrage; Mugnier *et al.*, cet ouvrage).

### **Prélèvement**

Animaux: i) post-larves: le jour de l'ensemencement, environ 100 PL sont rincées à l'eau de mer stérile et broyées; ii) juvéniles: après rinçage à l'eau de mer stérile, l'hémolymphe est ponctionnée dans le sinus ventral.

### **Milieu d'élevage**

L'eau interstitielle du sédiment superficiel est extraite par une centrifugation légère (200 g/5 min). Les échantillons sont dilués dans de l'eau de mer stérile, au 1/100 pour l'eau du bassin et au 1/10 pour l'eau interstitielle du sédiment et l'eau de renouvellement. Ces prélèvements sont ensuite étalés sur Marine Agar additionné de 2 % de glycérol. Les milieux sont incubés 72 heures à 30 °C. Les colonies présentant les caractéristiques de *V. nigripulchritudo*, notamment une pigmentation noire marquée, sont comptées comme telles. Certaines sont isolées et leur identification est confirmée par des tests phénotypiques classiques (état frais, Gram, ADH/LDC/ODC, ONPG, gélatinase) et conservées à -80 °C.

### **Infection expérimentale**

Les souches sont cultivées en Marine Broth pendant 18 à 24 heures à 30 °C sous agitation permanente. La concentration bactérienne est évaluée par une lecture au spectrophotomètre à 600 nm par rapport à une courbe étalon établie préalablement. Environ 100 à 1 000 CFU sont injectées en intramusculaire à 2 lots de 6 à 10 crevettes saines. Le témoin est constitué de l'injection d'un volume identique de milieu de culture stérile. La survie des animaux est suivie sur 60-72 heures. La souche est considérée pathogène si la survie est inférieure à 20 % et non pathogène si elle est supérieure à 65 %, permettant de classer la quasi-totalité des souches testées (Goarant *et al.*, 2003).

## **Résultats**

---

La technique utilisée pour les comptages de *V. nigripulchritudo* dans le milieu d'élevage et les crevettes s'est avérée être satisfaisante par rapport à sa simplici-



ré: sur 40 souches isolées de ce suivi, 34 sont confirmées sur des critères phénotypiques appartenir à l'espèce *V. nigripulchritudo*, soit 85 %.

La mortalité a affecté le bassin de la ferme A à partir de 50 jours d'élevage, alors qu'aucune mortalité anormale n'a été observée sur le bassin de la ferme B (fig. 1). *V. nigripulchritudo* n'a jamais été détecté dans l'eau ni dans les sédiments de la ferme B. À l'opposé, il a été détecté précocement dans l'eau interstitielle du sédiment de la ferme A (après 11 jours d'élevage, J11) à des concentrations faibles. Ces concentrations augmentent par la suite, de façon synchrone avec le déroulement du pic de mortalité (fig. 2). Il a été détecté plus tardivement dans la colonne d'eau (J44) (voir fig. 2) et l'a été en une seule occasion dans l'eau de renouvellement de cette ferme (J54).

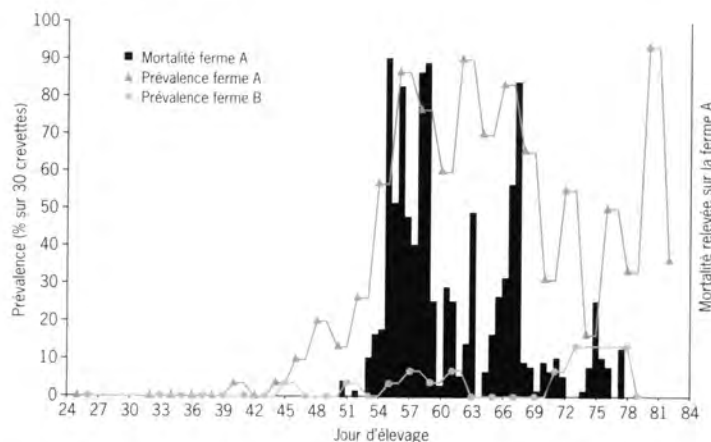


Figure 1 - Évolution des prévalences de *Vibrio nigripulchritudo* chez les crevettes des deux fermes suivies et de la mortalité dans la ferme A.

La prévalence de *V. nigripulchritudo* dans les crevettes (fig. 1) de la ferme B a été nulle jusqu'à J45 puis a toujours été limitée et n'a atteint que 4 crevettes sur 30 (~13 %) en fin de suivi. À l'opposé, cette prévalence est de 1/30 (~3 %) dès J40 dans la ferme A, augmente ensuite à partir de J46 et atteint 27 crevettes sur 30 (90 %) et même 28 sur 30 (~93 %) en fin de suivi.

Quarante souches ont été isolées au cours de ce suivi: de la ferme A ont été isolées 14 souches cliniques entre J40 et J68 (crevettes asymptomatiques et crevettes moribondes) et 17 souches environnementales (9 du sédiment entre J11 et J74, 7 de l'eau du bassin entre J55 et J60 et 1 de l'eau d'alimentation, à J54).

L'étude du pouvoir pathogène de certaines de ces souches ainsi que de souches de collection isolées au cours de campagnes précédentes permet de montrer que des souches pathogènes et des souches non pathogènes sont présentes dans l'écosystème des deux fermes suivies et que les deux types de souches peuvent y être présentes simultanément.

Ainsi, sur 16 isolats cliniques de la ferme B (tous isolés de crevettes ne présentant pas de symptômes entre avril 2002 et janvier 2003), 13 se sont avérés saprophytes (i.e. non pathogènes) et 3 pathogènes. Au cours du suivi de la saison 2002-2003, la seule souche pathogène isolée l'a été en fin de suivi après 77 jours d'élevage.

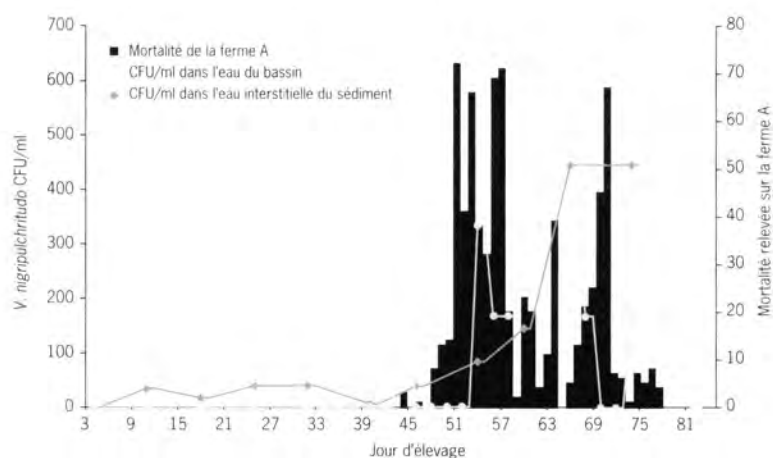


Figure 2 - Évolution de la mortalité et des comptages de *Vibrio nigripulchritudo* dans l'eau du bassin et l'eau interstitielle du sédiment de la ferme A.

De la même façon, des souches pathogènes et non pathogènes ont été recueillies des hémocultures des crevettes de la ferme A.

Au sein des isolats environnementaux (ferme A uniquement), des souches pathogènes et non pathogènes sont également trouvées. Une seule souche a pu être isolée de l'eau du canal d'alimentation au cours du suivi. Cette souche s'est montrée pathogène en infection expérimentale. À l'opposé, les 3 isolats de la collection provenant de l'eau du lagon au niveau de la station de pompage ne sont pas pathogènes.

### Synthèse et discussion

Des souches pathogènes sont retrouvées dans tous les compartiments du milieu d'élevage de la ferme A, suggérant leur implication dans les épisodes pathologiques affectant cette ferme. Certaines souches pathogènes peuvent aussi être retrouvées dans les hémocultures de crevettes présumées saines, confirmant la possibilité d'un portage asymptomatique de ce pathogène. Le syndrome d'été apparaît ainsi comme une maladie mettant en cause, à la faveur d'un déséquilibre du milieu, des germes présents dans l'environnement d'élevage de la crevette, voire appartenant à sa flore normale.

À l'opposé, ce *Vibrio* n'a pas été retrouvé dans le milieu d'élevage de la ferme B, probablement parce qu'il s'y trouvait à des concentrations trop faibles.

Ainsi, l'omniprésence de ce pathogène sur la ferme A pourrait expliquer des prévalences plus élevées et la survenue des mortalités, d'autant plus que les crevettes semblent affaiblies par des conditions particulières du milieu d'élevage (Mugnier *et al.*, cet ouvrage; Lemonnier et le personnel du LAC, cet ouvrage).

La cinétique de détection de *V. nigripulchritudo* dans les différents compartiments de l'élevage de la ferme A (sédiment à J11, eau du bassin à J55, hémocultures à J40) suggère que la source de contamination des crevettes est probablement le sédiment, milieu riche favorable au développement de la flore vibrionacée (Burford *et al.*, 1998; Kautsky *et al.*, 2000; La Rosa *et al.*, 2001).

Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de ces pathogènes dans le milieu d'élevage de la ferme A. L'absence de détection du pathogène dans les post-larves ensemencées ainsi que les prévalences observées en début d'élevage laissent supposer que la contamination des animaux a lieu en bassin. Deux hypothèses existent alors : celle d'un réensemencement du milieu à chaque cycle d'élevage depuis le milieu environnant (lagon au niveau de la zone de pompage) et celle d'une survie du pathogène dans la ferme au cours des périodes d'assec. Dans ce dernier cas, une désinfection complète de la ferme au cours d'une période d'assec apparaîtrait comme une voie susceptible de limiter l'impact de cette pathologie sur la ferme affectée et, par là même, de minimiser le risque d'extension géographique de cette maladie.

### Perspectives

Il conviendra dans un premier temps de compléter la collection de souches en s'efforçant d'isoler quelques souches environnementales de la ferme B. Cette collection constitue en effet le support des travaux complémentaires. Ainsi, une étude de typage moléculaire d'une sélection de souches cliniques et environnementales de différentes origines géographiques sera réalisée en électrophorèse en champ pulsé (PFGE) dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. L'objectif de cette étude serait de confronter les résultats de la typologie « pathogénicité » avec ceux du typage moléculaire dans une optique de meilleure compréhension de l'épidémiologie du phénomène.

La connexion de notre programme avec le programme Taxovir du laboratoire de génétique et pathologie de l'Ifremer (Gay *et al.*, cet ouvrage) devrait permettre, par une approche de comparaison des génomes de souches pathogènes et non pathogènes par hybridation soustractive, de mettre en évidence les gènes impliqués dans la virulence de ces souches.

Les conditions de la croissance et de l'expression des facteurs de virulence seront également étudiées en conditions expérimentales, en tenant compte des facteurs particuliers mis en évidence dans le milieu d'élevage (Lemonnier et le personnel du LAC, cet ouvrage) ainsi que dans l'hémolymphe des crevettes stressées (Mugnier *et al.*, cet ouvrage). La sensibilité des crevettes en fonction de leur âge ou de leur stade de développement pourra également être étudiée.

Enfin, le suivi des populations planctoniques dans la période précédant la survenue de la mortalité (Lemonnier et le personnel du LAC, cet ouvrage) évoque l'hypothèse de relations de *V. nigripulchritudo* avec les crustacés planctoniques comparables à celles décrites pour *V. parabaemolyticus* (Kaneko & Colwell, 1975 ; Venkateswaran *et al.*, 1989) et *V. cholerae* (Huq *et al.*, 1983). Ces relations de souches pathogènes de *V. nigripulchritudo* avec les zooplanctontes pourraient être étudiées à l'aide d'une souche transformée avec un plasmide spécifiant l'expression constitutive de la GFP (Green Fluorescent Protein), comme cela a pu être fait sur *V. cholerae* (Chiavelli *et al.*, 2001).

### Remerciements

Tous nos remerciements aux responsables des deux fermes et à leurs employés pour l'accueil et l'aide qu'ils ont pu nous apporter pour la mise en place et le déroulement du suivi 2002-2003 du syndrome d'été.

## Apports d'un modèle d'infection expérimentale de crevettes naïves pour l'étude d'une vibriose

D. Saulnier, C. Goarant, J. Charlier, D. Ansquer, P. Levy, Y. Labreuche, J. de Lorgeril, É. Bachère, G. Aguirre-Guzman, N. Cochennec-Laureau

Ifremer, centre océanologique du Pacifique, BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynésie française  
Denis.Saulnier@ifremer.fr

### Résumé

La filière pénicole de Nouvelle-Calédonie est confrontée depuis quelques années à des épisodes de mortalité saisonniers sévissant sous la forme de brèves flambées épizootiques. Ces mortalités exclusivement rencontrées en bassin de grossissement semblent être dues à la présence de deux bactéries du genre *Vibrio*, *V. penaeicida* et *V. nigripulchritudo*. Afin de confirmer la pathogénicité de *V. penaeicida*, des infections expérimentales ont été réalisées chez des crevettes naïves, n'ayant jamais été en contact avec cet agent bactérien. Un modèle d'infection reproductible a été obtenu par balnéation des crevettes dans une suspension bactérienne. Ce modèle a permis de progresser sur trois axes de recherche: 1) la localisation du pathogène dans les différents tissus de l'hôte pendant l'infection à l'aide de sondes nucléiques; 2) la confirmation de l'existence d'une ou de plusieurs exotoxine(s) produite(s) par l'agent bactérien, la caractérisation de la nature protéique (cystéine-protéase) de cette toxine ou d'une de ces toxines et enfin la détermination de doses létales 50 % à différents niveaux de purification; 3) la démonstration de l'existence d'une "immunité" protectrice chez des crevettes *Litopenaeus stylirostris* ayant survécu à une primo-infection. Ces crevettes semblent avoir acquis un état réfractaire aux infections itératives, du moins lorsque l'intervalle de temps entre deux épreuves d'infection est de courte durée (10 jours).

S'agissant de travaux préliminaires, les perspectives qu'offre ce travail sont: 1) de mieux caractériser la pathogénie de la vibriose à *V. penaeicida* afin notamment d'élucider les voies d'entrée et de multiplication du pathogène chez l'hôte; 2) de rechercher par une approche moléculaire les gènes bactériens impliqués dans la virulence; 3) d'identifier et de caractériser les gènes impliqués dans la résistance des crevettes à une infection bactérienne pour des applications futures en sélection génétique.

### Abstract

Penaeid shrimp production in New Caledonia is facing for few years seasonal mortalities. These mortalities occurred in growout ponds and are due to the presence of two bacteria *Vibrio penaeicida* and *V. nigripulchritudo*. In order to confirm the pathogenicity of *V. penaeicida*, experimental infections were performed with naive shrimps, never having been in contact with this bacterial agent. A reproducible model of infection was obtained by balneation of shrimp in a bacterial suspension. This infection model allowed to progress on three research areas: 1) the



localisation of the pathogen in different host tissues during the course of infection using nucleotidic probes; 2) the confirmation of the existence, by injection of naive shrimp, of one or several exotoxin(s) produced by this bacterial agent, the characterization of the proteinaceous nature (serine protease) of this toxin or one of these toxins and finally the establishment of lethal doses 50% at different levels of purification; 3) the evidence of the existence of a protective "immunity" among *Litopenaeus stylirostris* having survived to a first infection. These surviving shrimps seem to have acquired a "resistant" status to the repeated infections, at least when the interval between two infection tests is short (less than 10 days).

Because this work correspond only to preliminary results, perspectives are: 1) a better characterization of the pathogeny induced by *V. penaeicida* in order to elucidate the route of infection and multiplication of the pathogen in the host; 2) the identification of the bacterial genes involved in the virulence by a molecular approach; 3) the identification and characterization of the immune genes involved in the shrimp resistance to a bacterial infection for future genetic selection purpose.

### **Introduction**

La pénéculture a débuté en Polynésie française et en Nouvelle-Calédonie, dans les années 1980, suite aux travaux pionniers de l'Ifremer portant sur l'introduction d'espèces de crevettes pénéides non indigènes, sur la maîtrise des élevages de crevettes en captivité et sur la sélection des espèces d'intérêt aquacole. Si depuis cette date la production annuelle de crevettes d'élevage a stagné en Polynésie française avec environ 60 tonnes, celle de Nouvelle-Calédonie, en revanche, a connu une progression quasi exponentielle avec plus de 2000 tonnes de crevettes produites annuellement aujourd'hui. Cette dernière filière repose sur l'élevage d'une seule espèce *Litopenaeus stylirostris* et bénéficie d'un fort potentiel de développement du fait du nombre élevé de sites pouvant encore se prêter à l'installation de fermes pénéicoles. Cependant, la survenue de deux maladies majeures, en 1993 puis 1998, a diminué la productivité moyenne des élevages.

Ainsi le Syndrome 93, attribué à l'agent bactérien *Vibrio penaeicida* (Goarant *et al.*, cet ouvrage), se traduit par des épisodes de mortalité saisonniers, s'exprimant en saison froide sous la forme de brèves flambées épizootiques, lorsque la température de l'eau des bassins d'élevage chute brutalement (Costa *et al.*, 1998a; Mermoud *et al.*, 1998). Cette maladie a été responsable dans un premier temps de pertes économiques considérables mais son impact a ensuite été réduit par des modifications des pratiques culturales se traduisant par un choix restreint des périodes favorables à l'ensemencement en post-larves des bassins. Depuis 1998, une autre infection bactérienne, attribuée à *V. nigripulchritudo*, est apparue en Nouvelle-Calédonie. Cette bactérie est associée à des épisodes de mortalités survenant en saison chaude et son incidence sur la rentabilité des élevages est préoccupante, même si seules quelques fermes de grossissement semblent pour le moment confrontées à ce phénomène.

Contrairement à la situation zosanitaire rencontrée en Nouvelle-Calédonie, les élevages de Polynésie française sont indemnes de ces deux vibrioses. L'étude de la virulence d'une souche de *V. penaeicida* par infection expérimentale a conduit à l'obtention d'un modèle d'étude de pathogénie reproductible. Ce modèle, appliqué

aux crevettes naïves de Polynésie française, a permis de progresser sur trois axes de recherche: 1) la localisation du pathogène dans les différents tissus de l'hôte au cours de l'infection, 2) la caractérisation d'une ou de plusieurs exotoxine(s) produite(s) par l'agent bactérien, 3) la démonstration de l'existence d'une «immunité» protectrice chez des crevettes *Litopenaeus stylirostris* ayant survécu à une primo-infection.

## Résultats

### Présentation du modèle d'infection

Les crevettes naïves ont été infectées à différentes doses, selon différents modes: baignade ou injection intramusculaire. Plusieurs concentrations bactériennes de la souche AM101 (*V. penaeicida*) ont été utilisées. Les bactéries ont été cultivées dans un milieu Zobell puis diluées à la concentration souhaitée dans de l'eau de mer artificielle stérile (EMA). La sensibilité des crevettes à l'infection expérimentale est évaluée selon l'espèce considérée *L. vannamei*, *L. stylirostris* ou *Fenneropenaeus indicus*, le stade de développement ou le stade de mue des crevettes.

La virulence de deux souches de *V. penaeicida*, la souche AM101, d'origine calédonienne, et la souche de référence KH1, témoin d'expérimentation, connue pour sa virulence chez *Marsupenaeus japonicus* (de la Peña *et al.*, 1993) et d'origine japonaise, ont été comparées par infection expérimentale de crevettes juvéniles *L. stylirostris* en utilisant deux modes d'infection: l'un par baignade des crevettes, pendant deux heures, dans une baignoire d'eau de mer filtrée contenant  $4 \times 10^4$  unités formant des colonies (CFU), l'autre par injection intramusculaire au niveau d'un segment abdominal à raison de 4 CFU/g de poids vif (PV). Le suivi d'infection révèle que seule la souche AM101 est virulente pour l'espèce *L. stylirostris*, et que les doses infectantes responsables de mortalité sont très faibles au regard des tests de pathogénicité rapportés dans la littérature (Saulnier *et al.*, 2000a). On observe également que les pics de mortalité correspondant aux deux modes d'infection se situent dans les deux premiers jours post-infection et que les mortalités cessent à partir du 4<sup>e</sup> jour.

Par injection intramusculaire, on constate que, plus la dose infectante est élevée (40 vs 4 puis 0,4 CFU/g PV), plus la cinétique d'apparition des mortalités est précoce. Les lots de crevettes témoins ayant reçu une injection d'EMA ou une suspension bactérienne de la souche *V. alginolyticus* Z1, faiblement virulente bien qu'isolée dans un contexte de Syndrome 93, ne présentent pas de mortalités significatives.

Par baignade des crevettes dans différentes concentrations d'une suspension bactérienne de la souche AM101 (de 500 à  $10^6$  CFU/ml), on note l'existence d'une relation dose-dépendante dans les niveaux de survie finale calculés à l'issue de cinq jours de suivi (Saulnier *et al.*, 2000b). Cette relation est linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,76, ce qui illustre également la grande reproductibilité du modèle d'infection. La dose létale calculée à partir de cette droite et qui entraîne un taux de mortalité cumulée de 50 % (DL50) à cinq jours post-infection est de  $1,2 \times 10^4$  CFU/ml.

À dose infectante comparable, l'infection par baignade de différentes espèces de crevettes élevées à Tahiti révèle une sensibilité similaire des espèces *L. vannamei*, *L. stylirostris* et *F. indicus* vis-à-vis de la souche AM101.

Si les juvéniles et les adultes de *L. stylirostris* sont extrêmement sensibles à la souche AM101, d'autres stades de développement se montrent soit réfractaires à l'infection tels que les premiers stades de développement des post-larves, ce qui confirme les résultats obtenus par Goarant *et al.* (1998) chez des crevettes élevées en Nouvelle-Calédonie, soit sensibles tels que les larves au stade zoé.

La cinétique de mortalité chez des juvéniles, sélectionnés avant infection selon leur stade de mue, est différente. En effet, les crevettes en pré-mue meurent plus précocement que celles en inter-mue. Cependant, les valeurs de mortalité cumulée obtenues en fin de suivi sont identiques.

### Étude de la pathogénie

Une fois le mode d'infection par balnéation standardisé, et s'agissant probablement d'un modèle proche de l'infection naturelle, l'étude de la pathogénie est devenue envisageable. Du fait de l'absence de signes cliniques spécifiques de l'évolution de la maladie et du manque de sensibilité et spécificité des techniques histologiques classiques, des sondes nucléiques (à ARN ou à ADN) spécifiques de la souche AM101 ont été mises au point et utilisées en hybridation *in situ* afin de chercher à localiser le pathogène au cours de l'infection.

Après balnéation des crevettes avec une dose correspondant à la DL50 calculée pour le modèle expérimental, les bactéries AM101 ont pu être détectées dans différents tissus tels que l'organe lymphoïde, les branchies, le tissu conjonctif de divers organes à partir de prélèvements histologiques réalisés au cours de deux infections expérimentales. Par contre, aucun signal n'était détecté chez les animaux témoins non infectés. Les résultats ont été interprétés en tenant compte de la cinétique d'infection et du comportement de l'animal au moment du prélèvement : animal d'apparence sain ou au contraire moribond.

Chez les animaux d'apparence saine prélevés à 22 heures post-infection, le pathogène est principalement détecté dans les branchies. À 48 heures post-infection, alors que les mortalités de crevettes ont cessé lors de cette expérimentation, le pathogène est fréquemment retrouvé dans les branchies mais également dans l'organe lymphoïde où il est associé à la présence de nodules hémocytaires.

Lors d'une deuxième infection expérimentale où seuls les animaux moribonds ont été prélevés, le pathogène a été détecté à 12 ou 24 heures post-infection dans de nombreux organes tels que l'organe lymphoïde, les branchies, l'hépatopancréas et le cœur.

### Étude de(s) exotoxine(s) de *V. penaeicida*

La toxicité de surnageants de culture d'AM101 a pu être vérifiée chez des crevettes naïves par injection intramusculaire, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment sur cette espèce (Goarant *et al.*, 2000). Après précipitation au sulfate d'ammonium puis dialyse, le pouvoir toxique d'un surnageant de culture d'AM101 est conservé (Aguirre-Guzman *et al.*, 2003). L'injection à des crevettes de trois fractions protéiques (PF), PF40, PF60 et PF80, obtenues en utilisant un pourcentage de saturation croissant en sulfate d'ammonium (0-40 %, 40-60 % et 60 %-80 % respectivement) révèle que seule la fraction PF40 présente une activité toxique. Après dosage protéique de PF40, une DL50 est obtenue à 59 heures post-injection lorsqu'on injecte les crevettes avec 5 µg de PF40, ce qui correspond à 1-1,25 µg de

protéine par gramme de poids vif. La nature protéique de la (ou les) toxine(s) est confirmée puisqu'un pré-traitement de la fraction protéique PF40 à la protéinase K altère son pouvoir toxique.

La fraction PF40 a été purifiée lors de deux étapes de chromatographie en phase liquide. Une seule des quatre fractions éluées lors de la première chromatographie s'est révélée toxique après injection en intramusculaire (IM). En effet, plus de 90 % de mortalité cumulée ont été obtenus 54 heures post-infection pour une quantité de protéines injectées correspondant à 250 ng par animal. Cette fraction active a été soumise à une deuxième étape de purification par chromatographie. Cinq fractions ont été collectées dont une seule a présenté une activité toxique. L'injection IM de 250 ng par animal de cette fraction a provoqué là encore plus de 90 % de mortalité. La comparaison par électrophorèse SDS-Page des profils protéiques obtenus à partir des différentes fractions récoltées (toxiques ou non) révèle l'existence, pour les échantillons correspondants à PF40 et à ses deux sous-fractions actives, d'une protéine commune, d'un poids moléculaire apparent de 38 kDa. Afin d'identifier la nature de la toxine impliquée, la fraction active obtenue lors de la première chromatographie ainsi que PF40 ont été soumises à différents traitements avant leur injection aux crevettes. L'inhibition de l'activité toxigène par les inhibiteurs d'enzyme  $\text{CuCl}_2$  et E-64 suggère que le pouvoir toxique de ces fractions est dû à un composé de type cystéine-protéase.

#### Mise en évidence de réactions de défense de l'hôte

Il a pu être montré que des crevettes *L. stylirostris* ou *L. vannamei* survivantes à une primo-infection (baignade avec une dose correspondant à la DL50) avaient une plus grande résistance à la réinfection, lors d'une deuxième baignade effectuée avec la même dose infectante et à dix jours d'intervalle, que des crevettes primo-infectées. De plus, la détection précoce (par PCR) du pathogène dans l'hémolymphe de crevettes prélevées 18 heures post-infection avant l'apparition de mortalités (baignade avec une dose correspondant à la DL50) révèle une prévalence de 90 % tandis que les mortalités cumulées finales obtenues au cinquième jour post-infection n'atteignent que 50 %. Cet élément démontre, en conditions expérimentales, l'existence de porteurs sains, comme cela a été montré en conditions d'élevage en bassins (Goarant *et al.*, cet ouvrage).

#### Discussion

La mise au point d'un modèle d'infection de crevettes à partir d'une souche de *V. penaeicida* (AM101) présentant une virulence élevée et la disponibilité à Tahiti de crevettes naïves, vis-à-vis de cet agent infectieux, ont permis de progresser sur un certain nombre d'axes de recherche tels que l'étude de la pathogénie, l'étude des exotoxines sécrétées par le pathogène et l'étude des réactions de défense de l'hôte. En effet, si la naïveté des crevettes n'avait pas été garantie, il n'aurait pas été envisageable dans ces conditions de chercher à localiser le pathogène au cours d'une infection expérimentale et difficile, voire hasardeuse, de déterminer des doses létales médianes à chacune des étapes de purification des surnageants de culture ou d'étudier les mécanismes de défense de la crevette impliqués dans la résistance à l'infection.



Les signaux d'hybridation obtenus sur coupe histologique de crevettes infectées et prélevées à différents temps indiquent que les branchies et l'organe lymphoïde de crevettes d'apparence saine constituent des organes cibles pour le pathogène. Le fait que ce dernier soit détecté presque exclusivement dans les branchies à 22 heures post-infection suggère que cet organe constitue soit une voie d'entrée préférentielle du pathogène, soit une voie d'élimination du pathogène en se référant aux travaux de Smith & Ratcliffe (1980), soit les deux à la fois. Il est impossible de conclure ici du fait que seuls deux prélèvements ont été réalisés lors de cette étude préliminaire (22 ou 48 heures post-infection). Les hybridations observées à 48 heures post-infection dans l'organe lymphoïde et les branchies correspondent à des crevettes ayant survécu à la maladie. Le fait que le pathogène soit retrouvé au niveau de l'organe lymphoïde suggère soit que ce dernier est un organe cible pour le pathogène, ce qui est peu probable du fait que les crevettes prélevées sont en voie de guérison, soit que cet organe participe à l'élimination du pathogène. En effet, certaines études effectuées sur les pénaïdes démontrent le rôle épurateur de l'organe lymphoïde vis-à-vis d'infections virales ou bactériennes (Anggraeli & Owens, 2000; Alday-Sanz *et al.*, 2002; Van de Braak *et al.*, 2002). La localisation du pathogène dans de nombreux tissus chez les crevettes moribondes traduit probablement l'existence d'une septicémie dont l'issue est fatale.

Les facteurs de virulence des *Vibrio* pathogènes de crevette sont peu connus. Cependant, des toxines à activité enzymatique de type protéase ont été identifiées et parfois caractérisées pour certaines d'entre elles (Lee *et al.*, 1997; Liu & Lee, 1999; Goarant *et al.*, 2000; Sudheesh & Xu, 2001). Elles seraient impliquées dans le mode de pénétration et de dissémination du pathogène *via* une lyse tissulaire. Nos travaux suggèrent que la souche AM 101 sécrète une toxine de type cystéine-protéase d'un poids moléculaire de 38 kDa. Seul un séquençage amino-terminal de la bande obtenue en électrophorèse pourra confirmer l'identité de cette toxine. Cependant, il est intéressant de noter que Liu *et al.* (1997), Liu & Lee (1999) et Lee *et al.* (1999a,b) ont caractérisé, chez *Vibrio harveyi*, un pathogène de *Penaeus monodon*, une toxine de type cystéine-protéase d'un poids moléculaire identique. Afin de confirmer que cette toxine est bien un facteur de virulence, il conviendrait de développer des outils diagnostiques tels que des anticorps permettant de comparer les niveaux de production de cette toxine au niveau tissulaire lors d'une infection classique aux doses létales obtenues par injection de la protéine purifiée. De même, par une approche moléculaire, la mutation du gène codant pour cette toxine devrait permettre de démontrer son implication dans la virulence.

Les expérimentations visant à mettre en évidence des réactions de défense de l'hôte suggèrent 1) l'existence d'une résistance acquise post-infection chez certaines crevettes survivantes d'une primo-infection, du moins lorsque l'intervalle entre deux infections itératives est de dix jours et 2) que certains sujets porteurs de *V. penaeicida* suite à la balnéation arrivent à juguler l'infection. En effet, il est peu probable que la résistance à l'infection des crevettes soit liée à l'existence d'animaux naturellement plus résistants que d'autres dans la mesure où les valeurs de survies, pour une dose infectante donnée, sont comparables d'une infection expérimentale à l'autre alors que les lots de crevettes testés diffèrent probablement d'un point de vue génétique et/ou physiologique. Toutefois, seuls par exemple des essais de transferts passifs d'immunité ou la mise en évidence d'une perte de résistance liée

à l'augmentation du délai entre deux infections itératives permettraient de démontrer clairement l'existence d'une immunité acquise chez des crevettes primo-infectées. Ces résultats sont originaux et montrent clairement l'existence de mécanismes de défense efficaces développés par la crevette en réponse à l'infection par un pathogène de virulence avérée. Parmi les paramètres immunitaires testés au COP, une corrélation positive a été trouvée entre le nombre d'hémocytes circulants (des effecteurs clefs de l'immunité chez les crustacés) et la résistance des crevettes à l'infection par *V. penaeicida* (Le Moullac *et al.*, 1999). Plus récemment, Muñoz *et al.* (soumis) ont montré que les hémocytes produisant les pénaeidines, une nouvelle classe de peptides antimicrobiens découverte chez les crevettes pénéides (Destoumieux *et al.*, 2000b), jouaient un rôle majeur dans la réaction de défense des crevettes vis-à-vis de l'infection par *V. penaeicida*: migration des hémocytes circulants sur le site d'infection et libération de pénaeidines à activité agglutinante et opsonisante vis-à-vis des *Vibrio*. Les résultats de cette étude suggèrent en outre que la capacité de résistance des crevettes est liée à la rapidité ou à l'intensité de déclenchement de l'hématopoïèse. Par ailleurs, des travaux sont en cours visant à identifier les gènes de l'immunité responsables de la résistance des crevettes *L. stylirostris* à l'infection par *V. penaeicida*.

En conclusion, nos travaux ont permis d'approfondir la connaissance de la pathogénie de la vibriose à *V. penaeicida*. Ils démontrent également l'intérêt de ce modèle d'infection sur crevettes juvéniles naïves pour l'étude des mécanismes de défense d'autant plus que les vibrioses de crevettes ont été beaucoup plus étudiées sur les stades larvaires, alors que le système immunitaire des stades larvaires reste peu connu. Enfin, ils permettent d'envisager à plus long terme le développement d'une stratégie de type vaccinal pour la prévention de la maladie ainsi qu'une stratégie de sélection génétique basée sur des critères immunitaires (Bachère *et al.*, cet ouvrage).

## Mid-crop mortality syndrome in Australian prawn farming: a case study

B.R. Cullen, L. Owens

James Cook University, Laboratory of Microbiology and Immunology, Townville, 4811 Queensland, Australia  
Bradford.Cullen@jcu.edu.au

### Abstract

Prior to 1994, Australia was regarded by industry to be largely free of costly prawn pathogens. In the second half of 1994, several prawn farms in north Queensland reported unusual mortalities of juvenile pond reared *Penaeus monodon*. Clinically, sick prawns would usually appear after 3-3.5 months of pond culture or when they were around 12-15 g in size. Feed consumption would fall suddenly and lethargic prawns with a slightly dark red colour would appear at the pond edges. Mortalities were up to 80% in some grow-out ponds, with deaths continuing at high levels until the pond was harvested. Increased water exchange and other husbandry changes failed to alter the course of an outbreak. Some affected farms reported cycles of mortalities with peaks and troughs. Farms with the disease were all well established with a long experience in prawn farming. These losses represented a significant impact on the small, but rapidly growing industry and disease was recognised as a major threat to future sustainability. The immediate consequence was a slowing in the rate of industry growth. The inability to control outbreaks of disease with management to optimise pond conditions had serious implications on the future viability of prawn farming in Australia. A number of aspects were investigated including pathology, microbiology, pond water quality, intake water quality, bloom composition, blue-green algal bloom, feed quality and pond management. The pathological findings were inconclusive, and investigations failed to identify any consistent factor or detectable water quality problem associated with the disease outbreaks. The disease was referred to as Mid-Crop Mortality Syndrome (MCMS). It was unique to Australia; the literature does not describe similar conditions in any other countries which culture *P. monodon* (e.g. Indonesia, Thailand, Philippines). Investigations which began in April 1995 demonstrated that a virus or viruses were associated with the disease. Initial MCMS investigations found at least 4 virus-like particles by electron microscopy. Spawner-isolated mortality virus (SMV, a parvo-like virus) and gill-associated virus (GAV, a yellowhead-like virus) have been the subject of ongoing investigations. The MCMS viruses were highly infectious. They were able to be spread during an outbreak by healthy prawns eating infected prawn tissue and *via* contaminated water. This indicated that farms needed to consider the movement of sick prawns and water transfer when trying to control an MCMS outbreak. The viruses can be transmitted vertically through hatcheries to postlarvae. Chlorine disinfection was highly effective for destroying MCMS viruses, whereas dessication by drying was not. MCMS has declined since 1998, probably due to the implementation of whole-farm destocking and pond disinfection on many affected prawn farms. There has been a re-emergence of MCMS-like mortalities, sometimes linked to lapses in control strategies. Research is required to understand the role of different viruses

and environmental factors that trigger MCMS-like diseases, and to ultimately try to develop and implement cost-effective processes using sensitive detection tests and other procedures to reduce on-farm mortalities.

## Résumé

La crevetticulture australienne était perçue comme indemne des pathogènes les plus graves. Pendant la seconde moitié de 1994, plusieurs fermes du Nord Queensland ont rapporté une mortalité anormale de juvéniles de *Penaeus monodon* en grossissement. Ces épisodes affectent des crevettes de 12 à 15 g, élevées depuis 3 à 3,5 mois. La consommation d'aliment cesse soudain et des crevettes moribondes, présentant une coloration sombre et rougeâtre, apparaissent en bord de digues. La mortalité atteint 80 % dans certains bassins et se poursuit à un niveau élevé jusqu'à la pêche finale. L'augmentation des taux de renouvellement d'eau et d'autres pratiques zootechniques ne modifient en rien le déroulement de l'épisode pathologique. Les fermes affectées sont toutes des fermes établies de longue date ayant une bonne pratique de la crevetticulture. Les pertes induites dans cette industrie en pleine croissance ont été considérées comme une menace sérieuse pour son futur développement. La conséquence immédiate a été un ralentissement important de l'expansion de la filière, dont la viabilité est remise en question par l'impossibilité de contrôler cette mortalité par des mesures visant à optimiser les conditions d'élevage. De nombreux travaux ont été réalisés en pathologie, microbiologie, qualité des eaux d'élevage et de pompage, composition des efflorescences phytoplanctoniques, cyanobactéries, qualité des aliments et pratiques d'élevage. Les résultats ont été peu concluants et aucun facteur particulier ou problème de qualité d'eau n'a pu être relié aux épisodes pathologiques. Cette maladie, baptisée « Syndrome de mortalité de milieu d'élevage » (MCMS), semble cantonnée aux fermes du Nord Queensland. Elle est unique à l'Australie et la littérature scientifique ne décrit aucune pathologie semblable dans les autres pays producteurs de *P. monodon* (comme l'Indonésie, la Thaïlande, les Philippines). Les travaux débutés en avril 1995 ont montré qu'une ou des entités virales étai(en)t associée(s) à la maladie. Les études en microscopie électronique montraient 4 types de particules virales. Les recherches se sont poursuivies sur le virus de la virose létale des géniteurs (SMV, apparenté aux parvovirus) et le virus associé aux branchies (GAV, proche du virus de la maladie de la tête jaune). Les virus associés au MCMS sont hautement infectieux, transmissibles par cannibalisme de crevettes moribondes ainsi que par l'eau d'élevage, impliquant des précautions particulières dans les mouvements d'eau et de crevettes dans les fermes affectées. Ils peuvent également être transmis verticalement aux post-larves. Résistants à la dessiccation, ils sont par contre hautement sensibles à la désinfection par le chlore. Le MCMS a régressé depuis 1998, probablement sous l'effet des mesures de désinfection totale de la majorité des fermes affectées. Toutefois, des épisodes sont réapparus l'année dernière, parfois liés à des défaillances des mesures de prévention. La recherche travaille actuellement à comprendre le rôle des différents virus et les facteurs susceptibles de déclencher les épisodes de MCMS, en utilisant des tests de détection sensibles et d'autres procédures, afin de développer et mettre en œuvre des parades pour réduire la mortalité sur les fermes.



### **History of mid-crop mortality syndrome**

Prior to 1994, Australia was regarded by the aquaculture industry to be largely free of economically significant prawn pathogens. In the second half of 1994, several prawn farms in northern Queensland reported unusual mortalities of juvenile pond-reared *Penaeus monodon*. In affected ponds, sick prawns would usually appear after 3-3.5 months of pond culture or when approximately 12-15 g in size (Anderson & Owens, 2001). Growth and survival prior to this point would be normal. The first indicator of disease was a sudden reduction in feed consumption. Weak, lethargic prawns would appear at the pond edges. These weak shrimps displayed fairly non-specific signs of disease, and often had a dark brown to red pigmentation. Some diseased prawns would develop cuticular fouling, appendage erosion and shell disease. Mortalities occurred during the middle to late stages of growout, and once started, feeding rates would never recover to previous levels. Mortalities would continue at high levels until the pond was harvested, with some ponds having losses of up to 80% (Anderson & Owens, 2001). Some affected farms reported a cycle of mortalities which appeared to occur in peaks and troughs. Not all farms were affected to the same extent, with some only having 1 or 2 crops affected. The farms which were reporting the disease were all well established, and had a significant experience in prawn farming. A range of management practices were employed by farmers during these outbreaks, including increasing the rate of water exchange, applying antiseptic (benzalkonium chloride), lime, medicated feed (containing oxytetracycline), formalin, algicide (simerzine), fertiliser (nitram), probiotic bacteria, zeolite and teaseed cake (Anderson & Owens, 2001). None of the management or husbandry changes attempted had any effect on the course of an outbreak. This phenomenon was called mid-crop mortality syndrome (MCMS).

It was unique to Australia, the literature does not describe a similar condition in any other countries which culture *Penaeus monodon*, for example Indonesia, Thailand or the Philippines. MCMS first appeared during 1994, seemed to peak around 1996-1997, and significant mortalities continued at least up to 1997-1998. Estimated losses were in the vicinity of A\$5 million, however losses to the industry as a result of reduced investments in prawn farming were thought to be much greater (Anderson & Owens, 2001). Disease was recognised as a major threat to future industry sustainability. The inability to control outbreaks of disease with management to optimise pond conditions had serious implications on the future viability of prawn farming in Australia. This represented a significant impact on the small, but rapidly growing industry, and the immediate consequence was a reduction in the rate of industry growth.

### **Factors associated with mid-crop mortality syndrome**

In 1994-1995, intensive investigations into MCMS were underway, looking at pathology, microbiology, pond water quality, intake water quality, bloom composition, blue-green algal bloom, feed quality and pond management. Clinical signs and gross pathological lesions in MCMS outbreaks were largely non-specific. Pathological findings were inconclusive, with only minor, non-specific

histological lesions being reported (Owens *et al.*, 1998). This lack of specific lesions has continually hampered investigations into MCMS.

By the end of the 1996-1997 season, there was an association between outbreaks and maximum pond biomass and usually poor intake/water quality due to climatic events. High rainfall coming into autumn would sometimes precede MCMS.

It was found that holding prawns for longer than about 120 days in growout would increase the probability of MCMS-like problems, and it has been suggested that prawns should be harvested at or before 120 days in order to avoid this syndrome.

However, analysis of clinical records and other investigations failed to identify a single specific stressor, consistent factor or detectable water quality problem that would initiate an MCMS outbreak (Anderson & Owens, 2001).

Investigations began in April 1995 to see if a virus or viruses was (were) associated with the disease. Imported commercial kits were used to test for major exotic prawn viruses, but results were negative for White spot syndrome virus (WSSV), Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), Taura syndrome virus (TSV), Yellowhead virus (YHV) and *Baculovirus penaei* (BP). *Monodon baculovirus* (MBV) and *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) were detected, but these were known endemic viruses in Australia (Anderson & Owens, 2001).

It was demonstrated that a virus or viruses was (were) associated with diseased MCMS prawns, and that these could be transmitted experimentally. A number of virus-like particles were found using electron microscopy on MCMS prawns. Subsequent work has concentrated predominantly on 2 viruses. A parvo-like virus which was named spawner-isolated mortality virus (SMV), is somewhat enteric in nature. SMV is typically detected with PCR, or more recently with PCR/ELISA. Gill-associated virus (GAV), is morphologically and genotypically related to yellow-head virus. Originally called a corona-like virus, it has been recently placed in the new genus *Okavirus* (Mayo, 2002). There have been reports of nerve lesions associated with GAV prawn disease (Callinan *et al.*, 2003). The most common method of detecting GAV is with a nested RT-PCR. There has subsequently been significant progress in understanding these viruses. Analysis of archival prawn tissues found that these 2 viruses have been infecting prawns since at least 1992 (Anderson & Owens, 2001).

#### **Mid-crop mortality syndrome viral pathogens**

---

MCMS viruses were highly infectious. Very low doses could cause lethal disease when injected. From trials, an infectious dose could be found in as little as 0.125 µg of prawn tissue. Oral transmission does occur; they could be spread during an outbreak by healthy prawns eating infected prawn tissues. Transmission *via* water has also been demonstrated. This needed to be considered when developing disease emergency management plans, and that farms needed to consider the movement of sick prawns (e.g. controlling scavenging birds) and water transfer (e.g. aerosol drift from paddle wheel aerators) when trying to control a MCMS outbreak in one or 2 ponds (Anderson & Owens 2001).

Experimentally, MCMS viruses were lethal to *Penaeus japonicus*, *Penaeus esculentus* and *Penaeus merguensis* in addition to *Penaeus monodon*. Crab species *Portunus pelagicus* and *Scylla serrata* were not susceptible (Anderson & Owens 2001).

The viruses have a relatively long incubation time. The absence of an early explosive crop failure together with the absence of classic viral lesions made the infectious viral nature of the disease syndrome difficult to identify when the disease initially started affecting prawn farms.

Surprisingly, desiccation by drying prawn heads in the sun, even after 1 week was not successful in inactivating MCMS viruses. The viable virus dose was reduced, but more than 1 week would be required to completely inactivate MCMS viruses. Short dry out periods of 1-2 weeks could not be recommended as an effective method to inactivate MCMS viruses (Anderson & Owens, 2001).

Chlorine disinfection was highly effective for destroying MCMS viruses, even when whole prawn heads used. Treatment with chlorine at 200 mg/l for 24 hours, or 1 600 mg/l for 4 hours, was effective, but lower concentrations than those used in trials would probably be effective (Anderson & Owens, 2001).

Recommended cleanup procedure following an MCMS outbreak (Anderson & Owens, 2001):

- remove all material from ponds;
- completely destock entire farm complex;
- disinfect ponds with 100 mg/l chlorine and leave 24 hours;
- aerate for a further 24 hours to dechlorinate;
- spray other structures with concentrated chlorine (1 600 mg free chlorine/l), allow to dry at least 24 hours;
- equipment sensitive to chlorine may be disinfected with phosphonic acid-free PVP-iodine solutions;
- entire farm complex should remain dry and destocked for at least 4 weeks.

#### **MCMS viruses: origin**

There is strong evidence that SMV and GAV on farms originates from infected broodstock. One study indicated that 24% of female spawners were infected with SMV (Owens *et al.*, 2003), while the prevalence of GAV in prawns on the east coast of Queensland may be as high as 98% (Walker *et al.*, 2001). There seems to be opportunity and evidence for direct vertical and horizontal transmission of these viruses from spawners to postlarvae. This could occur through infected reproductive tissues or through horizontal contamination of eggs and postlarvae *via* water. The current industry practice of mixing batches of postlarvae would ensure that most had a high probability of being exposed to these viruses. In one study, the survival of post-larvae was negatively related to the proportion of post-larvae originating from SMV infected spawners, and these losses continued through grow-out (Owens *et al.*, 2003). In relation to a GAV outbreak on a growout farm, it was suggested that virus entered the farm *via* infected batches of postlarvae, and that the prevalence and/or severity of the batch infection influenced the severity of the disease outbreak in growout (Callinan & Jiang, 2003). Spawners and postlarvae are transported throughout Australia, and this practice has significant implications for the introduction and distribution of viral diseases.

### **Mid-crop mortality syndrome: ongoing aspects**

---

It is still not possible to accurately define the risk factors for MCMS. Further work is still required to understand the role of the different viruses and environmental factors that trigger MCMS-like outbreaks.

There are moves towards screening broodstock in commercial hatcheries for these viruses, and procedures are being looked at for disinfection of eggs, in order to try and prevent subsequent disease outbreaks in progeny. Detailed economic analyses would need to be undertaken to comprehensively compare all costs and benefits pertaining to such screening programmes.

By the 1998-1999 season MCMS ceased to be a widespread problem, although there was suspicion that some problems are not reported. This reduction in MCMS was probably due in part to the implementation of whole farm destocking and pond disinfection undertaken on many of the affected farms (Anderson & Owens, 2001). Since then, there has been some quite strong growth in the industry. Within 2002-2003, however, there have been a number of reports of MCMS-like outbreaks again occurring on northern Queensland farms. Ultimately, a cost-effective process using sensitive detection tests and other procedures has to be developed to prevent or at least predict the circumstances resulting in outbreaks, so that farms do not continue to suffer from MCMS-like mortalities.



## Stratégies d'épidémiosurveillance et d'épidémiovigilance pour la filière crevette de Nouvelle-Calédonie : présentation des résultats de la campagne 2002

P. Primot<sup>(1)</sup>, J. Herlin<sup>(2)</sup>, O. Ferré<sup>(1)</sup>, H. Sadonès<sup>(1)</sup>, D. Domalain<sup>(2)</sup>, C. Goarant<sup>(2)</sup>

(1) Direction des affaires vétérinaires, alimentaires et rurales de la Nouvelle-Calédonie (Davar)

(2) Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Jose.Herlin@ifremer.fr

### Résumé

La Nouvelle-Calédonie compte actuellement treize fermes d'élevage de crevettes et quatre écloséries commerciales. De nouveaux projets d'élevage sont appelés à se concrétiser à court et moyen termes.

Afin de répondre au mieux aux demandes des aquaculteurs et d'établir un suivi des élevages aquacoles de la Nouvelle-Calédonie, un réseau d'épidémiosurveillance a été mis en place par la direction des affaires vétérinaires, alimentaires et rurales de la Nouvelle-Calédonie (Davar) et l'Ifremer.

L'objectif du réseau est de contrôler l'état sanitaire de la filière, notamment vis-à-vis des maladies à déclaration obligatoire citées par l'Office international des épizooties (OIE) (maladie des points blancs, maladie de la tête jaune et syndrome de Taura) et d'intervenir sur toute pathologie entraînant des mortalités anormales. Dans ce schéma, l'Ifremer assure la veille clinique des exploitations. Il agit en tant qu'interlocuteur central en conduisant l'enquête diagnostique avec le service des laboratoires officiels vétérinaires, agroalimentaires et phytosanitaires de la Nouvelle-Calédonie (LNC). En cas de suspicion de maladie à déclaration obligatoire, le service vétérinaire officiel prend les mesures de police sanitaire adaptées à la situation.

La sensibilisation des aquaculteurs, fondamentale au fonctionnement du réseau, est assurée par la Davar en partenariat avec le groupement des fermes aquacoles (GFA).

Parallèlement à cette surveillance continue, une enquête a été mise en place par la Davar en 2002. Le plan d'échantillonnage répond aux recommandations de l'OIE. Quatre cents échantillons prélevés sur l'ensemble des fermes ont permis de faire un état des lieux sur les trois maladies à déclaration obligatoire de l'OIE.

La mise en place de ce réseau permet une surveillance efficace du statut sanitaire de la crevette calédonienne par l'amélioration de la concertation entre les laboratoires, l'identification d'un interlocuteur central et la circulation de l'information.

### Abstract

Thirteen shrimp farms and four hatcheries are in operation in New Caledonia to date, with more projects to come out in the near future.

In order to both meet the needs of the farmers and monitor the shrimp crops in New Caledonia, a health surveillance and monitoring programme has been set up by the Direction des affaires vétérinaires, alimentaires et rurales de la Nouvelle-Calédonie (Davar) in association with Ifremer.

The aim of this network is to check up the health status of the industry, particularly regarding the diseases notifiable to the OIE, World Organization for Animal Health (White Spot Syndrome Disease, Yellow Head Disease and Taura Syndrome) and to investigate any abnormal mortality outbreak.

In this plan of action, Ifremer is in charge of the clinical watch of the aquaculture operations. It acts as the central office and leads the diagnostic investigations in relation with the official laboratory in New Caledonia. In case of suspicion of notifiable disease outbreak, the official veterinary service takes the appropriate biosecurity measures.

The information to farmers which is essential to ensure a good operation of the programme is carried out by Davar in relation with the Shrimp Farmer Association (GFA). Beside this sustained health surveillance, the official agriculture services in New Caledonia (Davar) have begun a shrimp virus monitoring programme in 2002 in accordance with OIE recommendations. Four hundred samples covering all farms have allowed to draw a health status regarding the three diseases notifiable to the OIE. The implementation of this network allows an efficient surveillance of the New Caledonian shrimp health status by centralising the information and improving dialogue and communication between laboratories.

## **Introduction**

---

L'aquaculture de crevettes pénéides a été confrontée ces quinze dernières années à l'apparition de maladies infectieuses et de nombreux pays producteurs ont vu leur production chuter de façon catastrophique. Bien qu'ayant retrouvé, depuis, un regain de production, beaucoup sont désormais concernés par des pathogènes qui compromettent la rentabilité des exploitations et qui restent une menace importante pour les zones encore indemnes (Lightner, 1995 ; Brock, 1997 ; SNI, 1997). Cette situation a instauré une réaction de prévention au niveau mondial et des protocoles plus stricts de contrôle et de vérification sanitaires dans les mouvements de crevettes ont été élaborés (Lightner & Redman, 1998b ; AQUIS, 2000). La filière crevette de Nouvelle-Calédonie, dont l'orientation commerciale se base quasi exclusivement sur l'export, se devait de mettre en place un dispositif zoosanitaire dont les objectifs sont : la reconnaissance du statut indemne de trois maladies à déclaration obligatoire (la maladie des points blancs, le syndrome de Taura et la maladie de la tête jaune) de l'Office international des épizooties (OIE), la mise en place d'un dispositif d'alerte pour les maladies émergentes, le suivi des maladies enzootiques connues et le maintien du statut zoosanitaire des cheptels. Le propos de cet article s'attache aux deux premiers points qui résultent des dernières réflexions de ce schéma et traduisent la volonté de la Nouvelle-Calédonie de montrer une image responsable de sa principale industrie aquacole. En effet, épargnée jusqu'à présent par ces épizooties, il apparaissait indispensable d'évaluer son statut sanitaire et de se doter d'un moyen de vigilance face aux risques de maladies émergentes. C'est chose faite depuis 2002, avec la mise en œuvre et la coordination conjointe, par

la direction des affaires vétérinaires, alimentaires et rurales (Davar) de la Nouvelle-Calédonie et de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), d'un programme d'épidémiosurveillance, dont les objectifs sont de confirmer le statut sanitaire indemne de la Nouvelle-Calédonie vis-à-vis des maladies à déclaration obligatoire de l'Office international des épizooties (OIE), et de mettre en place un programme de suivi sanitaire concerté de la filière.

Ce programme s'appuie sur une enquête descriptive, permettant d'évaluer la prévalence de ces trois maladies au sein des populations de crevettes, élevées et sauvages, de la Nouvelle-Calédonie et sur un réseau d'épidémiosurveillance regroupant les différents intervenants dans le domaine sanitaire de cette filière.

### **Statut sanitaire actuel de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie**

La pénéculture calédonienne a débuté au niveau commercial dans les années quatre-vingt par l'introduction d'une souche mexicaine de *Litopenaeus stylirostris*, qui demeure actuellement la seule espèce élevée en Nouvelle-Calédonie.

À ce jour, treize fermes et quatre écloséries assurent une production annuelle de l'ordre de 1 800 tonnes qui représentent 89 % des exportations agricoles de la Nouvelle-Calédonie.

Des épisodes de mortalités apparaissant en 1993 permettent de faire un inventaire des agents potentiellement pathogènes, lequel met en évidence une vibriose attribuée à *Vibrio penaeicida*, appelée « Syndrome 93 » (Goarant *et al.*, cet ouvrage; Saulnier *et al.*, cet ouvrage).

Dès lors, un suivi clinique et technique des exploitations a été assuré par un organisme de recherche, l'Ifremer, et par le laboratoire de Nouvelle-Calédonie (LNC) en partenariat avec le laboratoire du Docteur D. Lightner à Tucson en Arizona (USA). À ce jour, aucune des trois maladies à déclaration obligatoire de l'OIE préalablement citées n'a été diagnostiquée dans les élevages de crevettes de la Nouvelle-Calédonie. Les recherches effectuées sur des crevettes saines ou lors d'épisodes de mortalité ont montré que les seuls pathogènes présents étaient des bactéries du genre *Vibrio*, et le virus IHHN (Costa *et al.*, 1998 b). Ce dernier, bien que listé par l'OIE, ne provoque pas en Nouvelle-Calédonie d'épisodes significatifs de mortalité et passe inaperçu hors recherche spécifique. Il semble qu'au cours de son adaptation sur ce territoire, la souche calédonienne de *Litopenaeus stylirostris* ait acquis une résistance au virus IHHN (Weppe *et al.*, 1992).

Afin de préserver cette situation, la réglementation de la Nouvelle-Calédonie interdit (par l'arrêté n° 2000-2463/GNC) toute introduction de crevettes crues ou congelées et oblige pour toute importation de crustacés vivants à respecter les conditions sanitaires requises par l'OIE ainsi que la mise en quarantaine de ces animaux. De plus, une stratégie a été définie afin de confirmer le statut sanitaire indemne de la Nouvelle-Calédonie. Elle comporte une enquête descriptive, un travail de sensibilisation auprès des professionnels et l'organisation d'un réseau d'épidémiosurveillance.

## **Confirmation du statut sanitaire indemne de la maladie des points blancs, du syndrome de Taura et de la maladie de la tête jaune**

---

### **Surveillance active**

Une enquête descriptive a pour objectif de déterminer la prévalence du portage viral de la maladie des points blancs, du syndrome de Taura et de la maladie de la tête jaune dans la population de crevettes d'élevage et sauvages de la Nouvelle-Calédonie et de confirmer l'absence de ces trois maladies en utilisant une méthode officiellement reconnue par l'OIE.

### **Échantillonnage**

Conformément aux recommandations de l'OIE, l'échantillonnage retenu pour cette enquête a été de 30 crevettes vivantes et entières par ferme aquacole et de 150 pour le milieu naturel.

Cet échantillonnage correspond à l'échantillonnage minimum préconisé dans le cadre du maintien du statut sanitaire indemne d'un pays (OIE, 2000.)

### **Collecte et conditionnement des échantillons**

Quatre cent soixante (460) spécimens ont été récoltés sur l'ensemble des sites de production.

Les crevettes ont été transportées sous couvert du froid vers le laboratoire officiel de la Nouvelle-Calédonie (LNC) en vue d'être conditionnées pour les différentes analyses retenues dans cette enquête.

Les branchies et les pléopodes ont été prélevés sur chaque crevette et regroupés par 6 de même origine.

Pour des raisons de logistique, les prélèvements de crevettes en milieu naturel n'ont pu être effectués au cours de la campagne 2002.

### **Analyses**

Les analyses ont été réalisées dans deux laboratoires, selon des procédures d'analyse officiellement reconnues par l'OIE.

#### **• Maladie des points blancs**

Les analyses ont été réalisées au LNC selon la méthode du Dot Blot.

#### **• Syndrome de Taura et maladie de la tête jaune**

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire du Dr Lightner (Tucson, Arizona), laboratoire de référence de l'OIE pour les maladies des crustacés. La technique utilisée a été la RT-PCR. La préparation et l'envoi des échantillons ont été réalisés par le LNC.

### **Résultats**

Les résultats ont été négatifs pour l'ensemble des analyses.

### **Conclusions**

Les premiers résultats tendent à confirmer le statut sanitaire indemne de la Nouvelle-Calédonie vis-à-vis de ces trois maladies. Néanmoins, afin d'atteindre intégralement l'objectif de reconnaissance du statut indemne à travers la méthode officielle de l'OIE, cette enquête doit, d'une part, être reconduite dans sa totalité dans un délai d'un an et, d'autre part, inclure l'échantillonnage de la population sauvage. Ceci sera effectué au cours de l'année 2004.



## Réseau d'épidémiologie

### Définition

Un réseau d'épidémiologie a été mis en place afin de coordonner au mieux les différents acteurs intervenant sur le plan sanitaire pour cette filière.

Ce réseau regroupe les partenaires de la filière crevette en Nouvelle-Calédonie que sont les fermes et les écloséries, le groupement des fermes aquacoles (GFA), la direction des affaires vétérinaires, alimentaires et rurales (Davar) et l'Ifremer.

C'est un réseau défini comme :

- intégré, car il se base sur des actions de diagnostic existantes, réalisées par l'Ifremer et le laboratoire de la Nouvelle-Calédonie (LNC), et impliquant principalement des vibrioses ;
- d'épidémiologie de par son action sur des maladies présentes, mais intégrant un volet d'épidémiologie, axé sur les trois maladies à déclaration obligatoire de l'OIE absentes à ce jour et sur d'éventuelles maladies émergentes.

### Fonctionnement

#### Surveillance active

Bien que la Davar agisse en tant qu'autorité compétente, l'Ifremer, qui dispose de personnel en contact régulier avec les professionnels, coordonne la veille clinique de ce réseau.

Une visite sanitaire des sites d'élevage est réalisée au moins deux fois par an. Les rapports de ces visites sont ensuite transmis au service vétérinaire officiel de la Nouvelle-Calédonie (Sivap).

#### Surveillance passive

La gestion zootechnique des exploitations de crevettes inclut dans un prévisionnel d'élevage une part de mortalité considérée comme normale en fonction des types d'élevage. Elle est principalement évaluée par des paramètres tels que la survie théorique à une période donnée, la ration distribuée et le poids moyen des crevettes. Quand l'élevage se déroule comme prévu, cette mortalité « basale » est indécélable *de visu* par l'aquaculteur. L'observation de crevettes moribondes et/ou mortes dans un bassin, parfois associée à des baisses de performances zootechniques (perte d'appétit, retard de croissance...) indique une mortalité « anormale » qu'il convient de signaler. Bien qu'utilisant des critères d'appréciation plus adaptés aux post-larves et aux bacs d'élevage larvaire, ce principe s'applique également aux écloséries. Dans le schéma mis en place, l'apparition de signes cliniques suspects se traduisant principalement par une mortalité anormale doit conduire l'aquaculteur à informer le laboratoire aquacole de Calédonie (LAC) de l'Ifremer à Koné, qui coordonne les différents moyens susceptibles de déterminer les causes de ces mortalités (moyens propres, LAC de Saint-Vincent à Boulouparis, LNC à Païta).

Les analyses de laboratoire complémentaires sont traitées directement par le LNC ou sous-traitées au laboratoire du Dr Lightner (Tucson, Arizona), laboratoire de référence de l'OIE.

Les résultats sont communiqués et discutés entre laboratoires puis diffusés à l'aquaculteur demandeur par l'intermédiaire du LAC de Koné.

En cas de suspicion de l'une des trois maladies à déclaration obligatoire à l'OIE (signes cliniques, résultats positifs...), l'alerte est donnée au Sivap, seul service habilité à mettre en place des actions de police sanitaire dont les modalités devront être définies prochainement.

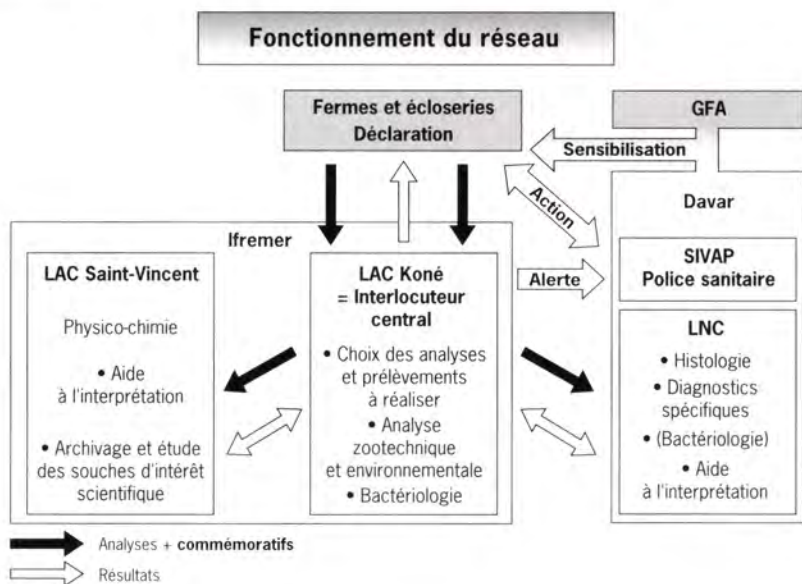


Schéma du réseau d'épidémiosurveillance de la filière crevette en Nouvelle-Calédonie.

### Objectifs

Le réseau d'épidémiosurveillance organise un recueil central de la demande de diagnostics des professionnels, une concertation et une optimisation des moyens d'analyses. L'articulation entre les intervenants repose sur une circulation de l'information systématique et en temps réel entre laboratoires, pour une lisibilité accrue des résultats et l'efficacité du dispositif.

La filière crevette néo-calédonienne dispose ainsi d'un outil d'aide à la compréhension et à la décision, servant des intérêts à la fois individuels (gestion zootechnique) et collectifs (mesures sanitaires, enquêtes écopathologiques). Il sert également de sentinelle de par son volet d'épidémiovigilance. Il permet de plus la collecte de souches bactériennes d'intérêt scientifique (pathogènes, à potentiel probiotique...) qui servent aux travaux de recherche menés en soutien à cette filière.

### Sensibilisation

La sensibilisation des professionnels est un élément indispensable au bon fonctionnement d'un tel réseau et ceci d'autant plus que la déclaration de mortalité anormale n'est pas imposée par un cadre légal. Une campagne d'information et de sensibilisation des professionnels de l'aquaculture sur les principaux symptômes de ces maladies a été réalisée conjointement à cette enquête. Des réunions

d'information ont été organisées ainsi que l'élaboration et la distribution d'un poster illustré décrivant les signes et symptômes de chacune de ces 3 maladies. Des nécessaires de prélèvement et de préservation d'échantillons (fiches commémoratives, protocoles et produits de traitement) permettront aux aquaculteurs, notamment ceux géographiquement plus isolés, de saisir eux-mêmes et en temps réel les éléments d'une mortalité anormale avant de les transmettre au laboratoire dans des conditions satisfaisantes. De plus et bien qu'aucune mesure de zonage n'ait été mise en place à ce jour, les écloséries et les fermes ont été encouragées à ne pas effectuer de transferts de crevettes (géniteurs) entre exploitations ou à les restreindre à celles géographiquement proches l'une de l'autre. Des protocoles de transferts incluant des mesures de biosécurité leur ont été diffusés.

### **Conclusion**

Le statut sanitaire indemne de la Nouvelle-Calédonie vis-à-vis des trois maladies à déclaration obligatoire a été en partie montré mais nécessite le renouvellement de l'enquête selon les normes de l'OIE en incluant des crevettes sauvages pour obtenir une validation du statut. La mise en place d'un réseau de veille zoosanitaire permet une surveillance efficace du statut sanitaire de la crevette calédonienne par l'amélioration de la concertation entre les laboratoires, l'identification d'un interlocuteur central et la circulation de l'information.

Ce dispositif récent manque encore de maturité dans les relations à mettre en place entre les différents intervenants. Ainsi, sans obligation de déclaration, des cas de mortalités anormales passent encore inaperçus. Toutefois, des mesures comme la mise à disposition de nécessaires de prélèvement et de traitement d'échantillons permettront de réduire ces absences de rapports et/ou de matériel biologique à analyser. Le développement de ce dispositif zoosanitaire doit également prendre en compte des mesures réglementaires et techniques de biosécurité à appliquer en cas de suspicion de maladie émergente (zonations, mise en quarantaine, traitements...). Enfin, basé principalement sur les standards 2000 de l'OIE, il doit également poursuivre la réflexion et s'adapter aux révisions telles qu'elles apparaissent dans le Code 2003.

Les prévisions de croissance de la production de crevettes en Nouvelle-Calédonie, estimées à environ 50 % supplémentaires à une échéance de 5 ans, rendent nécessaire l'organisation de la surveillance sanitaire, dans un système cohérent et coordonné et selon des méthodes reconnues internationalement. Le partenariat des différents intervenants (aquaculteurs, Ifremer, Davar) est une base de réussite importante pour le maintien de cet objectif.

# Relations entre l'aquaculture et l'environnement côtier (impact, sélection de site, potentiel de production) : application à l'aquaculture de crevettes

J.L.M. Martin

Ifremer, Crema L'Houmeau, 17137 L'Houmeau, France  
Jean.Louis.Martin@ifremer.fr

## Résumé

Pour un développement optimal, l'activité aquacole doit s'insérer dans son environnement. Aux caractéristiques environnementales correspondent des pratiques aquacoles qui leur seront les plus adaptées. C'est ainsi que certains milieux seront totalement inaptes à l'aquaculture, quel qu'en soit le mode, d'autres seront plus favorables à une activité de type intensif alors que d'autres seront propices à une activité de caractère extensif. Les relations entre la nature de l'activité aquacole - plus spécialement l'aquaculture de crevettes - et les capacités de production, d'une part, et les caractéristiques écologiques du milieu, d'autre part, sont analysées dans ce travail. Les observations et résultats des programmes de recherche réalisés dans ce domaine (critères de sélection des sites et impact de l'aquaculture) sont présentés en prenant en compte les différents modèles d'aquaculture et d'écosystèmes étudiés dans différents pays (Indonésie, Vietnam, Nouvelle-Calédonie, Brésil, Équateur...).

## Abstract

To get an optimal development, aquaculture must fit into its surrounding environment. Thus, some environment are unsuited for aquaculture development, what ever the type, intensive or extensive. Some will be suitable for intensive and other for extensive aquaculture type. The relationships between the different types of aquaculture and their capacity of production (with special emphases on shrimp aquaculture) on one hand, and the characteristics of the environment on the other hand are analyzed. The observations and results from works carried out in that field (criteria for site selection, impact of waste effluents...) are shown taking into account the different models of production and the structure of the ecosystems hosting the activity, in many countries all over the world (Indonesia, Vietnam, New Caledonia, Brazil, Equator...).

## Introduction

L'observation des productions de crevettes, tous modèles confondus, de l'extensif à l'intensif, montre que, à l'échelle mondiale, il existe une relation quantitative entre production et caractéristiques environnementales. C'est ainsi que les meilleures performances sont réalisées dans les eaux coralliennes, milieux très peu chargés en matière en suspension, matière organique et bactéries hétérotrophes. À l'inverse,



de très faibles productions, voire des productions nulles, sont réalisées dans des milieux présentant de fortes concentrations de ces éléments. Ces dernières peuvent être dues à des conditions naturelles (sud du delta du Mékong par exemple) ou à des causes de nature anthropique, parmi lesquelles une auto-pollution du site par l'activité aquacole elle-même (certains sites d'Indonésie, Thaïlande...).

Il est à remarquer, également, que l'aquaculture de caractère extensif, ou « extensif+ », c'est-à-dire pour laquelle la production des organismes est totalement ou en grande partie supportée par le milieu, voit son maximum de performances réalisé dans des eaux de caractère eutrophique.

Il apparaît donc que ces deux types d'aquaculture et leurs intermédiaires nécessitent des milieux présentant des caractéristiques différentes. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les relations entre la production de crevettes réalisée dans les différents systèmes d'élevage et les caractéristiques de l'environnement aquatique dans lequel les élevages sont pratiqués. Le choix des sites, des types de production et du système d'élevage adapté à tel ou tel type d'écosystème pourra être décidé sur des critères objectifs basés sur des mesures de paramètres représentatifs de l'état de l'environnement.

### **L'activité aquacole et son positionnement dans l'environnement**

La figure 1 montre le concept de production aquacole en fonction des caractéristiques de l'environnement. Il apparaît que le milieu d'élevage est sous la dépendance de deux facteurs essentiels qui sont, d'une part, la capacité à renouveler l'eau qui le baigne et, d'autre part, sa capacité à accumuler les matières organiques.

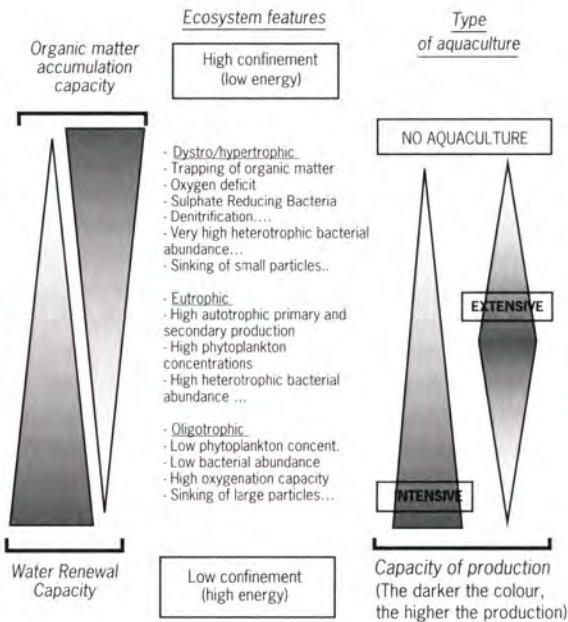


Figure 1 - Positionnement des différents types d'aquaculture et performances potentielles de production en fonction du confinement et des caractéristiques de l'environnement côtier (d'après Martin, 2002).

Deux grands paramètres gouvernent cette capacité de renouvellement de l'eau et de l'accumulation de matière organique, à savoir, d'une part, les caractéristiques géomorphologiques (baies ouvertes, semi-fermées, estuaires...) et, d'autre part, les caractéristiques hydrodynamiques (amplitude des marées, courants...). Cette capacité au renouvellement de l'eau et à l'accumulation des matières organiques va influencer sur les caractéristiques environnementales.

En particulier, dans les sites à grande capacité de renouvellement de l'eau (sites à forte « énergie »), des conditions stables de caractère oligotrophique ou très faiblement eutrophique seront observées, se traduisant par des concentrations faibles de phytoplancton, de bactéries hétérotrophes, une capacité d'oxygénation élevée. Dans ces milieux à haute « énergie » et forte capacité de renouvellement d'eau, les particules fines ne sédimentent pas. Or, ces particules fines sont le site préférentiel d'adsorption de la matière organique et des contaminants chimiques (Martin *et al.*, 1993). Ces milieux présentent une grande capacité d'évacuation (assimilation, dispersion) de la matière organique. C'est dans ce type de milieu que pourra se développer l'aquaculture de caractère intensif. En effet, ce type d'aquaculture a pour caractéristique essentielle d'introduire de la matière organique (rejets de l'activité aquacole, i.e. fèces, granulés non consommés, matière organique dissoute, phytoplancton) et des métabolites de la dégradation de la matière organique (sels nutritifs) dans le milieu environnant (Briggs & Funge-Smith, 1994; Martin *et al.*, 1998). C'est d'ailleurs la non-connaissance ou le non-respect de cette notion de capacité du milieu à « éliminer » les déchets organiques qui a conduit à la réduction des productions, et souvent à l'effondrement des élevages de crevettes dans de nombreux pays tels que la Thaïlande, l'Indonésie, l'Équateur...

La figure 2 montre la relation existant entre les rejets aquacoles et la capacité du milieu à éliminer ces déchets. Ainsi, pour une même quantité de déchets rejetés dans l'environnement, l'écosystème D sera plus susceptible d'évolution de caractère dystrophique que l'écosystème A. Dans les milieux confinés (écosystème D),

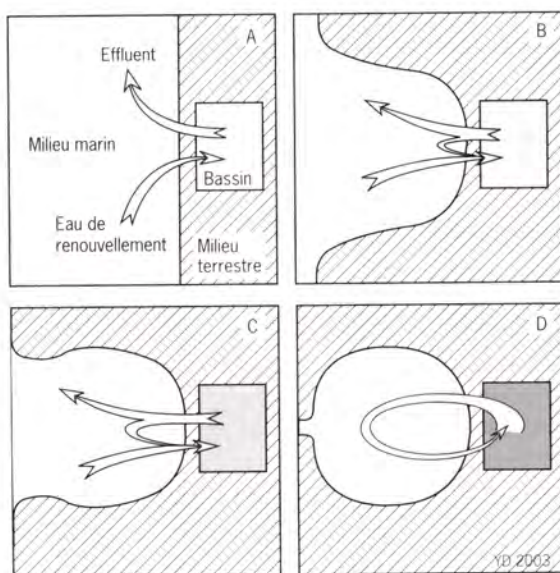


Figure 2  
Le confinement des écosystèmes côtiers et les effluents aquacoles. Impact potentiel et auto-pollution.

à faible potentiel de renouvellement d'eau, la capacité d'accumulation des matières organiques, d'origine naturelle (matière détritique issue des forêts par exemple) ou anthropogénique (effluents aquacoles), sera élevée. Par ailleurs, dans ces écosystèmes confinés, la matière organique présente « tournera en boucle » en termes de minéralisation, production bactérienne et production primaire. Ces milieux se distinguent par des caractéristiques de nature dystrophique se traduisant par de fortes concentrations de matière organique, des déficits d'oxygène, des concentrations très élevées de bactéries hétérotrophes... Ces milieux sont défavorables au développement de l'aquaculture dans la mesure où l'eau pénétrant dans les bassins ne peut jouer son rôle de diluant et d'oxygénant du milieu d'élevage.

Il est à noter que la dégradation du milieu environnant sous l'influence des rejets a pour conséquence de déplacer les caractéristiques du milieu vers des conditions de caractère dystrophique. C'est ainsi que, sur de nombreux sites (Phillips *et al.*, 1993), la dégradation de la qualité du milieu sous l'influence des rejets organiques a coïncidé avec une diminution au cours du temps de la production de crevettes (fig. 3).

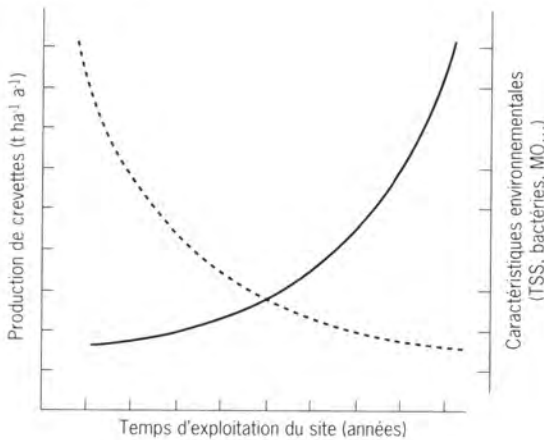


Figure 3  
Évolution au cours du temps de la production de crevettes (ligne discontinue) et des paramètres environnementaux (ligne pleine) observés sur les sites ayant fait l'objet de collapsés sous l'influence des rejets aquacoles.

Les élevages de caractère extensif nécessitent des caractéristiques particulières. En effet, dans ce type d'élevage, la matière organique sera extraite de l'environnement, soit sous forme de phytoplancton pour les filtreurs (mollusques), soit sous forme de proies carnées pour les prédateurs (crevettes, poissons). Le développement optimal de ce type d'aquaculture nécessitera un environnement dans lequel une production de type autotrophique pourra s'exprimer suffisamment (apport de sels nutritifs, minéralisation de la matière organique, temps de résidence des eaux) pour alimenter la chaîne trophique conduisant à la production souhaitée. C'est ainsi, par exemple, que les plus importants sites de production de mollusques, huîtres ou moules, sont situés dans des bassins et baies semi-fermés alimentés en éléments nutritifs et matière organique par un fleuve (Tenore *et al.*, 1985 ; Zurburg *et al.*, 1994), c'est-à-dire dans des sites où les apports de nutriments sont suffisants pour soutenir la production, où les renouvellements d'eau sont suffisants pour permettre un développement de caractère autotrophique et, enfin, où le caractère



de « semi-confinement » autorise des concentrations de phytoplancton optimales pour soutenir la production des filtreurs. Les tentatives de développement de l'aquaculture de crevettes en mode extensif sont réalisées le plus souvent lorsque l'aquaculture de type intensif a échoué, ou lorsque les infrastructures (routes, usines de traitement) et/ou les investissements alloués au développement de caractère intensif sont insuffisants voire inexistants. Il s'avère donc que le développement de l'aquaculture de crevettes en mode extensif a été (et est encore) le plus souvent un pis-aller ou une nécessité à caractère socio-économique. Cependant, comme pour l'aquaculture de caractère intensif, le développement de l'extensif doit répondre à des contraintes environnementales liées à sa nature. En effet, au même titre que pour l'intensif, et peut-être plus, la production en mode extensif dépend de la qualité de l'eau pénétrant dans les bassins. C'est ainsi qu'au Vietnam, dans la partie sud du delta du Mékong, il a été montré (Martin, 2002) que la production de crevettes, de type extensif ou « extensif+ », était significativement ( $P < 0,001$ ) corrélée aux paramètres relevant du métabolisme de la matière organique et de la production primaire autotrophe existant dans l'eau alimentant les bassins (production primaire, concentration de chlorophylle...). Cependant, sur les sites présentant des caractéristiques de dystrophie, avec, par exemple, des concentrations très élevées de bactéries hétérotrophes ( $> 5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ), la production de crevettes en mode extensif se révèle totalement improductive, quel que soit le mode de management des bassins et, en particulier, la fréquence de renouvellement de l'eau. Il apparaît donc que la production en mode extensif ne peut être développée que dans des sites présentant des caractéristiques propres au développement de la chaîne trophique aboutissant à la production de proies pour les crevettes mises en élevage. Ces informations confirment que l'aquaculture de mode extensif ne peut pas être considérée comme un substitut de l'aquaculture intensive, lorsque celle-ci se trouve en échec pour des raisons environnementales. Chacun de ces types d'activité, extensif et intensif, nécessite un environnement répondant à des critères différents et précis. De ce fait, le succès de l'aquaculture de crevettes ne pourra être assuré que dans la mesure où le choix du type d'activité souhaitée et/ou possible sera fait en fonction du type d'écosystème accueillant cette activité.



# Un exemple de gestion des effluents d'une ferme industrielle de crevettes intégrant la mangrove

J.V. Mogollón<sup>(1)</sup>, L.E. Sánchez-Arias<sup>(1)</sup>, R. Bador<sup>(2)</sup>

(1) C.I. Agrosoleidad S.A., San Onofre, Córdoba, Colombie

(2) Sodacal S.A., BP A3, 98848 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
sodacal@offratel.nc

## Résumé

Les fermes de crevettes semi-intensives se caractérisent notamment par une densité d'ensemencement relativement faible et une biomasse en élevage réduite, leur seule source d'oxygène dissous étant celui apporté par l'eau pompée et renouvelée nuit et jour, qui s'ajoute à celui produit le jour par le phytoplancton. Ces renouvellements, de 5 à 20 % par jour en moyenne, concernent des fermes couvrant parfois des centaines d'hectares et représentent donc des effluents pouvant se chiffrer en mètres cubes par seconde. Leur éventuel impact sur le milieu environnant est souvent sujet de polémique. Une ferme de 265 hectares située sur la côte caraïbe colombienne a conçu et testé en grandeur réelle un ingénieux système de passage obligé de tous ses effluents au travers d'une zone aménagée de la mangrove couvrant 116 hectares. Cette ferme rencontrait de manière saisonnière un problème de prolifération de cyanobactéries dégradant la qualité (odeur et saveur) de la crevette. Après une multitude d'essais variés, la solution a consisté à aménager une zone de mangrove comme filtre biologique permettant de réutiliser la même eau en re-circulation et d'isoler ainsi la ferme du milieu extérieur qui se révélait, par période, de qualité incompatible avec la crevetticulture. Le suivi de la qualité des eaux en amont et en aval de la ferme a permis de montrer qu'en termes de DBO<sub>5</sub> et MES l'eau sortant du bio-filtre était de meilleure qualité que l'effluent brut de la ferme et, mieux encore, que l'eau du milieu naturel. En outre, l'augmentation sensible de la faune aviaire associée à la croissance ainsi favorisée de la mangrove a récemment permis d'observer un enrichissement naturel de l'eau re-circulée en phosphore provenant du guano. Cette conséquence supplémentaire permet désormais d'augmenter la productivité des bassins sans fertilisation artificielle.

## Abstract

Semi-intensive shrimp farms are partly characterized by a limited stocking density and a rather low biomass in ponds, as their only dissolved oxygen source is the oxygen coming with the 24 hours pumped and exchanged water, which is added to the oxygen produced in the day time by phytoplankton. These water exchanges, in average 5 to 20% per day, are run in farms covering up to several hundreds of hectares and can represent up to several cubic metres per second. Their potential impact on the surrounding environment is often debated. A 265 hectare farm located on the Caribbean coast of Colombia has designed and tested in a real scale situation an original system of all effluents going through a 116 hectare planted mangrove area. This farm used to face a seasonal problem of "choclo" smell and

taste of its shrimp, due to massive multiplication of some cyanophytes, which could make the shrimp unmarketable. After numerous and different trials, the solution has been to use a specific mangrove area as a bio-filter and recirculate the same water in order to isolate the farm from the outside environment, when it was becoming incompatible with shrimp farming. The in and out water quality monitoring showed that, in terms of BOD<sub>5</sub> and TSS, water coming out of the biofilter was better than raw effluent of the farm, but also than the original pumped water, while planted mangrove was in full growth inside the biofilter area. A notable increase of avian fauna associated to this facilitated growth of the mangrove recently showed a natural enrichment of the recirculated water with phosphorus from the guano. This additional result allows now the farm to increase its pond productivity without any artificial fertilizer.

### Introduction

---

En élevage de crevettes tropicales, la méthode de grossissement dit semi-intensif se caractérise notamment par des densités d'ensemencement relativement faibles (dépassant rarement 20 post-larves par mètre carré), une biomasse limitée (dépassant rarement 300 g/m<sup>2</sup>) et des renouvellements d'eau variant de 5 à 20 % par jour (Phillips *et al.*, 1993). Pour des fermes de centaines d'hectares de bassins, ces renouvellements d'eau peuvent ainsi représenter des flux de plusieurs mètres cubes par seconde.

Sur la côte caraïbe de Colombie, une ferme industrielle, avec 265 hectares de bassins, est située en retrait de l'estuaire du fleuve Sinú qui reçoit notamment les eaux de rejets d'un aménagement social d'irrigation de 3 000 ha, dans lequel est cultivé principalement du riz, avec utilisation d'engrais agricoles en routine. Cet estuaire, ancienne zone traditionnelle de culture de riz comblée par les sédiments apportés par le fleuve, est désormais envahi par une forêt de mangrove en pleine expansion (Sánchez-Páez, 1994).

En septembre 1994, une prolifération de cyanobactéries, probablement engendrée par le développement de l'agriculture fertilisée et irriguée, a commencé à être observée dans l'estuaire où est installée la station de pompage de la ferme de crevettes. Ces cyanobactéries ont alors envahi la ferme elle-même, pouvant aller jusqu'à rendre la crevette invendable à cause d'une odeur et une saveur de vase désagréables (Engle *et al.*, 1995). Depuis cette époque, cette prolifération se produit chaque année à la saison des pluies sur une période d'environ 3 mois (de septembre à novembre).

Après une gestion des pêches à court terme (anticipant ou retardant les pêches pour réduire le plus possible les récoltes à la période de haut risque d'odeur/saveur de vase), la ferme a démarré un vaste programme de recherche appliquée et d'expérimentations pour trouver un moyen économiquement raisonnable de disposer d'un approvisionnement en eau de mer ou en eau saumâtre compatible avec la crevetticulture tout au long de l'année.

Parallèlement, et parce que conscients des problèmes potentiels que pouvaient représenter des effluents bruts relargués dans un milieu naturel déjà déséquilibré par les rejets de la riziculture fertilisée et irriguée, les propriétaires de la ferme ont donné au programme comme objectif supplémentaire de définir un moyen efficace et économiquement raisonnable de traiter les effluents de cette ferme.

À l'issue de multiples recherches bibliographiques et consultation des plus grands experts nationaux et internationaux en matière de gestion et contrôle des proliférations algales en milieu salé ou saumâtre, les responsables du programme se sont orientés vers le principe de la re-circulation de l'eau de la ferme à travers une zone de mangrove aménagée, permettant ainsi de s'isoler d'un milieu défavorable à la crevetticulture durant plusieurs mois de l'année.

### **Matériel et méthodes**

Les protocoles et techniques utilisés dans cette étude se sont largement appuyés sur la méthode de « phyto-épuration » par la mangrove développée en Colombie dans le cadre d'un programme soutenu par l'Institut colombien du pétrole depuis le début des années quatre-vingt-dix.

La mangrove est un écosystème très productif du littoral des régions tropicales et subtropicales. C'est une flore très spécifique, essentiellement constituée de palétuviers qui a comme originalité d'être capable de se développer dans des environnements *a priori* difficiles : zones inondables, instables, anoxiques, avec des pH acides et des contenus élevés en sels divers, alternance d'eaux douces et salées... Parmi les caractéristiques spécifiques de la mangrove, on peut noter ses systèmes de reproduction « vivipare » (la graine commence à germer sur la plante mère) et de dispersion par graines (germées ou plantules) flottantes, l'existence de racines aériennes (pneumatophores) complétant des racines aquatiques fixées au sol gorgé d'eau et ses systèmes de rhyzo-filtration et excrétion de sels. En plus de la capacité propre des racines à absorber certains sels, une rhyzosphère se forme associant des bactéries aux processus biologiques des racines elles-mêmes. Ces associations avec différentes bactéries permettent ainsi à la mangrove d'assimiler des phénols et de dégrader de nombreuses molécules organiques nocives produites par l'activité humaine (Alongi, 1996).

Par ailleurs, cette remarquable « machine biologique » peut fonctionner en présence de certains sels, même s'ils ne sont pas de simples chlorures de sodium. C'est ainsi qu'une équipe de chercheurs de l'Institut colombien du pétrole (ICP) a mis au point un procédé original intitulé « Processus naturel de réduction des teneurs en sels et en métaux lourds de systèmes aqueux contaminés ». Ce procédé, développé à l'origine au cœur de la cordillère des Andes, consiste à **planter des plantules de *Rhizophora mangle*** dans une zone aménagée où l'on fait transiter les eaux de rejets d'une zone d'extraction de pétrole, ou d'une tannerie, pour en extraire le barium ou le mercure. Ce travail a abouti au dépôt d'un brevet d'invention (Grosso *et al.*, 2000).

Les gestionnaires de la ferme de crevettes, souffrant d'une qualité d'eau de pompage en deçà des conditions favorables à la crevetticulture durant plusieurs mois par an, ont décidé de tester l'application du procédé exposé ci-dessus à leur contexte très spécifique.

La ferme possède actuellement 265 ha de bassins de grossissement semi-intensif de *Litopenaeus vannamei*. Elle est située à l'ouest du golfe de Morrosquillo, dans l'estuaire du fleuve Sinú, sur la côte caraïbe de la Colombie, à 100 km à vol d'oiseau de la ville de Cartagena. Sa station de pompage a été construite sur un réseau de canaux d'alimentation qui donne accès à l'eau de la baie de Cispatá après plu-

sieurs kilomètres de chenaux traversant un estuaire envahi par la mangrove naturelle. Elle pompe entre 6 et 8,5 m<sup>3</sup>/seconde en routine, 24 heures sur 24, ce qui représente 500 000 à 750 000 m<sup>3</sup>/jour, le marnage étant limité à quelques dizaines de centimètres au maximum.

Au début du programme, la ferme, qui couvrait 171 ha de bassins depuis 1989, utilisait une zone de mangrove naturelle de 200 ha comme récepteur et filtre biologique de l'ensemble de ses effluents (Bador, 1997). Un aménagement du canal de drainage permettait une diffusion des effluents en de multiples points d'entrée dans la zone de mangrove. Ceux-ci circulaient lentement à l'ombre des palétuviers, avec un fort processus de sédimentation et une forte croissance de la végétation favorisée et enrichie par les effluents. À l'issue des premières années de fonctionnement du système, certains effets pervers apparurent et montrèrent les limites de la méthode: l'augmentation de la densité végétale et l'accroissement des processus de sédimentation firent que le « bio-filtre » tendait à s'étouffer lui-même et ne plus assurer la fonction pour laquelle il avait initialement été aménagé.

C'est donc encore par un processus d'essai-erreur-correction que l'entreprise, avec le conseil des meilleurs spécialistes du sujet, a abouti à la conception, aux essais et la réalisation d'un « bio-filtre » végétal **planté et totalement aménagé** (notamment du point de vue hydraulique). Les premiers essais ont été effectués en 1996 sur 7 hectares à raison d'1 palétuvier par mètre carré. En 1998, les essais ont été réalisés à 4 plantules par mètre carré. À partir de l'an 2000, le processus est arrivé à une étape d'optimisation avec la création d'une nurserie de plantules préalable à la plantation dans les zones de bio-filtre.

En 2003, le système comprend 43 ha de mangrove « adulte », 17 ha en plantation et croissance, 10 ha de réserve aviaire, 36 ha de végétation de faible hauteur (dominée par la fougère *Acrostichum aureum*) et 11 ha sans végétation. Six ouvrages d'entrée d'effluents en provenance du canal de drainage et 7 ouvrages de sortie du bio-filtre ont été construits pour assurer une gestion et un contrôle complet de l'hydraulique du système en fonction, d'une part, de l'évolution des paramètres de qualité physico-chimique et biologique de l'eau et, d'autre part, des besoins en eau de pompage de la ferme, en particulier dans les périodes nécessaires d'isolement du milieu naturel envahi par les cyanobactéries indésirables.

Toute décision de modification du flux d'eau à chacun de ces 13 ouvrages est prise après lecture de ces paramètres journaliers: température, oxygène dissous, teneurs en azote et en phosphore et bien sûr comptage d'algues unicellulaires et cyanobactéries, l'objectif primordial restant d'éviter toute prolifération des espèces provoquant une dégradation de la qualité de la crevette. En moyenne, le temps de résidence de l'eau dans le système est désormais de 3 jours.

## Résultats

Le tableau résume les moyennes des principaux résultats.

	Milieu naturel	Sortie ferme	Sortie bio-filtre
Cyanobactéries (cellules/ml)		320 000	35 000
DBO <sub>5</sub> (kg/j)	5 071	6 027	3 838
MSS (kg/j)	52 731	63 816	40 682



Les comptages de cyanobactéries en période de prolifération (principalement les genres *Chroococcus* spp., *Trichodesmium* spp. et *Anabaena* spp.), montrent que leur densité passe en moyenne de 320 000 cellules/ml à l'entrée du bio-filtre à une moyenne de 35 000 cellules/ml, soit une réduction d'un facteur 9. Tous les tests organoleptiques sur les crevettes élevées à partir d'eau pompée en sortie du bio-filtre ont par ailleurs conclu en l'absence totale de saveur ou d'odeur désagréable dans 100 % des échantillons.

Concernant l'impact sur l'environnement, l'amélioration de la qualité de l'eau est notable, puisque celle-ci se révèle meilleure que l'eau pompée dans le milieu naturel avant toute activité aquacole. En effet, la DBO<sub>5</sub> passe de 5 071 à 6 027 kg/j (+19 %) avant épuration pour redescendre à 3 838 kg/j (-36 % ou -24 % par rapport au milieu d'origine) à la sortie du bio-filtre.

En termes de matières solides en suspension (MSS) contribuant à la sédimentation, les effluents avant épuration voient un accroissement moyen de leur MSS de 21 % (passant de 52 731 à 63 816 kg/j) tandis qu'à la sortie du bio-filtre, les MSS n'atteignent plus que 40 682 kg/j, soit une réduction de 36 % (et une amélioration par rapport au milieu d'origine de 23 %).

Associée à ces aménagements, une faune locale s'est également considérablement développée : pas moins de 35 espèces d'oiseaux ont été répertoriées dans les zones plantées du bio-filtre. En outre, l'une des espèces de crocodiles américains en voie de disparition (*Crocodylus acutus*) a colonisé cette zone où les propriétaires prohibent strictement toute forme de chasse.

## Discussion

Les résultats montrent donc que, non seulement les objectifs fixés au programme par les propriétaires de la ferme ont été parfaitement atteints (approvisionnement en eau de qualité pour le grossissement des crevettes tout au long de l'année et traitement économiquement raisonnable des rejets), mais que deux autres avantages se sont présentés à l'usage.

D'une part, une faune aviaire importante a colonisé la nouvelle mangrove plantée par l'aquaculteur. La densité d'échassiers y nichant est devenue telle que la teneur en phosphates de l'eau sortant du bio-filtre s'est révélée notablement plus élevée et ce, à un niveau suffisant pour éviter toute fertilisation phosphorée sur la ferme. Cela a représenté une économie non négligeable pour l'entreprise tout en favorisant un accroissement naturel de la productivité de la ferme.

D'autre part, l'aménagement hydraulique et la plantation des zones de bio-filtre ont représenté une source d'emplois importante pour la région. Ce travail initial est désormais poursuivi par l'entretien indispensable des outils hydrauliques (13 ouvrages, chenaux, ponts, etc.), mais aussi par la coupe sélective de la forêt plantée de palétuviers pour éviter tout engorgement facilitant la sédimentation excessive et le comblement des voies d'écoulement de l'eau. Cet entretien du bio-filtre paraît indispensable pour sa pérennité et le succès du système à moyen et long termes.

## Les bases de données en aquaculture : exemples, intérêts et contraintes, système proposé pour la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

A.G. Martin, J.C. Masson, B. Soulard

Ifremer, BP 86, 56470 La Trinité-sur-Mer, France  
Anne.Genevieve.Martin@ifremer.fr

### Résumé

Le nombre de bases de données relatives à l'aquaculture s'accroît avec l'amélioration des moyens techniques et la nécessité de partage. Les plus accessibles sont des bases bibliographiques qui permettent de s'informer des avancées dans ce domaine. D'autres plus spécifiques donnent accès à divers types d'informations comme les statistiques de la production et de la consommation, la réglementation et la législation. Certaines abordent des sujets d'ordre biologique, comme la pathologie et les recommandations associées, ou d'ordre environnemental. Dans ces domaines, la volonté de partage des informations recueillies par les réseaux de surveillance est grandissante et dépasse le niveau national. Cela nécessite, pour être pleinement efficace, une standardisation des formats et des procédures facilitant l'interconnexion des réseaux et le partage des données.

Dans le domaine de la gestion des élevages et de la recherche associée, les données générées sont nombreuses. Cependant, le traitement de cette information se fait de façon plus confidentielle et disparate du fait, notamment, de la nature commerciale d'une partie des données collectées. Le développement de nouveaux systèmes de mesure comme l'enregistrement de données environnementales à haute fréquence, voire en continu, multiplie encore l'information disponible et rend indispensable sa structuration pour une exploitation rationnelle. Le but de l'archivage organisé ne se limite pas à la gestion journalière des opérations. Il est également de conserver la mémoire des succès comme des échecs pour en tirer les leçons et permettre ainsi l'amélioration de la production. Il facilite également la réactivité face à des perturbations imprévues.

L'exposé aborde les différents domaines cités. Quelques exemples d'applications déjà existantes sont décrits. L'accent est mis sur l'intérêt de la mise en commun de l'information en tenant compte de la notion de confidentialité liée à l'activité commerciale ou à l'activité de recherche non encore finalisée. Des modèles de solutions techniques sont comparés. Des exemples d'utilisation et de valorisation sont également présentés. Enfin, une solution est proposée pour les données de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie.

### Abstract

The number of databases relating to aquaculture increases with the improvement of the technical means and the necessity of sharing. The most accessible are documentary databases which allow to inquire headways in this field. Other more specific databases give access to different types of information as the statistics of the production and the consumption, the rule and the legislation. Some of them approach subjects of biological nature, as the pathology and the associated recommendations,

or environmental nature. In these fields, the will of sharing of the information collected by the networks of supervision is growing and goes beyond the national level. It requires, to be completely effective, a standardization of the formats and the procedures, facilitating the interconnection of networks and data-sharing.

In the field of breeding control and the associated research, the generated data are numerous. However the management of this information is made in a more confidential and ill-assorted way, notably because of the commercial nature of a part of the collected data. The development of new measurement systems as the environmental high-frequency recording, or even continuously recording, still increases the available information and makes essential its structuring for a rational exploitation. The structured storage is intended to ensure the daily management of the operations as well as to preserve the memory of successes and failures alike, to learn from them and allow, in that way, the improvement of the yield. It also facilitates the ability to react in front of unexpected disturbances. The presentation approaches the various quoted fields. Some examples of already existing applications are described. The accent is put on the interest in pooling the information by taking into account the notion of confidentiality, connected to the commercial activity or to the research on hand. Models of technical solutions are compared. Examples of use and valorization are also presented. At last, a scheme of solution is suggested for data generated by shrimp breeding in New Caledonia.

## **Introduction**

---

Les bases de données relatives à l'aquaculture recouvrent différents domaines, sur le plan de l'information générale comme sur celui de l'archivage structuré des données de recherche ou de gestion des élevages. Leur nombre s'accroît avec le besoin plus important de partage des informations, selon le niveau de confidentialité souhaité, et grâce à l'amélioration des moyens techniques.

Ce document donne tout d'abord un aperçu général, non exhaustif, des différents types de bases de données concernant l'aquaculture. Il décrit plus particulièrement celles concernant la gestion des élevages et la recherche associée, avec plusieurs exemples de systèmes utilisés à l'Ifremer.

Puis il aborde la question du partage en précisant les contraintes, la sécurité et la confidentialité et donne quelques exemples d'architectures techniques.

Finalement, la troisième partie concerne les données des élevages de crevettes en Nouvelle-Calédonie. Un schéma de solution de partage des données utiles aux différents partenaires est proposé sous la forme d'un système associant la gestion et la restitution des données partageables.

## **Différentes sortes de bases de données**

---

### **Bases bibliographiques et informatives**

Les termes « bases de données » et « aquaculture », utilisés comme clés de recherche sur le réseau Internet, vous donneront accès le plus souvent à des bases de données bibliographiques ou à des bases concernant des statistiques de production et de consommation, ou encore à des bases vous informant sur la réglementation et la législation.

Dans ces domaines, une des adresses les plus intéressantes est celle du glossaire de la FAO qui ouvre la porte à beaucoup de références, par l'intermédiaire de plus

de 50 bases de données thématiques. Bien qu'une bonne partie concerne l'agriculture, l'aquaculture y est toutefois bien représentée :

<http://www.fao.org/waicent/search/default.asp>

Le comité des pêches et son sous-comité de l'aquaculture travaillent d'ailleurs à améliorer la communication de données sur la situation et les tendances du développement aquacole. Une première session de travail a eu lieu à Pékin en avril 2002. L'adresse de l'organisation Aquaflow, gérée par l'« European Aquaculture Society » (EAS) et la « Federation of European Aquaculture Producers » (FEAP) concerne un réseau orienté sur la recherche et la technologie pour l'aquaculture, qui permet la mise en relation des différentes équipes qui se penchent sur le sujet : <http://www.aquaflow.org/>

### **Bases environnementales**

Les données les mieux partagées sont celles de l'environnement en raison du souci croissant des gouvernements de protéger les activités et les personnes.

- Ainsi, au Canada, le service des données sur le milieu marin (SDMM) a pour mandat de gérer, de diffuser et de conserver en archives, les données des zones océaniques situées à proximité de ce pays. Ces données sont recueillies par le ministère fédéral canadien des pêches et océans (MPO) ou obtenues dans le cadre de programmes de recherche nationaux et internationaux :

[http://www.meds-sdmm.dfo-mpo.gc.ca/meds/Home\\_f.htm](http://www.meds-sdmm.dfo-mpo.gc.ca/meds/Home_f.htm)

- En France, le réseau national des données sur l'eau (RNDE) fédère les principaux producteurs et utilisateurs de données sur le sujet. Animé par l'OIEau, il s'appuie sur un langage commun décrit sur le site Sandre du secrétariat d'administration nationale des données relatives à l'eau : <http://www.rnde.tm.fr>

L'un des premiers systèmes de gestion en réseau utilisés à l'Ifremer est la base Quadrige. Son objectif est de gérer et de valoriser les données issues de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral :

- elle a été mise en service en 1996 et réunit actuellement environ 150 utilisateurs appartenant à l'Ifremer, aux agences de l'Eau (régions) et aux cellules de Qualité des eaux littorales (départements). Elle contient actuellement de l'ordre de 2 millions de lignes de résultats d'analyse :

<http://www.ifremer.fr/delaol/francais/valorisation/quadrige/index.htm>

- le système utilisé s'appuie sur une architecture de type client-serveur avec Sybase comme système de gestion de bases de données. L'application est développée à l'aide du logiciel Powerbuilder (éditeur Sybase) ;

- la valorisation des résultats des réseaux de surveillance Ifremer est faite sous différentes formes : bulletins, rapports de synthèse. Les résultats validés et mis sous forme graphique sont accessibles en ligne, à l'aide d'une interface Web (accès Internet tous publics). Cette interface est liée à une base de données agrégées, Surval, alimentée en temps différé à partir des données brutes saisies dans Quadrige.

### **Bases de biologie-pathologie-génétique**

Un site Internet donne accès à deux bases de données très complètes sur les différentes espèces de poissons et sur leurs larves. On y trouve des informations sur la dynamique des populations, la génétique, la physiologie, le milieu trophique et l'écotoxicologie : <http://www.fishbase.org/> et <http://www.larvalbase.org/>

Vetofish est un portail d'information vétérinaire sur les maladies des poissons



d'aquarium et d'aquaculture: <http://www.vetofish.com/modules/newbb/>

Le site de bio-informatique de l'Inra ouvre la porte à de nombreux autres sites sur le sujet et les bases associées: <http://www.inra.fr/bioinfo/>

Dans le cadre de l'Ifremer, on peut faire référence à la base Répamo dont le but est de partager les données du réseau de pathologie des mollusques entre les différents participants:

- le système de gestion Répamo a dû évoluer au cours du temps en fonction de la restructuration du réseau accompagnée de l'augmentation du nombre de sites et d'utilisateurs impliqués;
- la dernière version de l'application développée en 2002 sous Powerbuilder est de type client-serveur. Les données sont stockées dans une base de données Oracle et extractibles sur le site Intranet associé;
- la valorisation des données Répamo se fait actuellement sur un site Intranet protégé donnant des informations d'ordre général pour l'ensemble de l'Ifremer. Pour les extractions de données, des droits d'accès de plusieurs niveaux sont attribués en fonction des types d'utilisateurs;
- il existe également un site Internet d'information sur l'activité du réseau et du laboratoire de recherche en pathologie.

#### **Bases de données d'élevage et de recherche associée**

On peut citer quelques exemples de bases de données d'élevage et de recherche associée, accessibles sur Internet.

- L'université de l'Orégon présente un logiciel de support à la décision en aquaculture dans les étangs tropicaux, POND, développé par leur équipe dans le cadre du Pond Dynamics/Aquaculture-Collaborative Research Support Programme. Conçu à l'origine pour l'élevage de tilapia, il peut être étendu à d'autres espèces, notamment la crevette. Il permet de faire un modèle de simulation à partir des informations sur l'élevage, ainsi qu'une analyse économique. Sur le même site, une base de données centralise des informations de diverses origines (y compris sur les crevettes): <http://biosys.bre.orst.edu/crspDB/default.htm>

- L'Institut national de recherche en informatique et en automatique (Inria) participe au projet StressGenes, pour lequel il réalise un système de gestion des données d'expérimentations ainsi qu'une base de données des résultats de séquençage d'ADN. Cette base est commune aux différents partenaires et est associée à un système d'extraction des données des autres banques de gènes.

- D'autres logiciels sont listés sur le site de l'université de Gand.

- Il existe aussi, au sein des laboratoires de recherche de l'Ifremer, des applications de gestion d'expérimentation limitées à l'équipe concernée, telles que Rémora (réseau mollusques des rendements aquacoles). Ce réseau, créé en 1993 pour suivre la croissance, la survie et la qualité de *Crassostrea gigas* dans les différents sites d'élevage français, nécessitait une gestion commune des données associées (fig. 1). Le schéma présenté résume l'évolution du système de gestion allant de plusieurs fichiers tableurs de type Excel vers une base commune en réseau valable pour l'ensemble des suivis de même nature.

Une solution plus globale est en réflexion au sein du système d'information aquacole (SIA) basée sur le projet MollusSCQ (survie, croissance, qualité des mollusques) en distinguant les 3 niveaux: saisie, archivage et traitement.

Les études de terrain associées au défi Morest font également partie de ces suivis.

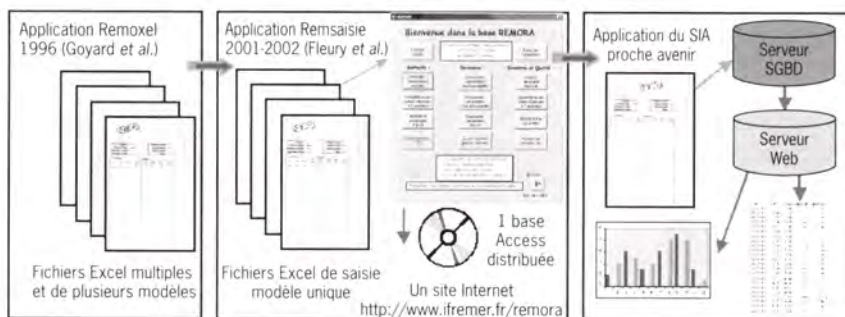


Figure 1 - Évolution du système de gestion des données Rémora.

### **Partage, sécurité et confidentialité**

Les exemples de partage de données décrits précédemment ont impliqué le respect d'un certain nombre de contraintes de standardisation. Les questions de sécurité et de confidentialité ont été prises en compte.

#### **Contraintes de partage : standardisation du langage, précision, qualité et respect des conventions**

Pour partager, il faut parler le même langage aussi bien thématique que technique.

- Sur le plan thématique :

- la standardisation du vocabulaire est un préalable indispensable au partage ; en cas de différence, des tables de correspondance doivent être établies ; il existe un glossaire international d'hydrologie à l'adresse :

*<http://www.cig.enscm.fr/~hubert/glu/HINDERT.HTM>*

- la standardisation des unités et de la codification est aussi nécessaire ; le service Sandre du RNDE, déjà mentionné, définit un langage commun des données sur l'eau au niveau national : *<http://www.rnde.tm.fr/francais/frame/sagen.htm>*

- Sur le plan informatique, une standardisation des supports facilitera l'échange des données entre partenaires d'organismes ou de services différents.

Il convient aussi d'être très précis sur les données que l'on peut fournir et de contrôler la qualité de ces données. Des outils de contrôles automatiques faciliteront la tâche des utilisateurs.

Le respect des conventions établies, concernant, entre autres, les délais de mise à disposition et l'utilisation des données des partenaires, fait également partie des contraintes de partage.

#### **Partage et sécurité**

Partage et sécurité sont conditionnés par l'environnement matériel et logiciel. On s'assurera de la protection du système contre les intrusions extérieures à l'aide d'un pare-feu (firewall) et d'un antivirus régulièrement mis à jour. Login et mot de passe seront attribués en fonction de droits d'utilisation clairement définis. Par ailleurs, les systèmes de gestion de bases de données utilisés prendront en compte :

- la gestion de l'intégrité des données (contrôle de la cohérence, de l'absence de doublons...);

- la gestion des concurrences d'accès: les accès multiples doivent être possibles mais l'enregistrement des modifications et des ajouts de données ne peuvent être concomitants (notion de verrous informatiques);
- la réalisation de sauvegardes régulières sur un support différent pour pallier une défaillance matérielle.

### Exemples d'architecture

Comme exemples d'architectures utilisées, nous pouvons citer les suivants :

- Les applications mono-utilisateur: c'est le cas de l'ordinateur de bureau, non connecté à un réseau, sur lequel est installée l'application de base de données:
  - le partage n'est possible que par l'intermédiaire d'un support amovible (CD-ROM, disquette, etc.).
- Les applications transactionnelles: la base de données et l'application associée sont sur un serveur central; celui-ci est relié à des terminaux sur lesquels les utilisateurs saisissent et envoient les informations page par page:
  - le partage n'est possible qu'en visualisation;
  - les pages (écrans) naviguent sur le réseau;
  - les contrôles sont tous réalisés sur le serveur;
  - il n'y a pas de sauvegarde en local;
  - l'interface homme-machine est pauvre (mode caractères);
  - il n'y a pas d'installation à effectuer sur le terminal mais la partie serveur ne peut être gérée que par des spécialistes;
  - c'est un système lourd et onéreux.
- Le modèle client-serveur (fig. 2): la base de données est centralisée sur le « serveur » et l'application associée est sur chacun des postes « clients »:
  - seules les données nécessaires naviguent sur le réseau;
  - le partage est total, mais les droits d'accès peuvent être modulés en fonction des utilisateurs;
  - les clients sont des micro-ordinateurs intelligents:
    - les contrôles peuvent être réalisés en local,
    - l'exportation de données peut se faire en local car le poste client possède un disque dur,
    - l'interface homme/machine est riche et conviviale (interface Windows).

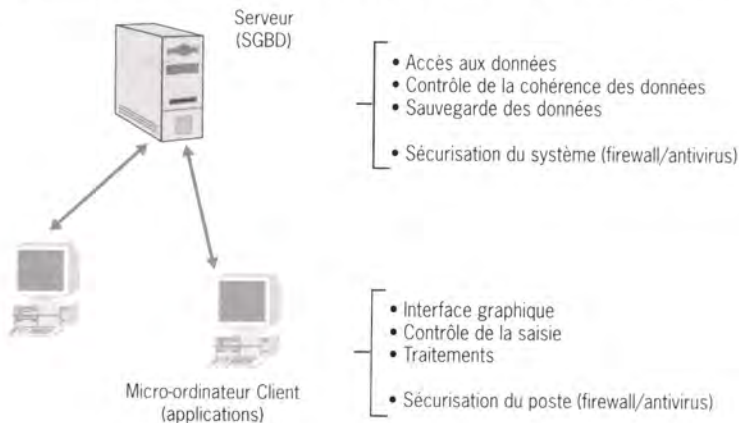


Figure 2 - Le modèle client-serveur.

Les contraintes de cette architecture sont :

- la nécessité d'une installation sur le poste client (bibliothèques réseau, fichiers « dll » applicatifs, etc.) et cela peut devenir un frein au partage ;
- la nécessité d'une certaine vitesse du réseau pour que la communication soit satisfaisante.

### **Partage et confidentialité**

Le partage concerne les données utiles à tous. Il est nécessaire de protéger les données pour éviter leur perte ou leur utilisation dans un but illégal.

Cette protection peut se faire à travers l'établissement d'une convention établie entre tous les partenaires où les droits de chacun sont clairement définis. Un accord doit être trouvé sur la structure, le contenu de la base commune et le droit d'utilisation des données.

*On peut prendre l'exemple de la base de données sur l'activité conchylicole du Languedoc-Roussillon : une convention a été établie après plusieurs réunions des partenaires et avec l'aide des services juridiques de l'Ifremer, de la DRAM et de la Région.*

*Cette convention détermine les engagements de chaque partenaire et crée un comité de pilotage chargé de prendre les mesures pour la bonne exécution du programme, des conditions techniques fixées, etc.*

Il existe plusieurs niveaux de protection des données :

- Le premier niveau intervient sur la définition initiale des données partageables. Cette définition doit se faire au moment de l'établissement de la convention. Sont concernées :

- les données à intégrer dans la base commune.
- les données à restituer : quelles sont les données à rendre extractibles et sous quelle forme doivent-elles apparaître (synthétique, graphique, commentée...).

- Le deuxième niveau concerne les utilisateurs. L'accès peut être personnalisé selon des droits bien définis, que ce soit pour l'accès à la base elle-même ou pour l'accès aux informations restituées.

En cas d'utilisation de données nominatives dans le système, il convient de déclarer à la commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) l'existence de données nominatives informatisées ainsi que l'usage que l'on veut en faire : <http://www.cnil.fr/>

### **Données de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie**

---

La crevetticulture en Nouvelle-Calédonie génère un nombre important de données produites par les différents acteurs de la filière. La mise en commun d'une partie de ces données fait l'objet de ce dernier chapitre.

#### **Origine des données (fig. 3)**

##### **Objectif de l'archivage**

Les objectifs de l'archivage des données relatives aux élevages de crevettes sont :

- La sauvegarde de l'information avant qu'elle ne soit perdue.
- La structuration de l'information pour une utilisation rationnelle.
- L'exploitation de l'information :
  - pour la gestion journalière des élevages,



- pour la comparaison des résultats dans le but d'améliorer la production,
- pour réagir aux imprévus.

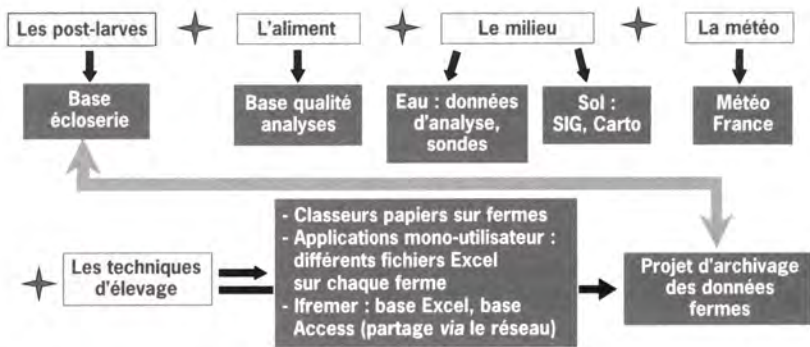


Figure 3 - Éléments entrant en jeu dans la description de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie.

- La constitution d'une mémoire commune :
  - pour la compréhension des phénomènes,
  - pour l'amélioration de la gestion globale et de la production qui en résulte,
  - pour reconnaître les points de blocage et dégager les axes de recherche (génétique, pathologie, zootechnie).

L'environnement et le matériel biologique d'élevage (ici la crevette) sont des éléments partagés. Le comportement de chacun a des répercussions sur l'ensemble. Cela implique une mise en commun des efforts pour une utilisation rationnelle et responsable.

Que ce soit sur le plan individuel ou collectif, les bases de données ont ainsi une part importante dans les systèmes d'aide à la décision.

### État des lieux

Actuellement, l'archivage de ces données est hétéroclite. Cela va du classeur papier aux logiciels commerciaux de formulation d'aliment et de gestion des stocks (fabricants) en passant par des fichiers Excel ou Access de formats divers.

Certains fichiers de suivi d'élevage sont très succincts et ne comportent qu'une ligne par élevage. D'autres contiennent l'ensemble des données journalières sous forme de tableaux assez lourds.

Certains fichiers sont récupérés à partir de sondes automatiques, d'autres proviennent de recueil de données météorologiques, d'autres enfin contiennent les données des écloseries.

Il est nécessaire de faire un inventaire précis de ce qui existe, avec, éventuellement, saisie des éléments de cet inventaire dans une base appropriée donnant les informations sur le matériel et les méthodes utilisées, ainsi que sur les protocoles : autrement dit, les métadonnées ou données descriptives des données mesurées.

### Solution proposée

Selon le schéma proposé (fig. 4), la saisie des données des professionnels se fait chez chacun d'eux sur un logiciel de leur choix : soit un logiciel du commerce, soit la base Diacre finalisée (base DIAGNOSTIC CREvette en cours de création). Pour une

catégorie d'utilisateurs, il serait préférable que le logiciel soit identique car, à partir des données initiales, doit être extrait le fichier des données destinées à être partagées. Le module d'extraction à prévoir serait alors unique.

L'alimentation de la base commune se fait à partir de l'envoi de fichiers validés à l'administrateur de données thématiques. Un administrateur gère les données de référence (ou liste de codes standardisés). Ce peut être, éventuellement, la même personne.

L'administrateur des données thématiques contrôle les données reçues et les intègre dans la base de données brutes située sur un serveur central.

Un module de transformation des données permet d'alimenter une base de données agrégées située, éventuellement, sur un autre serveur.

Ces données agrégées sont accessibles par l'interface Web sous différentes formes, avec des droits d'accès adaptés en fonction du niveau de l'information.

À chaque niveau du système, la forme et le contenu doivent être définis avec précision. Cette définition incombe au comité de pilotage du projet et l'ensemble des choix devra être cadré par une convention signée par tous les partenaires.

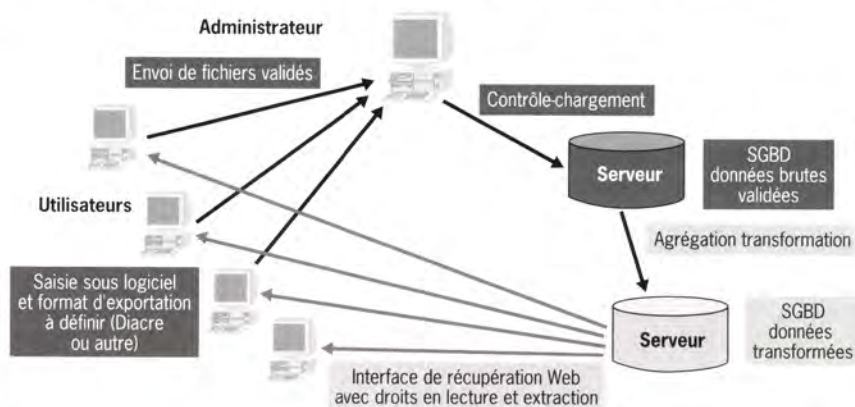


Figure 4 - Schéma de la solution proposée pour le système d'information de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie.

## Conclusion - Perspectives

L'information en aquaculture est multiple. Les progrès technologiques permettent de la partager en toute sécurité de plus en plus facilement. Sur le plan précis de la gestion des données, les intérêts du partage dépassent largement les contraintes. Les solutions existent et sont adaptables à chaque type de besoin, il suffit de bien définir ceux-ci. Cela nécessite une concertation entre les différents partenaires. Ce document est destiné à servir d'aide à la mise en place d'une coopération fructueuse qui pourrait se concrétiser dans un proche avenir, au bénéfice de toute la filière crevette.

## Remerciements

Nous tenons à remercier les responsables de réseaux, bases et autres sites qui nous ont procuré les informations pour cette présentation. Les adresses URL (Uniform Resource Locator) tiennent lieu de bibliographie.

## Synthèse provisoire sur l'approche pluridisciplinaire du syndrome d'été (programme Désans)<sup>(1)</sup>

C. Goarant, H. Lemonnier, C. Mugnier, A. Herbland

Ifremer, laboratoire aquacole de Calédonie (LAC), BP 2059, 98846 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie  
Alain.Herbland@ifremer.fr

### Résumé

Le syndrome d'été, pathologie à caractère saisonnier, se caractérise par des mortalités de juvéniles dues à *Vibrio nigripulchritudo* dans les bassins de grossissement. Dans le cadre du programme pluriannuel et pluridisciplinaire Désans, une opération de terrain consistant à suivre l'évolution de deux élevages de crevettes en saison chaude (de la mi-octobre 2002 à la mi-janvier 2003) pour décrire la dynamique d'apparition des mortalités et tenter d'en comprendre les causes a été entreprise.

Les élevages ont été choisis sur deux fermes en fonction de la forte probabilité d'apparition (ferme A) et de non-apparition (ferme B) de la maladie. Les conditions environnementales, les caractéristiques biologiques, physiologiques et immunitaires des crevettes, la présence et la virulence du pathogène *Vibrio nigripulchritudo* dans le milieu et dans les crevettes ont été suivies simultanément avec un pas de temps approprié.

Conformément aux prévisions, les mortalités sont apparues autour du 50<sup>e</sup> jour à la ferme A, avec une intensité plus ou moins importante jusqu'à la fin du suivi. En revanche, aucune mortalité liée au syndrome d'été n'a été observée à la ferme B.

Il est encore trop tôt pour dégager un scénario précis des causes d'apparition et de développement de la maladie, mais la combinaison des premiers résultats semble indiquer : (i) que le *Vibrio* est présent dans le sédiment de la ferme A dès le début de l'élevage (rémanence des élevages précédents malgré un assec prolongé ?); (ii) que les crevettes saines (non porteuses du *Vibrio*) de la ferme A sont fragilisées par un environnement plus riche et plus instable qui pourrait également favoriser le développement du *Vibrio*; (iii) que l'ensemble favorise l'infection de la crevette, particulièrement au stade de pré-mue. Ces premières conclusions doivent être validées par un examen plus approfondi des données.

### Abstract

The summer syndrome (SS) is a seasonal vibriosis caused by *Vibrio nigripulchritudo* in juvenile *Litopenaeus stylirostris* reared in growout ponds. As part of the multidisciplinary programme Désans, a field survey was designed to study at an adapted time scale the evolution of two shrimp rearing cycles during the warm season (mid-October 2002-mid-January 2003) in order to better describe the dynamics of the apparition of the SS shrimp mortalities and to permit a better understanding of the causes and triggering agents which lead to the mortalities. The approach was (i) comparative since two farms were selected, one (farm A) with a high probability

(1) Cette contribution est la synthèse des trois communications consacrées au syndrome d'été présentées par C. Goarant, H. Lemonnier et C. Mugnier aux 3 sessions thématiques du colloque.



of disease apparition and the other one (farm B) without previous known mortality linked to the SS, and (ii) multidisciplinary, since the environmental variables in the pond, the biological, physiological and immunological characteristics of the animals and the presence and virulence of the pathogen *Vibrio nigripulchritudo* in the environment and in the shrimp were measured simultaneously.

According to the expectations, mortalities occurred in farm A around d50, and lasted with various importance until the end of the survey. In contrast, no mortality was observed in farm B.

It is too early to elaborate an accurate scenario of the disease apparition and development. However, juxtaposition of the first results of this field survey suggests: (i) that the *Vibrio* could be present in the sediment of the farm A since the beginning of the rearing period (survival in spite of a long dry-out period?); (ii) that non-infected shrimp in farm A are weakened by a richer environment in organic matter and more unsteady, that could also favour the growth of the *Vibrio*; (iii) that taken together, these factors are prone to favour the infection of the shrimp, especially when in premolt. These preliminary conclusions need to be validated by a better study of the data.

## Introduction

L'aquaculture de la crevette *Litopenaeus stylirostris* a débuté en Nouvelle-Calédonie au début des années 1970. Elle a connu un développement spectaculaire jusqu'en 1993, année au cours de laquelle le « Syndrome 93 », une pathologie saisonnière d'hiver à caractère épizootique (attribuée à *Vibrio penaeicida*) a fait son apparition (Goarant *et al.*, cet ouvrage; Saulnier *et al.*, cet ouvrage). Les aquaculteurs ont pu contourner l'obstacle en pratiquant des élevages hors de cette période froide. Mais, en 1997, une nouvelle pathologie, liée à un autre vibrio (*Vibrio nigripulchritudo*) s'est développée sur une ferme, en saison chaude, entraînant des survies atypiques de 25 à 30 %. Si ce « syndrome d'été » s'étendait à d'autres fermes, c'est toute l'activité aquacole de Nouvelle-Calédonie qui serait compromise. C'est pourquoi, sans abandonner les recherches consacrées au Syndrome 93, qui reste le problème majeur de la profession (Fontfreyde *et al.*, cet ouvrage), il a paru urgent de mettre en place une campagne d'observation sur l'élevage de saison chaude pour tenter de comprendre ce qui déclenche et entretient cette nouvelle pathologie.

Des données acquises antérieurement sur ces deux syndromes, il apparaît qu'on ne peut expliquer les mortalités par un seul facteur (fig. 1). C'est pourquoi la pré-

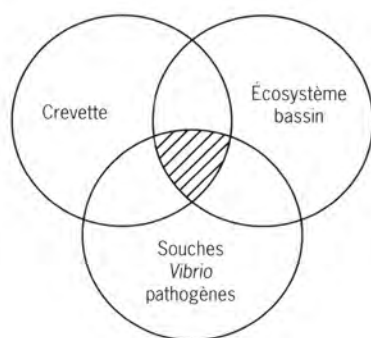


Figure 1  
Concept de la relation hôte-pathogène-environnement comme facteurs interactifs. Modifié d'après Snieszko (1973).



sente étude, qui se rattache au programme de recherche « Désans » (Défi Santé *Stylostris*), comporte plusieurs volets en étroite interaction les uns avec les autres : (i) l'étude de « l'écosystème bassin », (ii) la caractérisation de l'état physiologique de la crevette et de sa résistance aux pathogènes, (iii) les conditions de développement et de l'expression de la virulence des *Vibrio* pathogènes. Cette première opération du programme Désans avait pour objectifs de comprendre les causes du déclenchement des mortalités en saison chaude et d'élaborer un scénario de la dynamique du phénomène dans son ensemble.

### Matériel et méthodes

Dans cette synthèse, on se limitera à présenter la stratégie générale de la campagne d'observation. Pour les détails de chaque discipline, le lecteur est prié de se reporter aux communications spécialisées présentées dans les sessions concernées (voir cet ouvrage, Goarant *et al.* ; Lemonnier et le personnel du LAC ; Mugnier *et al.*).

Deux fermes ont été choisies : la première (ferme A) où le syndrome d'été est apparu régulièrement chaque année depuis 1997, la seconde (ferme B) où il ne s'était jamais manifesté, mais où des souches pathogènes de *Vibrio nigripulchritudo* avaient été mises en évidence (Goarant *et al.*, 2003). Deux bassins, un sur chaque ferme, ont été mis en eau le 1<sup>er</sup> octobre 2002 après un assec de 5 mois. Ils ont été ensemencés le 18 octobre avec des post-larves (PL) provenant de la même éclosure, à des densités voisines (29 PL.m<sup>-2</sup> à la ferme A et 35 PL.m<sup>-2</sup> à la ferme B). Chaque élevage a été conduit de manière indépendante par l'éleveur, selon ses pratiques habituelles de gestion. Les observations ont commencé à la mi-octobre 2002 et se sont terminées à la mi-janvier 2003, avec une fréquence hebdomadaire pour les 5 premières semaines, puis tous les deux jours à partir de la 6<sup>e</sup> semaine.

Pour les variables de l'environnement (voir les détails dans Lemonnier et le personnel du LAC, cet ouvrage), plusieurs points de prélèvements (entre 3 et 6 par bassin) ont été réalisés en surface et près du fond, le matin et le soir pour la colonne d'eau et une fois par semaine sur 6 points sur le premier centimètre pour le sédiment.

Les analyses sur les crevettes ont commencé quand les animaux ont atteint 1 g de poids moyen (32<sup>e</sup> jour). Le poids, le stade de mue et l'aspect général ont été relevés sur 100 individus. Parmi ces 100 individus, l'hémolymphes et l'hépatopancréas de 15 individus en inter-mue (stade C) et 15 en pré-mue (stade D2) ont été prélevés, ainsi que sur les moribondes le cas échéant.

La recherche du *Vibrio* a été faite par culture sur milieu sélectif (Marine Agar + 2 % de glycérol) : comptages différentiels, isolement et confirmation phénotypique, à partir des échantillons d'eau, de sédiment et de crevette. La virulence des souches a été déterminée comme décrit dans Goarant *et al.* (2003).

### Résultats

#### Évolution des mortalités

Conformément aux années précédentes, des mortalités sont apparues (autour de J50) à la ferme A, avec des pics de mortalité entre J57 et J63, puis entre J74 et J77. Le taux final de survie a été de 27 % à la ferme A. En revanche, aucune mortalité liée au *Vibrio* n'est apparue à la ferme B dont le taux final de survie a été de 62 %.

### Évolution des variables environnementales

La température des deux bassins a évolué de la même manière: une longue et régulière montée en température (correspondant à un ensoleillement maximal) entre le 30<sup>e</sup> et le 50<sup>e</sup> jour avec le déclenchement des mortalités à la ferme A quand elle atteint 30 °C. Ce premier épisode de mortalité coïncide avec une diminution de la température. Une seconde montée en température (jusqu'à 31 °C) se termine par le déclenchement d'un second épisode de mortalité. La salinité dans les bassins est plus élevée que celle des eaux de renouvellement avec des valeurs supérieures à 42‰ dans le bassin de la ferme A, ce qui reflète soit une évaporation plus importante, soit un taux de renouvellement plus faible à la ferme A qu'à la ferme B où la salinité ne dépasse pas 40‰. Parmi les autres variables environnementales physico-chimiques mesurées (Lemonnier et personnel du LAC, cet ouvrage), seuls l'ammoniaque et l'azote organique dissous (NOD) montrent des différences importantes entre les deux fermes: trois pics d'ammoniaque à la ferme A, inexistant à la ferme B, et une teneur moyenne en NOD comprise entre 30 et 40 µM à la ferme A alors qu'elle est comprise entre 10 et 30 µM à la ferme B. L'étude des sédiments montre des valeurs moyennes de pH *in situ* plus faibles sur la ferme A que sur la ferme B entre J0 et J50. Après J50, les concentrations en ammoniaque dans l'eau interstitielle sont en moyenne plus élevées sur la ferme A que sur la ferme B. La teneur en phosphore total était plus forte à la ferme B sur toute la période de l'étude.

L'évolution de la chlorophylle *a* (chl *a*) et de la matière organique particulaire montre de grandes différences entre les deux fermes: valeurs maximales plus fortes et valeurs minimales plus faibles à la ferme A qu'à la ferme B, les pics de mortalité se situant quelques jours après que les valeurs maximales de chl *a* (120 µg.l<sup>-1</sup>) aient été atteintes. Cette plus grande variabilité du bassin de la ferme A à l'échelle de quelques jours apparaît aussi à l'échelle journalière. Ainsi, la variabilité journalière est beaucoup plus importante pour l'oxygène et pour la chl *a* à la ferme A qu'à la ferme B. Enfin, l'hétérogénéité spatiale et la stratification verticale sont restées faibles, bien inférieures à la variabilité journalière dans les deux fermes.

### Évolution des indices biologiques, physiologiques et immunologiques des crevettes

Bien que le poids moyen des animaux ait été plus faible à la ferme A qu'à la ferme B jusqu'au 44<sup>e</sup> jour d'élevage, cette différence s'est effacée pour être ensuite favorable à la ferme A à partir du 60<sup>e</sup> jour (ce qui pourrait s'expliquer par une diminution des densités dues aux mortalités importantes à la ferme A). Le pourcentage d'estomacs vides le matin avant nourrissage était beaucoup plus élevé à la ferme B qu'à la ferme A, avant et pendant les épisodes de mortalité. Des différences ont été observées sur les indices physiologiques et immunologiques entre les crevettes saines (non porteuses du *Vibrio*) des deux fermes, d'une part, et entre les animaux porteurs sains de *V. nigripulchritudo* et les crevettes saines à la ferme A, d'autre part. La diminution des niveaux dans l'hémolymphe de quelques indicateurs comme le glucose, les protéines totales, l'hémocyanine et le THC (total hemocyte count) pendant la première phase de mortalité chez les crevettes non infectées de la ferme A, alors que celles de la ferme B ne montraient pas cette diminution, suggère que les animaux de la ferme A étaient affectés par des conditions environnementales défavorables. Les animaux en stade de pré-mue ont été majoritairement touchés par les

mortalités au départ, sans que cela revête un caractère systématique par la suite. Les crevettes porteuses de *V. nigriulcbritudine* ont montré des perturbations physiologiques et immunologiques, se traduisant en particulier par une glycémie et des concentrations en oxyhémocyanine et en protéines totales plus faibles que chez les crevettes saines. Les crevettes moribondes ramassées au bord du bassin ne présentaient plus de régulation physiologique, avec une capacité osmorégulatrice réduite et des concentrations en glucose et oxyhémocyanine se maintenant très faibles, alors que la concentration en protéines totales et le THC étaient très inférieurs aux valeurs observées chez les crevettes porteuses du *Vibrio* ou saines.

### Évolution du *Vibrio* dans le milieu et les crevettes

Le *Vibrio* a été détecté dans l'eau de la ferme A autour du 45<sup>e</sup> jour (~250 CFU ml<sup>-1</sup>) avec des valeurs élevées après 55 jours, qui coïncident avec le pic de mortalité. En revanche, il n'a jamais été détecté dans l'eau de la ferme B. Dans l'eau interstitielle du sédiment de la ferme A, le *Vibrio* a été détecté en faible quantité (entre 20 et 40 CFU ml<sup>-1</sup>) de façon précoce, dès le 11<sup>e</sup> jour. Des quantités élevées (>150 CFU ml<sup>-1</sup>) ont ensuite été mesurées à partir du 60<sup>e</sup> jour dans l'eau interstitielle de la ferme A. À l'opposé, il n'a jamais été trouvé à la ferme B.

La présence dans les animaux suit une évolution de même nature : prévalence qui reste inférieure à 15 % à la ferme B, alors qu'elle oscille entre 30 et 90 % à partir du 52<sup>e</sup> jour à la ferme A. Le caractère pathogène des souches isolées dans les différents milieux est beaucoup plus fréquent à la ferme A qu'à la ferme B (Goarant *et al.*, cet ouvrage).

### Récapitulatif : scénario hypothétique, discussion et perspectives

Quatre mois après la fin du suivi (qui a mobilisé la quasi-totalité du LAC), et bien que toutes les analyses ne soient pas encore terminées, il est possible d'élaborer un scénario hypothétique sur les mécanismes conduisant au déclenchement du syndrome d'été (fig. 2).

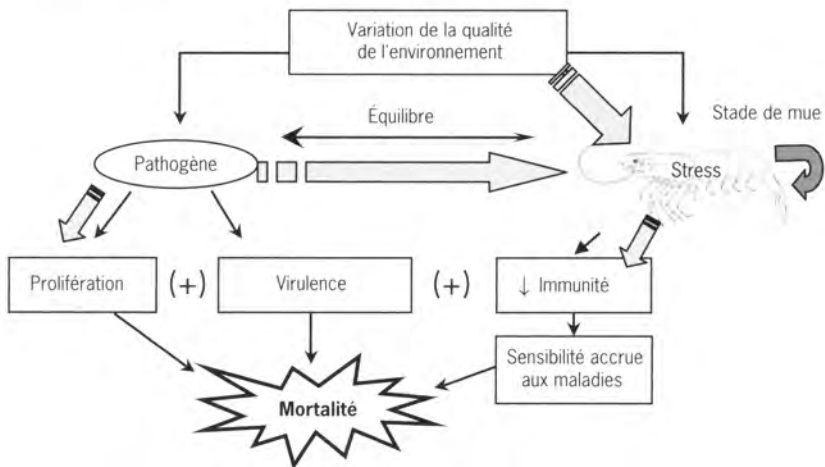


Figure 2 - Représentation schématique des interactions entre l'environnement, la crevette et le pathogène suggérée par les résultats de l'étude de terrain.

À la ferme A, le *Vibrio* est détecté très précocement dans le sédiment puisqu'on le trouve dans l'eau interstitielle dès le 11<sup>e</sup> jour. Il pourrait être présent dès le début de l'élevage, survivant dans les zones les plus humides malgré un assec de 5 mois ou être réintroduit précocement par l'eau de pompage. La ferme A présente également une richesse plus élevée en matière organique dissoute dans les premières semaines, des pics d'ammoniaque à répétition, des blooms de phytoplancton plus importants suivis d'une chute plus forte, entraînant des variations plus importantes des teneurs en oxygène en comparaison de la ferme B. Les crevettes semblent fragilisées par ces perturbations du milieu d'élevage, comme le montre l'évolution de certains indices physiologiques chez les animaux sains non porteurs du *Vibrio*. La forte production de matière organique dans la ferme A et la montée en température sont, de plus, des facteurs favorisant le développement des *Vibrio* (Colwell & Huq, 1999; Heidelberg *et al.*, 2002; Kaneko & Colwell, 1978; Øvreås *et al.*, 2003).

Ainsi, la conjonction de ces facteurs (richesse en matière organique, montée de température, grande variabilité des conditions environnementales) conduirait à la fois à un affaiblissement des crevettes et à une croissance accrue du *Vibrio*. Il a été observé chez une autre espèce de crevette, comme chez *L. stylirostris*, que les individus en pré-mue sont plus sensibles à une perturbation de l'environnement (stress) que ceux en inter-mue (Wajsbrodt *et al.*, 1990; Mugnier & Soyez, 2001). La pénétration du pathogène dans l'hôte (infection *sensu stricto*) serait favorisée, en particulier chez les crevettes en pré-mue, lorsque les perturbations physiologiques sont les plus importantes, conduisant à une augmentation de la prévalence. De plus, le stade de pré-mue est particulièrement favorable à l'expression d'une infection par *Vibrio* (Le Moullac *et al.*, 1997).

Ainsi, l'affaiblissement des crevettes par des conditions environnementales stressantes favoriserait l'expression septicémique du *Vibrio* chez les crevettes porteuses, conduisant à la mortalité et/ou la pénétration puis l'expression chez les crevettes saines. L'équilibre entre la crevette et le pathogène apparaît ainsi rompu par les conditions particulières du milieu d'élevage agissant en conjonction sur l'hôte et sur le pathogène.

Ce scénario demande à être confirmé par une analyse plus poussée des données, par des études complémentaires en conditions expérimentales et par une analyse des données historiques. Pour les données relatives à l'environnement, il conviendra de comprendre l'enchaînement des processus qui a conduit à une sorte « d'emballage du système » à la ferme A. Les conditions climatiques et les densités d'ensemencement étant approximativement les mêmes, il est probable que c'est dans la conduite de l'élevage (fréquence et quantité d'alimentation, renouvellement d'eau) et/ou dans la qualité des sols qu'il faudra en rechercher les causes. Mais l'hypothèse de la survie du *Vibrio* d'une année sur l'autre dans les sols des bassins de la ferme A est également un élément qu'il conviendra d'étudier lors des prochains élevages. La relation entre l'état physiologique et immunologique des crevettes et la présence du *Vibrio* dans l'hémolymphe demande également des expérimentations complémentaires de manière à faire la part de l'un et de l'autre sur la réponse de l'animal.



## Références bibliographiques

- Adams S.M., 1990. Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society, 191 p.
- Aguirre-Guzman G., Labreuche Y., Ansquer D., Espiau B., Levy P., Ascencio F., Saulnier D., 2003. Proteinaceous exotoxins of shrimp-pathogenic isolates of *Vibrio penaeicida* and *Vibrio nigripulchritudo*. Cienc. Mar., 29(1), 77-88.
- Alava V.R., Kanazawa A., Teshima S., Koshio S., 1993. Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of Kuruma prawn. Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 345-351.
- Alday-Sanz V., Roque A., Turnbull J., 2002. Clearance mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype 1 in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org., 48, 91-99.
- Allam B., Paillard C., Auffret M., 2000a. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* challenged with its pathogen, *Vibrio tapetis*. J. Invertebr. Pathol., 76, 63-69.
- Allam B., Paillard C., Howard A., Le Pennec M., 2000b. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Dis. Aquat. Org., 41, 105-113.
- Allan G.L., Maguire G.B., 1993. The effect of water exchange on production of *Metapenaeus macleayi* and water quality in experimental ponds. J. World Aquac. Soc., 24, 321-328.
- Allan G.L., Moriarty D.J.W., Maguire G.B., 1995. Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Penaeus monodon* Fabricius, water quality, bacteria and benthos in model farming ponds. Aquaculture, 130, 329-349.
- Alongi D.M., 1987a. The influence of mangrove-derived tannins on intertidal meiobenthos in tropical estuaries. Oecologia, 71, 537-540.
- Alongi D.M., 1987b. Intertidal zonation and seasonality of meiobenthos in tropical mangrove estuaries. Mar. Biol., 95, 447-458.
- Alongi D.M., 1988. Microbial-meiofaunal interrelationships in some tropical mangrove sediments. J. Mar. Res., 46, 349-365.
- Alongi D.M., 1989. The role of soft bottom benthic communities in tropical mangrove and coral reef ecosystems. Crit. Rev. Aquat. Sci., 1(2), 243-280.
- Alongi D.M., 1996. The dynamics of benthic nutrient pools and fluxes in tropical mangrove forests. J. Mar. Res., 54, 123-148.
- Alonso-Rodríguez R., Paez-Osuna F., 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. Aquaculture, 219, 317-336.
- Alsina M., Blanch A.R., 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol., 77, 719-721.
- Amanieu M., Legendre P., Troussellier M., Frisoni G.F., 1989. Le programme Ecothau : théorie écologique et base de la modélisation. Oceanol. Acta, 12, 189-199.
- Anderson R.K., Lawrence A.L., Parker P.L., 1987. A <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C tracer study of the utilization of present feed by a commercially important shrimp, *Penaeus vannamei*, in a pond grow-out system. J. World Aquac. Soc., 18, 148-155.
- Anderson I.G., Owens L., 2001. The diagnosis and prevention of mid-crop mortality syndrome of pond-reared black tiger prawns (*Penaeus monodon*). Final report, FRDC Project 96/301.
- Anderson K.V., 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. Curr. Opin. Immunol., 12, 13-19.
- Angersbach D., 1978. Oxygen transport in the blood of the tarantula *Eurypelma californicum*: PO<sub>2</sub> and pH during rest, activity and recovery. J. Comp. Physiol., 123B, 113-125.
- Anggraeli M., Owens L., 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org., 40, 85-92.
- Ansari Z.A., Parulekar A.H., 1993. Distribution, abundance and ecology of the meiofauna in a tropical estuary along the west coast of India. Hydrobiologia, 262, 115-116.
- Ansari Z.A., 1978. Meiofauna from the Karwar region (central west coast of India). Mah. Bull. Natl. Inst. Oceanogr., 11, 163.
- Aono H., Mori K., 1996. Interaction between hemocytes and plasma is necessary for hemolymph coagulation in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol., 113A, 301-305.
- Aquacop, 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proceedings of the 10th Annual Meeting of World Mariculture Society, 10, 445-452.
- Aquacop, 1984. Review of ten years of experimental Penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). J. World Maricult. Soc., 15, 73-91.
- AQUIS (Australian Quarantine and Inspection Service), 2000. Animal quarantine policy memorandum 2000/41 - Import risk analysis: prawns and prawn products (draft IRA paper). Canberra.
- Arbiv R., van Rijn J., 1995. Performance of a treatment system for inorganic nitrogen removal in intensive aquaculture systems. Aquac. Eng., 14, 189-205.
- Arena L., Cuzon G., Goyard E., Gaxiola G., Rosas C., Aquacop, Van Wormhoudt A., 2002. Effects of domestication of *Litopenaeus vannamei* (wild and farmed populations) on the level of polymorphism of amylase gene and on growth performances under different diets. Poster présenté au Colloque WAS, Pekin, Chine, 23-27 avril 2002.
- Arends M.J., Morris R.G., Wylie A.H., 1990. Apoptosis, the role of the endonucleases. Am. J. Pathol., 136, 593-608.
- Argue B.J., Arce S.M., Lotz J.M., Moss S.M., 2000. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura syndrome virus. In: Book of abstracts. International symposium for genetic in aquaculture, Townsville, Australia, 15-22 July 2000, p. 6.
- Arrêté n° 2000-2463/GNC du gouvernement de la Nouvelle-Calédonie définissant la liste des pays autorisés à exporter en Nouvelle-Calédonie des produits de la mer et d'eau douce et leurs sous-produits ainsi que la nature des produits autorisés.
- Aryuthaka C., 1994. Preliminary report on the meiofauna community in shrimp culture ponds in the Khung Kraben Bay area, Chanthaburi, Eastern Thailand. In: Snidvongs A., Utoomprukporn M. & Hungspreugs M. (eds). Proceedings of the NRCT-JSPS Joint Seminar on marine Science, Dec. 1993, Songkhla, Thailand, Bangkok, Department of Marine Science, Chulalongkorn University, 41-52.

- Atkinson J.L., Hilton J.W., Slinger S.J., 1984. Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1384-1386.
- Avnimelech Y., Ritvo G., Meijer L.E., Kochba M., 2001. Water content, organic carbon and dry bulk density in flooded sediments. *Aquac. Eng.*, 25, 25-33.
- Avnimelech Y., 1998. Minimal discharge from intensive fish ponds. *World Aquac.*, March, 32-37.
- Ayud M., Boyd C.E., 1994. Comparison of different methods for measuring organic carbon concentrations in pond bottom soils. *J. World Aquac. Soc.*, 25(2), 322-325.
- Ayud M., Boyd C.E., Teichert-Coddington D.R., 1993. Effects of urea application, aeration, and drying on total carbon concentrations in pond bottom soils. *Progr. Fish Cult.*, 55, 210-213.
- Bachère É., Mialhe E., Rodriguez J., 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 597-612.
- Bachère É., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3-11.
- Bachère É., 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 227, 427-438.
- Bachère É., Guéguen Y., Gonzales M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B., (soumis). Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.*
- Bador R., 1997. El desarrollo de proyectos industriales de cultivo de camarón: dos casos ejemplares de respeto y protección del manglar: la costa caribe de Colombia y Madagascar. *Proceedings of the 4th Ecuadorian Aquaculture Congress*, Guayaquil, Oct. 22-27.
- Banchero N., Grover R.E., 1972. Effect of different levels of simulated altitude on O<sub>2</sub> transport in llama and sheep. *Am. J. Physiol.*, 222, 1239-1245.
- Bassler B.L., 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.*, 109, 421-424.
- Beaumont A.R., Fairbrother J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.*, 10(1), 1-18.
- Beck G., 1998. Macrokinines: invertebrate cytokine-like molecules? *Frontiers in Bioscience*, 3, 559-569.
- Beck G., Habicht G.S., 1996. Cytokines in Invertebrates. *In: New directions in Invertebrate immunology*. Söderhäll K., Iwanaga S. & Vasta G. (eds), SOS Publications, 131-154.
- Beck G., Ellis T.W., Truong N., 2000. Characterization of an IL-1 receptor from *Asterias forbesi* coelomocytes. *Cell. Immunol.*, 203, 66-73.
- Bédier E., Patrois J., Aquacop, 1996. Genetic enhancement of the *Penaeus stylirostris* Aquacop SPR43 strain. Divergent selection for growth: preliminary results. *In: Books of Abstracts. SICCPSS, SEAFDEC/AQD*, Iloilo, Philippines, May 1996, p. 60.
- Bell S.S., Coull B.C., 1978. Field evidence that shrimp predation regulates meiofauna. *Oecologia (Berl.)*, 35, 141-148.
- Berthe F., Le Groumellec M., Haffner P., Renault T., 1995. Histological abnormalities related to mortality in penaeid shrimp (*Penaeus stylirostris*) reared in New Caledonia. *EAFP Sixth International Conference of the EAFP*, Palma de Majorca, Spain (abstract).
- Beschin A., Bilej M., Brys L., Torrele E., Lucas R., Magez S., De Baetselier P., 1999. Convergent evolution of cytokines. *Nature*, 400, 627-628.
- Beschin A., Bilej M., Rorrecele E., De Baetselier P., 2001. On the existence of cytokines in invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 801-814.
- Beveridge M.C.M., Phillips M.J., MacIntosh D.J., 1997. Aquaculture and the environment: the supply of and demand for environmental goods and services by Asian aquaculture and the implications for sustainability. *Aquac. Res.*, 28, 797-807.
- Bierne N., Beuzart I., Vonau V., Bonhomme F., Bédier E., Aquacop, 2000a. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 184, 203-219.
- Bierne N., Lehnert S.A., Bédier E., Bonhomme F., Moore S.S., 2000b. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Mol. Ecol.*, 9(2), 233-235.
- Bijlsma R., Loeschcke V., 1997. Environmental stress, adaptation and evolution. *Birkhauser Verlag*, 325 p.
- Blanchot J., Guillou L., Partensky F., Simon N., Vaulot D., 1998. Le petit peuple du grand large. *Biofutur*, 179, 22-24.
- Blanchot J., Rodier M., 1996. Picophytoplankton abundance and biomass in the western tropical Pacific Ocean during the 1992 El Niño year: results from flow cytometry. *Deep Sea Res.*, 6, 877-895.
- Boemare N., Cousserans F., Bonami J.R., 1978. Épizootie à Vibrionaceae dans les élevages de crevettes Penaeidae. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 10, 227-238.
- Boeuf G., 2002. L'aquaculture dans le monde. Quel avenir? Perspectives. *Conférences et débats de l'université de Perpignan*. Université de Perpignan-CNRS, 2, 91-104.
- Boglio E.C., Goarant C., 1996. Hemolymph magnesium as a measure of acute physiological stress in wild broodstock *Penaeus monodon* and cultured broodstock *P. stylirostris*. *Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps*, p. 101, Seafdec.
- Boglio E.C., 1995. Measurement of stress in broodstock leader prawn (*Penaeus monodon*) following capture by trawling and transport to hatcheries. *PhD Thesis*, University of Queensland, 156 p.
- Bongers R., Alkemade R., Yeates G.W., 1991. Interpretation of disturbance-induced maturity decrease in marine nematode assemblages by means of the maturity index. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 76, 135-142.
- Borrego J.J., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia M.T., Ventosa A., 1996a. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 480-484.
- Borrego J.J., Luque A., Castro D., Santamaria J.A., Martinez-Manzanares E., 1996b. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.*, 9, 125-136.
- Boudry P., Collet B., Cornette E., Hervouet V., Bonhomme F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204, 283-296.

- Boudry P., Collet B., Heurtebise S., Morand B., Gérard A., 2003. Individual growth performance of juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): stability over time and interaction with survival. *Aquaculture International*, 11, 429-448.
- Bougrier S., Hawkins A.J.S., Héral M., 1997. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture*, 150, 123-134.
- Bougrier S., Ragueneas G., Bachère E., Tige G., Grizel H., 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France, résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata*-*C. gigas*. ICES, Copenhagen (Denmark). ICES/CM/F/38, 10 p.
- Bouverot P., 1985. Adaptation to altitude-hypoxia in vertebrates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Bouvier T., Troussellier M., Anzil A., Courties C., Servais P., 2001. Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. *Cytometry*, 44, 188-194.
- Boyd C.E., 1992. Shrimp pond bottom soil and sediment management. In: Proceedings of special session on shrimp farming, *Aquaculture* 92. J. Wyban (ed.). World Aquac. Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 166-181.
- Boyd C.E., 1995a. Bottom soils, sediment and pond aquaculture. Chapman and Hall, New York, USA, 348 p.
- Boyd C.E., 1995b. Chemistry and efficacy of amendments used to treat water and soil quality imbalances in shrimp ponds. In: Proceedings of the special session on shrimp farming. J. Wyban (ed.). World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA, 183-198.
- Boyd C.E., Clay J., 2002. Evaluation of Belize aquaculture Ltd: a superintensive shrimp aquaculture system. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO consortium programme on shrimp farming and the environment. Work in progress for public discussion. Published by the Consortium, 17 p.
- Boyd C.E., Munsiri P., Hajek B.F., 1994a. Composition of sediment from intensive shrimp ponds in Thailand. *World Aquac.*, 25(3), 53-55.
- Boyd C.E., Tanner M.E., Mądkour M., Massuda K., 1994b. Chemical characteristics of bottom soils from freshwater and brackishwater aquaculture ponds. *J. World Aquac. Soc.*, 25(4), 517-533.
- Boyd C.E., Teichert-Coddington D.R., 1994. Pond bottom soil respiration during fallow and culture periods in heavily-fertilized tropical fish ponds. *J. World Aquac. Soc.*, 25(3), 417-423.
- Boyd E.F., Brussow H., 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.*, 10, 521-529.
- Brailsford M.A., Jones D., 1999. Real-time environmental monitoring procedures. *Pharm. Manufact. Rev.*, 11, 16-17.
- Bray W.A., Lawrence A.L., 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. *J. World Aquac. Soc.*, 21, 41-52.
- Bray W.A., Lawrence A.L., Leung-Trujillo J.R., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observation on interaction on IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 122, 133-146.
- Briggs M.R.P., Funge-Smith S.J., 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. *Aquacult. Fish. Manage.*, 25, 789-811.
- Brock J.A., 1997. Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13(4), 415-418.
- Brock J.A., 2000. A report of the activities, observations, findings and recommendations for a site visit (April 17-21, 2000) to evaluate the mortality problem at [farm A], New Caledonia. Rapport de mission au groupement des fermes aquacoles, 22 p.
- Brouwer M., Brouwer T.H., Grater W., Enghild J.J., Thøgersen I.B., 1997. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochemistry*, 36(43), 13381-13388.
- Browdy C.L., Bratvold D., Stokes A.D., McIntosh R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: *The New Wave. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001*. Browdy C.L. & Jory D.E. (eds). World Aquac. Soc., Baton Rouge, LA, 20-34.
- Brown C., Losee E., 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 31, 41-47.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L., Hoffmann D., 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23, 329-344.
- Burford M.A., Costanzo S.D., Dennison W.C., Jackson C.J., Jones A.B., McKinnon A.D., Preston N.P., Trott L.A., 2003. A synthesis of dominant ecological processes in shrimp ponds and adjacent coastal environments in NE Australia. *Mar. Pollut. Bull.*, 46, 1456-1469.
- Burford M.A., Glibert P.M., 1999. Short-term nitrogen uptake and regeneration in early and late growth phase shrimp ponds. *Aquaculture Research*, 30, 215-227.
- Burford M.A., Jackson C.J., Preston N.P., 2001. Reducing N waste from shrimp farming: an integrated approach. In: *The New Wave. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture 2001*. Browdy C.L. & Jory D.E. (eds). World Aquac. Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 35-43.
- Burford M.A., Longmore A.R., 2001. High ammonium production from sediments in hypereutrophic shrimp ponds. *Mar. Ecol. Progress Ser.*, 224, 187-195.
- Burford M.A., Peterson E.L., Baiano J.C.F., Preston N.P., 1998. Bacteria in shrimp pond sediments: their role in mineralizing nutrients and some suggested sampling strategies. *Aquacult. Res.*, 29, 843-849.
- Burford M.A., 1997. Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. *Aquac. Res.*, 28, 351-360.
- Burg M.B., Kwon E.D., Klutz D., 1996. Osmotic regulation of gene expression. *FASEB J.*, 10, 1598-1606.
- Burggren W., Roberts J.L., 1991. Respiration and metabolism. In: *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Prosser L.C. (ed.). New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Wiley-Liss., 353-435.
- Butler P.J., Taylor E.W., McMahon B.R., 1978. Respiratory and circulatory changes in the lobster (*Homarus vulgaris*) during long-term exposure to moderate hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 73, 131-146.
- Cahu C., Gouillou-Coustans M.F., Fakhfakh M., Quazuquel P., 1991. The effect of ascorbic acid concentration in broodstock feed on reproduction of *Penaeus indicus*. ICES, Mariculture Committee, F, 40, 10 p.



- Cahu C., Villette M., Quazuguel P., Guillaume J., 1993. The effect of n-3 highly unsaturated fatty acid and vitamin E supplementation in broodstock feed on reproduction of *Penaeus indicus*. In: Fish nutrition in practice. S. Kaushik (ed.). INRA, Les colloques, Paris, France, 61, 589-598.
- Cahu C., Cuzon G., Quazuguel P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. Comp. Biochem. Physiol., 112A, 417-424.
- Cahu C., Guillaume J.C., Stéphan G., Chim L., 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. Aquaculture, 126, 159-170.
- Cailliau C., Claustre H., Vidussi F., Marie D., Vulot D., 1996. Carbon biomass and gross growth rates as estimated from  $^{13}\text{C}$  pigment labelling during photoacclimation in *Prochlorococcus* CCMP 1378. Mar. Ecol. Progr. Ser., 145, 209-221.
- Callinan R.B., Jiang L., 2003. Fatal, virus-associated peripheral neuropathy and retinopathy in farmed *Penaeus monodon* in eastern Australia. II. Outbreak descriptions. Dis. Aquat. Org., 53, 195-202.
- Callinan R.B., Jiang L., Smith P.T., Soowannayan C., 2003. Fatal, virus-associated peripheral neuropathy and retinopathy in farmed *Penaeus monodon* in eastern Australia. I. Pathology. Dis. Aquat. Org., 53, 181-193.
- Candido E.P., Jones D., 1996. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. Trends in Biochemistry, 14, 125-129.
- Canfield D.E., 1998. A new model for Proterozoic ocean chemistry. Nature, 396, 450-453.
- Canfield D.E., Teske A., 1996. Late Proterozoic rise in atmospheric oxygen concentration inferred from phylogenetic and sulphur-isotope studies. Nature, 382, 127-132.
- Cardenas W., Jenkins J.A., Dankert J.R., 2000. A flow cytometric approach to the study of crustacean cellular immunity. J. Invertebrate Pathology, 76(2), 112-119.
- Caridi A., 2002. Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wine yeasts by concomitant osmotic and thermal stress. Letters in Applied Microbiology, 35, 98-101.
- Chakraborti R.K., Halder D.D., Das N.K., Mandal S.K., Bhowmik M.L., 1986. Growth of *Penaeus monodon* Fabricius under different environmental conditions. Aquaculture, 51, 189-194.
- Chang E.S., Chang S.A., Keller R., Sreenivasula P., 1999a. Quantification of stress in lobsters. American Zoologist, 39(3), 487-495.
- Chang C.F., Su M.S., Chen H.Y., 1999b. A rapid method to quantify total haemocyte counts of *Penaeus monodon* using ATP analysis. Fish Pathology, 34(4), 211-212.
- Chapelle S., 1986. Aspects of phospholipids metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. Comp. Biochem. Physiol., 84B, 423-439.
- Charmantier G., Bouaricha N., Charmantier-Daures M., Thoet P., Trilles J.P., 1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ., 10, 65-66.
- Charmantier G., Charmantier-Daures M., Bouaricha N., Thoet P., Aiken D.E., Trilles J.P., 1988. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. Biol. Bull., 175, 102-110.
- Charpy L., Blanchot J., 1998. Photosynthetic picoplankton in French Polynesian atoll lagoons: estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. Mar. Ecol. Progr. Ser., 162, 57-70.
- Chen C., Huang B., Ye Z., Ji D., Wang S., Guo X., Chen Z., Jia X., 2001. Effect of temperature on growth, food intake and survival rate in *Penaeus vannamei* under different temperature conditions. J. Jimei Univ. (Nat. Sci.). Jimei Daxue Suebao, 6, 296-300.
- Chen J.C., Lin C.Y., 1992. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 156, 139-148.
- Chen J.C., Chen C.T., Cheng S.Y., 1994. Nitrogen excretion and changes in haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Progr. Ser., 110, 85-94.
- Chen J.C., Cheng S.Y., 1993a. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol., 106B(2), 293-296.
- Chen J.C., Cheng S.Y., 1993b. Hemolymph  $\text{PCO}_2$ , haemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. Aquat. Toxicol., 27, 281-292.
- Chen J.C., Cheng S.Y., 1995. Changes of oxyhaemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. Aquat. Toxicol., 33, 215-226.
- Chen J.C., Cheng S.Y., 2000. Recovery of *Penaeus monodon* from functional anaemia after exposure to sublethal concentration of nitrite at different pH levels. Aquat. Toxicol., 50, 73-83.
- Chen J.C., Kou Y.Z., 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. Aquaculture, 104, 249-260.
- Chen J.C., Liu P.C., Lei S.C., 1990a. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. Aquaculture, 89, 127-137.
- Chen J.C., Ting Y.Y., Lin J.N., Lin M.N., 1990b. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. Mar. Biol., 107, 427-431.
- Chen Y.L.L., Chen H.Y., 1992. Juvenile *Penaeus monodon* as effective zooplankton predators. Aquaculture, 103, 35-44.
- Cheng S.Y., Chen J.C., 1999. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhaemocyanin and deoxyhaemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. Aquat. Toxicol., 45, 35-46.
- Cheng W., Chen J.C., 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish & Shellfish Immunology, 10, 387-391.
- Cheng W., Juang F.M., Li J.T., Lin M.C., Liu C.H., Chen J.C., 2003. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. Aquaculture, 218, 33-45.



- Chevassus B., Dorson M., 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*, 85, 83-107.
- Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K., 2001. The manose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3220-3225.
- Chien Y.H., Pan C.H., Hunter B., 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, 216, 177-191.
- Chim L., Lemaire P., Delaporte M., Le Moullac G., Galois R., Martin J.L.M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress? *Aquac. Res.*, 32, 91-94.
- Chiodi H., 1963. Respiratory adaptation to high altitude. In: The regulation of human respiration. Cunningham D.J.C. & Lloyd B.B. (eds). Oxford, Scientific publications, 363-378.
- Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Waterbury J., Goericke R., Welschmeyer N., 1988. A novel free-living prochlorophyte occurs at high cell level concentrations in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343.
- Chisolm J.R.S., Smith V.J., 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 74, 979-982.
- Chong V.C., Sasekumar A., 1981. Food and feeding habits of the white prawn *Penaeus merguensis*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 5, 185-191.
- Choresh O., Ron E., Loya Y., 2001. The 60-kDa heat shock protein (HSP60) of the Sea Anemone *Anemone viridis*: a potential early warning system for environmental changes. *Mar. Biotechnol.*, 3, 501-508.
- Chowdhury M.A.R., Yamaha H., Miyoshi S.I., Shinoda S., 1990. Ecology and seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of a temperate region. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74 (1), 1-10.
- Chrétiennot-Dinet M.J., Vaulor D., Galois R., Spano A.M., Robert R., 1991. Analysis of larval oyster grazing by flow cytometry. *J. Shellfish Res.*, 10, 457-463.
- Cimino E.J., Owens L., Anderson T.A., 2003. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132A(3), 591-598.
- Clegg J.S., Jackson S.A., Van Hoa N., Sorgeloos P., 2000. Thermal resistance, developmental rate and heat shock proteins in *Artemia franciscana*, from San Francisco Bay and southern Vietnam. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 252, 85-96.
- Clemens S., Massabuau J.C., Legeay A., Meyrand P., Simmers J., 1998. *In vivo* modulation of interacting central pattern generators in lobster stomatogastric ganglion: influence of feeding and partial pressure of oxygen. *J. Neurosci.*, 18(7), 2788-2799.
- Clemens S., Massabuau J.C., Meyrand P., Simmers J., 2001. A new neuromodulatory-like role for oxygen in shaping the activity of neuronal networks in lobsters. *Respir. Physiol.*, 128(3), 299-315.
- Cochard J.C., Lemonnier H., Bernard E., Boglio E., Goarant C., 1997. Expériences 97 sur l'influence des sédiments du bassin d'élevage sur la physiologie de *Penaeus stylirostris*. Rapport des travaux menés du 22 février au 7 mars 1997 à la station Saint-Vincent et du 7 au 20 juin au centre océanologique du Pacifique. Rapport de mission Ifremer, DRV/AQ/TAH, 97, 42 p.
- Collet B., Boudry P., Thebault A., Heurtebise S., Morand B., Gérard A., 1999. Relationship between pre- and post settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 175(3-4), 215-226.
- Collins A.R., Dusinka M., Gedik C.M., Stetina R., 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, 104(3), 465-469.
- Colwell R.R., 1983. *Vibrios in the environment*. Ed. John Wiley and sons, New York, 575 p.
- Colwell R.R., Huq A., 1999. Global microbial ecology: biogeography and diversity of *Vibrios* as a model. *J. Appl. Microbiol.*, 85 (Suppl.), 134S-137S.
- Coman E.E., Connolly R.M., Preston N.P., 2003. Zooplankton and epibenthic fauna in shrimp ponds: factors influencing assemblage dynamics. *Aquac. Res.*, 34, 359-371.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Le Groumellec M., Grimont P., 1998a. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164, 297-309.
- Costa R., Mermoud I., Mari J., Bonami J.R., Hasson K., Lightner D.V., 1998b. Investigations on a disease of *Penaeus stylirostris* (Syndrome 93) in New Caledonia, exploring a viral hypothesis. *Aquaculture*, 164, 311-322.
- Couch C.A., 1988. A procedure for extracting large numbers of debris-free, living nematodes from muddy marine sediments. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 107, 96-100.
- Couch C.A., 1989. Carbon and nitrogen stable isotopes of meiobenthos and their food resources. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 28, 433-441.
- Coull B., 1990. Are members of the meiofauna food for higher trophic levels? *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 10, 233-246.
- Courties C., Vaquer A., Troussellier N., Lautier J., Chrétiennot-Dinet M.J., Neveux J., Machado C., Claustre H., 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370, 255.
- Coutteau P., Camara M.R., Sorgeloos P., 1996. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 147, 261-273.
- Coutteau P., Kontara E.K.M., Sorgeloos P., 2000. Comparison of phosphatidylcholine purified from soybean and marine fish roe in the diet of post-larval *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture*, 181, 331-345.
- Cowley J.A., Dimmock C.M., Spann K.M., Walker P.J., 2000. Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 39(3), 159-167.
- Crocos P., Davis G., Preston N., Keys S., 2000. Comparative growth, survival and reproductive performance of inbred and outbred lines of domesticated shrimp, *Penaeus japonicus*, in Australia. In: Book of abstracts. International symposium for genetic in aquaculture, Townsville, Australia, 15-22 July 2000, p. 45.
- Crosa J.H., Hodges L.L., Schiewe M.H., 1980. Curing of plasmids is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.*, 27, 897-902.
- Crosa J.H., Schiewe M.H., Falkow S., 1977. Evidence for a plasmid contribution to the virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.*, 18, 509-513.

- Crosa J.H., 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature*, 284, 566-567.
- Cucci T.L., Shumway S.E., Brown W.S., Newell C.R., 1989. Using phytoplankton and flow cytometry to analyze grazing by marine organisms. *Cytometry*, 10, 659-669.
- Cullis P.R., Hope M.J., 1985. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of lipids and membranes*. Vance D.E. & Vance J.E. (eds). The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., Meulo Park, California, 25-70.
- Cullough S.C., Cronin M.A., Mulcahy M.F., 2001. An investigation into the resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). *Aquaculture*, 199, 229-244.
- Cuzon G., Williams M., 2001. Shrimp rations for the future. *Feed International*, June 2001, 4 p.
- Dale V.H., Beyeler S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecol. Indic.*, 1(1), 3-10.
- Dall W., Smith D.M., Moore L.E., 1991. Biochemical composition of some prey species of *Penaeus esculentus* Haswell (Penaeidae: Decapoda). *Aquaculture*, 96, 151-166.
- Dall W., Smith D.M., Moore L.E., 1992. The composition of *Zostera capricorni* seeds: a seasonal natural food of juvenile *Penaeus esculentus* Haswell (Penaeidae: Decapoda). *Aquaculture*, 101, 75-83.
- Dao T., Goyard E., Cuzon G., Bureau D., Seynave G., Aquacop, 2002. Assessment of the responses to genetic selection for growth in *Penaeus stylirostris* under different diets. Poster présenté au Colloque WAS, Pékin, Chine, 23-27 avril 2002.
- de Jong W.W., Leunissen J.A., Voorter C.E., 1993. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.*, 10, 103-126.
- de la Peña L.D., Momoyama K., Nakai T., Muroga K., 1992. Detection of the causative agent of vibriosis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Gyobyo Kenkyu*, 244, 223-228.
- de la Peña L.D., Nakai T., Muroga K., 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 30, 39-45.
- de la Peña L.D., Nakai T., Muroga K., 1998. Experimental infection of Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) with *Vibrio penaeicida*. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh*, 50, 128-133.
- de la Peña L.D., Tamaki T., Momoyama K., Nakai T., Muroga K., 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 115, 1-12.
- Dean J.M., Vernberg F.J., 1966. Hypothermia and the blood of crabs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111B, 347-352.
- Dégremont L., 2003. Étude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'université de Caen, Basse-Normandie, 333 p.
- Dégremont L., Bédier E., Martin J.L., Soletchnik P., Joly J.P., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samain J.F., Boudry P., 2002. Genetic basis of survival in juvenile cupped oysters (*Crassostrea gigas*). Proceedings of the world congress on genetics applied to livestock production, Montpellier, France, August 19-23, 481-484.
- Dégremont L., Boudry P., Soletchnik P., Bédier E., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samain J.F., 2003. Genetic basis of summer mortality in juvenile cupped oysters. *J. Shellfish Res.*, 22(1), 327 (abstract).
- Dejours P., 1981. Principles of Comparative Respiratory Physiology (2nd ed.). Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
- Dejours P., 1988. Respiration in water and air. Adaptation-regulation-evolution (2nd ed.). Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
- Della Patrona L., Brun P., Capo S., Chim L., Martin J.L.M., (en préparation). Contribution de la productivité naturelle du milieu d'élevage à la production de la crevette *P. stylirostris*: influence de la saison et de quelques pratiques zootechniques.
- Desloup-Paoli J.M., Mazouni N., Gentien P., Courties C., Vaquer A., Daniélou M.M., Troussellier M., 2002. Use of plankton resources by suspended feeders cultured in the Thau lagoon (France). In: *Aquaculture, environment and marine phytoplankton*. *Brest*, 21-23 May 2001. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 34, 76-88.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorselaer A., Rodriguez J., Bachère É., 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272, 28398-28406.
- Destoumieux D., Bulet P., Strub J.M., Bachère É., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.*, 266, 335-346.
- Destoumieux D., Muñoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M., Bachère É., 2000a. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.*, 113, 461-469.
- Destoumieux D., Muñoz M., Bulet P., Bachère É., 2000b. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 1260-1271.
- Destoumieux-Garzon D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachère É., 2001. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.*, 276, 47070-47077.
- Direkbusarakom S., Danayadol Y., 1998. Effect of oxygen depletion on some parameters of the immune system in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: *Advances in shrimp biotechnology*. Flegel T.W. (ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 147-149.
- Disalvo L.H., Blecka J., Zebal R., 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 219-221.
- Domouhtsidou G.P., Dimitriadis V.K., 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.*, 115, 123-137.
- Dorval J., Leblond V.S., Hontela A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochloride pesticide. *Aquat. Toxicol.*, 63, 229-241.
- Downs C.A., Fauth J.E., Woodley C.M., 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar. Biotechnol.*, 3, 380-397.
- Drach P., Tchernigovtzeff C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'inter-mue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu*, 18, 596-609.

- Dubelaar G.B.J., Guerritzen P.L., 2000. Cytobuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography. *Scientia Marina*, 64, 255-265.
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M., 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature*, 21, 10-14.
- Dunlap D.Y., Matsumura F., 1997. Development of board spectrum antibodies to heat-shock protein 70 as biomarkers for detection of multiple stress pollutants and environmental factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 37, 238-244.
- Dye A.H., 1983. Composition and seasonal fluctuations of meiofauna in a Southern Africa mangrove estuary. *Mar. Biol.*, 73, 165-170.
- Egusa S., Takahashi Y., Itami T., Momoyama K., 1988. Histopathology of vibriosis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, 23, 59-65.
- Ekengren S., Hultmark D., 2001. A family of turandot-related genes in the humoral stress response of drosophila. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284, 998-1003.
- Elston R., Leibovitz L., 1980a. Detection of vibriosis in hatchery reared larval oysters: correlation between clinical, histological and ultrastructural observations in experimentally induced disease. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.*, 70, 122-123.
- Elston R., Leibovitz L., 1980b. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 37, 964-978.
- Elston R.A., Farley C.A., Kent M.L., 1986. Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.*, 2, 49-54.
- Engelsma M., 2002. Neuroendocrine-immune interactions in carp: a role for cortisol and interleukin-1. Wageningen University, 158 p.
- Engle C.R., Pounds G.L., Van der Ploeg M., 1995. The cost of off-flavor. *J. World Aquac. Soc.*, 26, 297-306.
- Erecinska M., Silver I.A., 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.*, 128, 263-276.
- Ernande B., Boudry P., Clobert J., Haure J., (in press). Plasticity in resource allocation based life history traits of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.*
- Ernande B., Clobert J., McCombie H., Boudry P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): A quantitative genetics study. *J. Evol. Biol.*, 16, 399-441.
- Escavage V., Castel J., 1990. The impact of the lagoonal shrimp *Palaemonetes varians* (Leach) on meiofauna in a temperate coastal impoundment. *Acta Oecol.*, 11(3), 409-418.
- Fandrey C., Frede S., Jelkmann W., 1994. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem. J.*, 303, 507-510.
- FAO, 2002. Statistic Depech, Production Aquaculture. Annuaire annuel de la FAO, année 2000, 178 p.
- Farell D.H., Crosa J.H., 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry*, 30, 3432-3436.
- Farley C.A., 1997. Juvenile oyster disease resistance studies continued: 1994-1996. *J. Shellfish Res.*, 16(1), 286.
- Fast A.W., Lester L.J., 1992. Marine shrimp culture: principles and practices. In: Development in aquaculture and fisheries science. Fast A.W. & Lester L.J. (eds). Elsevier, Amsterdam, 23, 641-652.
- Fell J.W., Cefalu R.C., Master I.M., Tallman A.S., 1975. Microbial activities in the mangrove (*Rhizophora mangle*) leaf detrital system. In: The biology and management of mangroves, vol. 2. Walsh G., Snedaker S. & Teas H. (eds), University of Florida, Gainesville, 661.
- Fingerman M., Nagabhushanam R., 1992. Control of release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102C, 343-352.
- Finkel T., Holbrook N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-245.
- Finstad B., Thomassen M.S., 1991. Does dietary lipid composition affect the osmoregulatory ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at high and low temperatures? *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A, 463-471.
- Flegel T.W., Pasharawipat T., 1998. Active viral accommodation: A new concept for crustacean response to viral pathogens. In: Advances in shrimp biotechnology. Flegel T.W. (ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 245-250.
- Fochken U., Groth A., Coloso R.M., Becker K., 1998. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture*, 164, 105-116.
- Folch J., Lees M., Sloane S.G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Folke C., Kautsky N., 1992. Aquaculture with its environment: prospects for sustainability. *Ocean Coast. Manage.*, 17, 5-24.
- Foltz K.R., Partin J. S., Lennarz W.J., 1993. Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. *Science*, 259, 1421-1425.
- Ford S.E., Haskin H.H., 1987. Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *J. Parasit.*, 73(2), 368-376.
- Forgue J., Burtin B., Massabuau J.C., 1989. Maintenance of oxygen consumption in resting teleost *Silurus glanis* at various levels of oxygenation. *J. Exp. Biol.*, 143, 305-319.
- Forgue J., Truchot J.P., Massabuau J.C., 1992. Low arterial PO<sub>2</sub> in resting crustaceans is independent of blood O<sub>2</sub> affinity. *J. Exp. Biol.*, 170, 257-264.
- Frankenberg M.M., Jackson S.A., Clegg J.S., 2000. The heat shock response of adult *Artemia franciscana*. *Therm. Biol.*, 25, 481-490.
- Funge-Smith S.J., Briggs M.R.P., 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture*, 164, 117-133.
- Fuqua C., Greenberg E.P., 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 183-189.
- Fuxa J.R., 1993. Insect resistance to viruses. In: Parasites and pathogens of insects. Beckage N.E., Thomson S.N. & Federici B.A. (eds). Academic Press, 197-210.
- Galinié C., 1990. Shrimp aquaculture in New Caledonia. In: Advances in tropical aquaculture. Tahiti, 2 Feb-4 March 1989. Aquacop. Éd. Ifremer, Actes Colloq., 9, 45-50.
- Gannon A.T., Wheatly M.G., 1995. Physiological effects of a gill barnacle on host blue crabs during short-term exercise and recovery. *Mar. Behav. Physiol.*, 24, 215-225.



- Gapp G., Guoyard S., Nabet P., Scouvert J., 1999. Evaluation of the applications of a system for real-time microbial analysis of pharmaceutical water systems. *Eur. J. Parent. Sci.*, 4, 131-136.
- Garcia D.K., Dhar A., Alcivar-Warren A.A., 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals presence of two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5(1), 1-83.
- Garen P., Martin J.L.M., 2002. Could a seasonal-like reduction in light radiation intensity affect cultured shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson) yield? *Aquac. Int.*, 10, 43-55.
- Garson G.I., Pretto R.M., Rouse D.B., 1986. Effects of manures and pelleted feeds on survival, growth and yield of *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* in Panama. *Aquaculture*, 59, 45-52.
- Gasol J.M., del Giorgio P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64, 197-224.
- Gatesoupe F.J., Lambert C., Nicolas J.L., 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 757-763.
- Gay M., Pons A.M., Berthe F., Le Roux F., (soumis) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental vibriosis model in *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*
- Gay M., Pons AM, Renault, Le Roux F., (en préparation). A new french collection: two *Vibrio lentus* strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: pathology description.
- Gee J.M., 1989. An ecological and economic review of meiofauna as food for fishes. *Zool. J. Linn. Soc.*, 96, 243-261.
- Gee J.M., Somerfield P.J., 1997. Do mangrove diversity and leaf litter decay promote meiofaunal diversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 218, 13-33.
- Gérard A., Ledu C., Phélipot P., Naciri-Graven Y., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture*, 174 (3-4), 229-242.
- Gjedrem T., 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquac.*, 33-45.
- Glude J.B., 1975. A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations (1965-1972). Proceedings of the 3rd US Japan meeting on aquaculture at Tokyo, Japan, October 1974, 29-34.
- Goarant C., Mérien F., Berthe F., Mermoud I., Pérolat P., 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3), 1145-1151.
- Goarant C., 2000. Épidémiologie et facteurs de virulence des bactéries du genre *Vibrio* responsables des mortalités de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Perspectives de lutte. Thèse de troisième cycle de l'université de Polynésie française, 174 p.
- Goarant C., Boglio E., 2000. Changes in hemocyte counts in the shrimp *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. *J. World Aquac. Soc.*, 31(1), 123-129.
- Goarant C., Herlin J., Ansquer D., Domalaïn D., Imbert E., Marteau A.L., 2003. Bases des connaissances sur l'épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo*, agent étiologique du « Syndrome d'été » chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie. *Ifremer, Rapp. Intern., DRV/RST/RA/LAC*, 23 p.
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.L., Martin C., Martin B., 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 40, 101-107.
- Goarant C., Mermoud I., Costa R., Haffner P., Boglio E., 1996. Study of episodes of mortality observed in reared *Penaeus stylirostris* since 1993 in New Caledonia. I. Bio-technical impact and gross signs in diseased prawns. Poster de présentation générale du Syndrome 93 au congrès annuel de la World Aquaculture Society, 29 janvier-2 février 1996, Bangkok. Book of abstracts, 139-140.
- Goarant C., Régnier, F., Brizard R., Marteau A.L., 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture*, 169, 291-296.
- Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H., Har-tung H.P., Tokya K.V., Lassmann H., 1994. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.*, 71, 219-225.
- Gomez-Gomez L., Boller T., 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.*, 5, 1003-1011.
- Gomez-Jimenez S., Uglow R.E., Gollas-Galvan T., 2000. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxylase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10, 631-635.
- Gopalakrishnan A., Lal K.K., Ponniah A.G., 1999. Conservation of the Nilgiri rainbow trout in India. *Naga ICLARM Q.*, 22(3), 16-19.
- Gouleau D., Feuillet-Girard M., Germaneau J., Robert S., 1995. Effets de l'assèchement des bassins ostréicoles sur le cycle biogéochimique de nutriments azotés : ammonification préférentielle. *Oceanol. Acta*, 19, 101-115.
- Gouilletquer P., Héral M., 1997. Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *NOAA Techn. Rep. NMFS*, 129, 137-164.
- Gouilletquer P., Soletchnik P., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N., Taillade S., 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oléron (France). ICES Statutory Meeting, Population Biology, Mariculture Committee/ICES/CM/CC, 14-20.
- Gouilletquer P., Wolowicz M., Latala A., Geairon P., Huvet A., Boudry P., 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Spanish, Japanese and Taiwanese origins. *Aquat. Living Resour.*, 12(4), 271-277.
- Goxe D., 2001. Compte rendu des expérimentations menées à Sea Farm pour la période allant du 1<sup>er</sup> juillet 2000 au 30 juin 2001. Rapport d'activité de la ferme pour le GEA, 12 p.
- Goyard E., Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P., Aquacop., 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquat. Living Resour.*, 16, 501-508.
- Goyard E., Patrois J., Peignon J.M., Vanaa V., Dufour R., Viallon J., Bédier E., 2001. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. *Aquaculture*, 204 (3-4), 461-468.
- Griffin M., Casadio R., Bergamini C.M., 2002. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.*, 368-396.



- Grimont P.A.D., 1984. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.*, 34, 541-546.
- Grizel H., Héral M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 47, 399-403.
- Gross P.S., Bartlett T.C., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 565-577.
- Grosso J.L., Restrepo R., Sanchez L.E., Avendaño D., 2000. Proceso Natural para la remoción de metales y desalación en sistemas acuáticos. *Ecopetrol*.
- Guéguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumigi-guère C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère É., Escoubas J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303, 139-145.
- Guo X.M., Debrosse G.A., Allen S.K., 1996. All-triploid oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142(3-4), 149-161.
- Hada H.S., West P.A., Lee J.V., Stemmler J., Colwell R.R., 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 1-4.
- Hagerman L., Sondergaard T., Weile K., Hosie D., Uglow R.F., 1990. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephraps norvegicus* under hypoxia. *Comparative Biochem. Physiol.*, 97A(1), 51-55.
- Hall M., Van Ham E.H., 1998a. Diurnal variation and effects of feeding on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Physiol. Zool.*, 71(5), 574-583.
- Hall M.R., Van Ham E.H., 1998b. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *J. World Aquac. Soc.*, 29, 290-299.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., 2001. Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press.
- Han T.M., Runnegar B., 1992. Megascopic eukaryotic algae from the 2.1 billion-year-old Negaunee iron-formation, Michigan. *Science*, 257, 232-235.
- Harrison K.E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.*, 9, 1-28.
- Hartl F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-580.
- Harvell C.D., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R., Grimes D.J., Hofmann E.E., Lipp E.K., Osterhaus A.D.M.E., Overstreet R.M., Porter J.W., Smith G.W., Vasta G.R., 1999. Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285, 1505-1510.
- Haskin H.H., Ford S.E., 1979. Development of resistance to *Minobinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Mar. Fish. Rev.*, 54-63.
- Haure J., Huvet A., Palvadeau H., Nourry M., Penisson C., Martin J.L.Y., Boudry P., 2003. Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218, 539-551.
- Haure J., Huvet A., Palvadeau H., Nourry M., Pénisson C., Boudry P., Martin J.L.Y., 2001. Étude de la croissance et de l'activité des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* et de leurs hybrides en système contrôlé. *Ifremer, Rapp. Intern.*, DRV/RST/RA/LCPL/2001-09, 39p.
- Havenstein G., Ferket P.R., Scheideler S.E., Rives D.V., 1994. Carcass composition and yield of 1991 vs 1957 broilers when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Sci.*, 73, 1795-1804.
- Hazel J.R., Williams E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.*, 29, 167-227.
- Hedqvist-Johnson K., André C., 1991. The impact of the brown shrimp *Crangon crangon* on soft-bottom meiofauna: an experimental approach. *Ophelia*, 34(1), 41-49.
- Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tetelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleischmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., Fraser C.M., 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406, 477-483.
- Heidelberg J.F., Heidelberg K.B., Colwell R.R., 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5488-5497.
- Heip C., Vincx M., Vranken G., 1985. The ecology of marine nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 23, 399-489.
- Heldal M., Bratbak G., 1991. Production and decay of virus in aquatic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72, 205-212.
- Hennig O., Itami T., Macda M., Kondo M., Natsukari Y., Takahashi Y., 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in Kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.*, 33, 389-393.
- Héral M., 1986. L'ostréiculture française traditionnelle. In: *Aquaculture*. Barnabé G. (ed.), vol. 1, Tech & Doc. Lavoisier, Paris, 345-390.
- Hernandez G., Olmos J., 2003. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio parvulus* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 722-727.
- Herreid C.F. II., 1980. Hypoxia in Invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67A, 311-320.
- Hetzel D.J.S., Crocos P.J., Davis G.P., Moore S.S., Preston N.C., 1999. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 181, 215-223.
- Heude-Berthelin C., 2000. Étude du métabolisme du glycérogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales. Thèse de l'université de Caen, 156 p.
- Hoffman E.K., Dunham P.B., 1995. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int. Rev. Cytol.*, 161, 173-262.
- Holland H.D., 1994. Early proterozoic atmospheric change. In: *Early life on earth*. Nobel Symposium, 84, 237-244.

- Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes P.E., Strickland J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 30, 3-15.
- Hopkins J.S., Hamilton R.D., Sandifer P.A., Stokes A.D., Browdy C.L., 1991. Effects of minimal water exchange on the water quality and production of intensive marine shrimp ponds. Programme and abstracts, 22nd Annual Conference, World Aquac. Soc., June 1991, San Juan, Puerto Rico, 127.
- Hopkins J.S., Hamilton R.D., Sandifer P.A., Browdy C.L., Stokes, A.D., 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquac. Soc.*, 24 (3), 304-320.
- Hopkins J.S., Sandifer P.A., Browdy C.L., 1995. A review of water management regimes which abate the environmental impact of shrimp farming. *In: Swimming through troubled water*. Browdy C.L. & Hopkins J.S. (eds). Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture 95, World Aquac. Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 157-166.
- Hoyt M., Fleeger J.W., Siebeling R., Feller R.J., 2000. Serological estimation of prey-protein gut-residence time and quantification of meal size for grass shrimp consuming meiofaunal copepods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 248, 105-119.
- Hunter J., Feller R.J., 1987. Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from a South Carolina tidal creek. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 105(1), 61-70.
- Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R., 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 275-283.
- Hussenot J., Martin J.L.M., 1995. Assessment of the quality of pond sediment in aquaculture using simple, rapid techniques. *Aquacult. Int.*, 3, 123-133.
- Huver A., 2000. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *C. angulata*: variabilité, différenciation en adaptation des populations naturelles et introduites. Thèse de doctorat de l'université de Tours, 202 p.
- Ishimaru K., Akagawa-Matsushita M., Muroga K., 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 134-138.
- Itazawa Y., Takeda T., 1978. Gas exchange in the carp gills in normoxic and hypoxic conditions. *Respir. Physiol.*, 35, 263-269.
- Jackson C.J., Preston N., Thompson P., Burford M., 2003a. Nitrogen budget and effluent nitrogen characteristics of an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, 218, 397-411.
- Jackson C.J., Preston N., Burford M.A., Thompson P., 2003b. Managing the development of sustainable shrimp farming in Australia: the role of sedimentation ponds in treatment of farm discharge water. *Aquaculture*, 226, 23-34.
- Jackson S.A., Clegg J.S., 1996. The ontogeny of low molecular weight stress protein p26 during early development of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Dev. Growth Differ.*, 38, 153-160.
- Jacquet S., Lennon J.F., Vaulot G., 1998. Application of a compact automatic sea water sampler to high-frequency picoplankton studies. *Aquat. Microb. Ecol.*, 14, 309-314.
- Jamu D.M., Piedrahita R.H., 2001. Ten-year simulations of organic matter concentrations in tropical aquaculture ponds using the multiple pool modelling approach. *Aquac. Eng.*, 25, 187-201.
- Janeway C.A.J., 1994. The role of microbial pattern recognition in self: non-self discrimination in innate and adaptive immunity. *In: Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense*. Hoffmann J.A., Janeway C.A. & Natori S. (eds), 115-122.
- Jeffries V.E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29, 201-226.
- Jiang S.C., Paul J.H., 1996. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 142, 27-38.
- Jones A.B., Preston N.P., 1999. Sydney rock oyster, *Saxostrea commercialis* (Iredale and Roughley), filtration of shrimp farm effluent: the effects on water quality. *Aquac. Res.*, 30, 51-57.
- Jonker R.R., Meulemans J.T.M., Dubelaar G.B.J., Wilkins M.F., Ringelberg J., 1995. Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton. *Water Sci. Technol.*, 32, 177-182.
- Jordana E., Grémare A., Lantoiné E., Courties C., Charles E., Amouroux J.M., Vétion G., 2001. Seasonal changes in the grazing of coastal picoplankton by the suspension-feeding polychaeta *Ditrupea arietina* (O.F. Müller). *J. Sea Res.*, 46, 245-259.
- Jussila J., McBride S., Jago J., Evans L.H., 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Paralimnys cygnus* George). *Aquaculture*, 199, 185-193.
- Justou C., Mugnier C., 2002. Effet de l'ammoniaque sur différents paramètres physiologiques sur la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Ifremer, DRV/RA/NC, Fiche Biotechnique 2002-01, 16 p.
- Kadlec R.H., Knight R.L., 1996. *Treatment Wetlands*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 893 p.
- Kanazawa A., Teshima S., Sakamoto M., 1985. Effect of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture*, 50, 39-49.
- Kaneko T., Colwell R.R., 1978. The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *Microb. Ecol.*, 4, 135-155.
- Kaneko T., Colwell R.R., 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and Copepods. *Appl. Microbiol.*, 29, 269-274.
- Kaprelyants A.S., Kell D.B., 1996. Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends Microbiol.*, 4, 237-242.
- Kathiresan K., Bingham B.L., 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv. Mar. Biol.*, 40, 81-251.
- Kautsky N., Ronnback P., Tedengren M., Troell M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191, 145-161.
- Kennedy R.J., Roberts D.A., 1999. Survey of the current status of the flat oyster *Ostrea edulis* in Strangford Lough, Northern Ireland, with a view to the restoration of its oyster beds. *Proc. R. Irish Acad.*, 99B(2), 79-88.
- Kirkwood T.B.B., Austad S.N., 2000. Why do we age? *Nature.*, 408, 233-238.

- Kirpichnikov V.S., 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer-Verlag, Berlin.
- Knibb W., 2000. Genetic improvement of warm water fish: which method for industry? Aquac. Res., 31, 11-23.
- Knibb W.R., Gorshkov S., Gorshkova G., 1998. Genetic improvement of cultured marine fish: case studies. In: Tropical Mariculture. De Silva S. (ed.). Academic Press, 111-149.
- Koganazawa A., 1975. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proceedings of the Third US-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan, 29-34.
- Kondalarao B., 1984. Distribution of meiobenthic harpacticoid copepods in Garctami Godavari estuarine system. Indian J. Mar. Sci., 13, 80.
- Kontara E.K., Merchie G., Lavens P., Robles P., Nelis H., De Leenheer A., 1997. Improved larviculture outpouts of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in their diet. Aquac. Int., 5, 127-136.
- Koroleff F., 1976. Determination of ammonia. In: Methods in seawater analysis. Grasshoff K. (ed.), Verlag chemie, Weinheim, RFA, 126-133.
- Korsmeyer K.E., Dewar H., Lai N.C., Graham J.B., 1996. The aerobic capacity of tunas: adaptation for multiple metabolic demands. Comp. Biochem. Physiol., 113A (1), 17-24.
- Kreie J., Pendley J., 1998. Spreadsheet safety: designing the perfect file. J. Account., 186, 31-34.
- Krishnamurthy K., Sultan Ali M.A., Prince Jeyaseelan M.J., 1984. Structure and dynamics of the aquatic food web community with special reference to the nematodes in mangrove ecosystems, Proceedings of the Asian Symposium on Mangrove Environment Research Management, 1, 429-452.
- Kultz D., 2000. Osmotic regulation of DNA activity and the cell cycle. In: Environmental stressors and gene regulation. Storey K.B. & Storey J. (eds.). Elsevier, 157-179.
- Kumar S., McDonnell P.C., Lehr R., Tierney L., Tzimas M.N., Griswold D.E., Capper E.A., Tal-Singer R., Wells G.L., Doyle M.L., Young P.R., 2000. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. J. Biol. Chem., 275, 10308-10314.
- Lacoste A., Jalabert E., Malham S.K., Cuffé A., Poulet S.A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. Appl. Environ. Microbiol., 67, 2304-2309.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V., 1999. *Vibrio splendidus* related-strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 19, 102-106.
- Lambert C., Nicolas J.L., Cilia V., Corre S., 1998. *Vibrio pectenecida* sp. nov.: a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 481-487.
- Lanari D., Ballestrazzi R., Tibaldi E., 1989. Effects of fertilization and stocking rate on the performance of *Penaeus japonicus* (Bate) in pond culture. Aquaculture, 83, 269-279.
- La Rosa T., Mirto S., Marino A., Alonzo V., Maugeri T.L., Mazzola A., 2001. Heterotrophic bacteria community and pollution indicators of mussel: farm impact in the Gulf of Gaeta (Tyrrhenian Sea). Mar. Environ. Res., 52, 301-321.
- Launey S., Barré M., Gérard A., Naciri-Graven Y., 2001. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. Genetical Research, 78(3), 259-270.
- Lavens P., Sorgeloos P., 2000. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. Aquaculture, 191, 169-176.
- Le Moullac G., Haffner P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191, 121-131.
- Le Moullac G., Le Groumellec M., Ansquer D., Froissard D., Levy P., Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol., 7, 227-234.
- Le Moullac G., Saulnier D., Boulangé F., Ansquer D., Levy P., 1999. Resistance criteria in the shrimp *Penaeus stylirostris* to the infection by the bacteria *Vibrio penaeicida* isolated from New Caledonia: study of hemogram and phenoloxidase activity. World Aquaculture Society 99, 26 April-2 May 1999, Sydney, Australia. Abstract book, 432.
- Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Acvarre J.-C., Levy P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunol., 8, 621-629.
- Le Roux F., Gay M., Waechter M., Poubalanne S., Lambert C., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality outbreaks. Aquat. Living Resour., 15, 251-258.
- Le Roux F., Gay M., Waechter M., Poubalanne S., Lambert C., Chollet B., Nicolas J.L., Berthe F., (sous presse). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus* related strains based on *gyrB* gene sequences. Dis. Aquat. Org.
- Lebaron P., Parthuisot N., Catala P., 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol., 64, 1725-1730.
- Lebaron P., Servais P., Agogue H., Courties C., Joux F., 2001. Does the high nucleic-acid content of individual bacterial cells allow to discriminate active cells in aquatic systems? Appl. Environ. Microbiol., 67, 1775-1782.
- Lebaron P., Servais P., Baudoux A.C., Bourrain M., Courties C., Parthuisot N., 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. Aquat. Microb. Ecol., 28, 131-140.
- Lee D.O., Wickins J.F., 1992. Crustacean Farming. Blackwell Scientific Publications, 335 p.
- Lee K., Chen Y., Liu P., 1999a. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. Blood Cells Mol. Dis., 25, 180-192.
- Lee K., Liu K., Chen Y., 1999b. Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*. Electrophoresis, 20, 3343-3346.
- Lee K., Yu S., Liu P., 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Curr. Microbiol., 34, 110-117.
- Lee P.G., Lea R.N., Dohmann E., Prebilsky W., Turk P.E., Ying H., Whitson J.L., 2000. Denitrification in aquaculture systems: an example of a fuzzy logic control problem. Aquac. Eng., 23, 37-59.



- Lefèvre J., 1997. Dynamique des communautés phytoplanctoniques dans des bassins d'élevage de crevettes en saison froide, en relation avec les épisodes de mortalité du « Syndrome 93 ». Rapport de stage du DESS Environnement, Sols, Eaux continentales et Eaux Marines, université de Caen et Rouen, 140 p.
- Legeay A., Massabuau J.C., 1999. Blood oxygen requirement in resting crab *Carcinus maenas* 24 hours after feeding. *Can. J. Zool.*, 77, 784-794.
- Legeay A., Massabuau J.C., 2000. Effect of water salinity on resistance to hypoxia in resting green crab *Carcinus maenas* after feeding. *Mar. Biol.*, 136, 387-396.
- Legendre L., Courtroy C., Troussellier M., 2001. Flow cytometry in Oceanography 1989-1999. Environmental challenges and research trends. *Cytometry*, 44, 164-172.
- Legrand A., Mugnier C., Lemonnier H., (in prep.). Effect of sediment quality on shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiology: total ammonia effect.
- Lemaire P., Bernard E., Martinez-Paz J.A., Chim L., 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 209, 307-317
- Lemarchand K., Lebaron P., 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 203-209.
- Lemarchand K., Parthuisot N., Catala P., Lebaron P., 2001. Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquat. Microb. Ecol.*, 25, 301-309.
- Lemonnier H., Brizard R., 1997. Impact d'un premier élevage de crevettes péneïdes sur le fond du bassin. *Ifremer, Rapp. Intern.*, DRV/RA/RST/97-18, 31p.
- Lemonnier H., Brizard R., 1998. Effets des renouvellements en eau sur l'écosystème des bassins d'élevage semi-intensifs de crevettes en Nouvelle-Calédonie durant la saison froide. *Ifremer, Rapp. Intern.*, DRV/RA/RST/98-06, 49 p.
- Lemonnier H., Brizard R., 2001. Evolution of pond bottom and production in a semi-intensive shrimp pond. Book of abstracts. The International triennial conference and exposition of World Aquaculture Society, January 21-25, 2001, Orlando, USA, p. 366.
- Lemonnier H., Brizard R., Herlin J., Mugnier C., 2001. Sediment accumulation in earthen shrimps ponds. *Advocate*, 4(5), 70-80.
- Lemonnier H., Charpentier C., Domalain D., Herlin J., Lambert C., Marteau A.L., Maillez J.R., Mugnier C., Patrois J., Pita E., Saléry L., 2002. Variabilité d'un milieu d'élevage intensif de crevettes dans le cadre du syndrome d'été: résultats préliminaires. *Ifremer, Rapp. Intern.*, RA/LAC/FB2002-03, 39 p.
- Lemonnier H., Domalain D., Goarant C., Herlin J., Marteau A.L., Mugnier C., Soulard B., 2003a. Suivis de la qualité du milieu d'élevage dans le cadre du syndrome d'été. *Ifremer, Rapp. Intern.*, DRV/RST/RA/LAC-2003-01.
- Lemonnier H., Martin J.L.M., Brizard R., Herlin J., 2003b. Effect of water exchange rate on waste production in semi-intensive shrimp ponds during the cold season in New Caledonia. *J. World Aquac. Soc.*, 34(1), 40-49.
- Lewis S., Handy R.D., Cordi B., Billingham Z., Depledge M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8, 351-368.
- Li W.K.W., 1990. Bivariate and trivariate analysis in flow cytometry: phytoplankton size and fluorescence. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1356-1367.
- Li W.K.W., 1997. Cytometric diversity in marine ultra-phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 874-880.
- Li W.K.W., Dickie P.M., 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*, 44, 236-246.
- Li W.K.W., Jelleff J.F., Dickie P.M., 1995. DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1485-1495.
- Lightner D.V., 1995. Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. Proceedings of the ninety-ninth annual meeting of the United States Animal Health Association. Pat Campbell and Associates, Richmond, VA, 36-52.
- Lightner D.V., Redman R.M., 1998a. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220.
- Lightner D.V., Redman R.M., 1998b. Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, 33(4), 165-180.
- Lignot J.H., 1995. La capacité osmorégulatrice chez *Penaeus stylirostris* et *Penaeus vannamei*. *Ifremer, Rapp. Intern.*, 30 p., diffusion limitée.
- Lignot J.H., Spanings-Pierrot C., Charmantier G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 209-245.
- Lin C.K., 1989. Prawn culture in Thailand. What went wrong? *World Aquac.*, 20(2), 19-20.
- Lin H., Thuet P., Trilles J.P., Mounet-Guillaume R., Charmantier G., 1993. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.*, 117, 591-598.
- Lindquist S., 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 1151-1191.
- Lindquist S., Craig E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genetics*, 22, 631-677.
- Lisitsyn N., 1995. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends Genet.*, 11, 303-307.
- Liu P., Lee K., 1999. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 32-39.
- Liu P., Lee K., Tu C., Chen S., 1997. Purification and characterization of cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 35, 32-39.
- Lowry O.H., Rosebrough N.F., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 251.
- Lucien-Brun H., 2001. Shrimp farming in New-Caledonia: successful, integrated industry. *Global Aquac. Advocate*, 4(5), 63-64.
- Macbeth G.M., O'Brien L., Palmer P., Lewer R., Garret R., Wingfield M., Knibb W., 2002. Selective breeding in barramundi. Department of Primary Industries, Queensland, Information Series.
- Madenjian C.P., 1990. Patterns of oxygen production and consumption in intensively managed shrimp ponds. *Aquac. Eng.*, 21, 407-417.



- Maguire G.B., Allan G.L., 1992. Effects of temperature on growth, food consumption and food conversion of *Penaeus monodon*, *Penaeus plebejus* and *Metapenaeus macleayi*. NSW Fisheries, Salamander Bay, NSW (Australia). Proceedings of the aquaculture nutrition workshop, 97-99.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M., Iida T., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet.*, 361, 743-749.
- Marie D., Brussaard C.P.D., Thyraug R., Bratbak G., Vaulot D., 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 45-52.
- Marie D., Partensky F., Vaulot D., 1996. Application of the novel DNA dyes YOYO-1, YOPRO-1 and Picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1649-1655.
- Marques M.R.F., Barracco M., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 23-44.
- Martin J.L.M., Marchand M., Shafiqul Alam A.M., 1993. Assessment of impact and effects of chemical contaminants in aquatic environments. In: Hypertrophic and polluted tropical freshwater ecosystems, ecological bases for water resources management. *Proc. Int. Symp. Limnol.*, 25-28 november 1991, University of Dacca, Bangladesh, Tilzer M. & Khondker M., (eds), 19-37.
- Martin J.L.M., Veran Y., Guelorget O., Pham D., 1998. Shrimp rearing: stocking density, impact on sediment, waste output; their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. *Aquaculture*, 164, 135-149.
- Martin J.L.M., 2002 Selection of environmental indicators for shrimp aquaculture site selection. In: Shrimp farming sustainability in the Mekong delta. Environmental and technical approaches. Proceedings of the workshop held in Travinh (Vietnam), 5-8 March 2002. Populus J., Martin J.L.M. & Tac An N. (eds), Ifremer, Rapp. Intern., DEL/O/Brest 02-06, 3-6.
- Martinez-Cordova L.R., Villarreal-Colmenares H., Porchas-Cornejo M.A., 1995. Culture of white shrimp *Penaeus vannamei* in reduced water exchange ponds in Sonora, Mexico. *J. World Aquac. Soc.*, 26(4), 47-48.
- Massabuau J.C., Burtin B., 1984. Regulation of the oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus*: role of the peripheral O<sub>2</sub> chemoreception. *J. Comp. Physiol.*, 155B, 43-49.
- Massabuau J.C., Dejours P., Sakakibara Y., 1984. Ventilatory CO<sub>2</sub> drive in the crayfish: influence of oxygen consumption and water oxygenation. *J. Comp. Physiol.*, 154B, 65-72.
- Massabuau J.C., Forgue J., 1996. A field vs laboratory study of blood O<sub>2</sub>-status in normoxic crabs at different temperatures. *Can. J. Zool.*, 74(3), 423-430.
- Massabuau J.C., 2001 From a low blood- to low tissue-oxygenation strategy: an evolutionary theory. *Respir. Physiol.*, 128(3), 249-262.
- Massabuau J.C., 2002. Primitif, l'oxygénation de nos cellules? *La Recherche*, 354, 48-51.
- Maurer D., Comps M., His E., 1986. Caractéristiques des mortalités printanières de l'huître *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. *Halioris*, 15, 309-317.
- Maxime V., Peyraud-Waitzenegger M., Claireaux G., Peyraud C., 1990. Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid-base status and O<sub>2</sub> affinity of haemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Physiol.*, 160B, 31-39.
- Mayo M.A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.*, 147(8), 1655-1656.
- Mazurié J., Fleury P.G., Bouget J.F., Claude S., Hirata T., Langlade A., Martin A.G., North B., 2000. Comparaison des performances d'élevage et de la vitalité de naissain d'huîtres creuses *C. gigas* en 3 sites du Morbihan. *Ifremer, Rapp. Intern.*, DRV/RA/RST 2000-14, 47 p.
- Mc Intyre A.D., 1969. Ecology of marine meiobenthos. *Biol. Rev.*, 44, 245-290.
- McClelland R.G., Pinder A.C., 1994. Detection of *Salmonella thyphimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4255-4262.
- McKinnon A.D., Trott L.A., Alongi D.M., Davidson A., 2002a. Water column production and nutrient characteristics in mangrove creeks receiving shrimp farm effluent. *Aquac. Res.*, 33, 55-73.
- McKinnon A.D., Trott L.A., Cappo M., Miller D.K., Speare P., Davidson A., 2002b. The trophic fate of shrimp farm effluent in mangrove creeks of North Queensland, Australia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 55, 655-671.
- McLennan A.G., Miller D., 1990. A biological role for the heat shock response in Crustaceans. *J. Therm. Biol.*, 15(1), 61-66.
- Mente E., Legeay A., Houlihan D., Massabuau J.C., 2003. Influence of oxygen partial pressures on protein synthesis in feeding crabs. *Am. J. Physiol.*, 284R, 500-510.
- Merchie G., Lavens P., Sorgeloos P., 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 155, 165-181.
- Mermoud I., Costa R., Ferré O., Goarant C., Haffner P., 1998. Syndrome 93 in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of the three major outbreaks. *Aquaculture*, 164, 323-335.
- Middleditch B.S., Missler S.R., Hines H.B., McVey J.P., Brown A., Ward D.G., Lawrence A.L., 1980. Metabolic profiles of penaeid shrimp: dietary lipids and ovarian maturation. *J. Chromatogr.*, 195, 359-368.
- Milton D.L., Hardman A., Camara M., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P., 1997. Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.*, 179, 3004-3012.
- Milton D.L., Norqvist A., Wolf-Watz H., 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, 174, 7235-7244.
- Milton D.L., Norqvist A., Wolf-Watz H., 1995. Sequence of a novel virulence-mediating gene, *virC*, from *Vibrio anguillarum*. *Gene*, 164, 95-100.
- Milton D.L., O'Toole R., Hörstedt P., Wolf-Watz H., 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, 178, 1310-1319.
- Mirto S., La Rosa T., Gambi C., Danovaro R., Mazzola A., 2002. Nematode community response to fish-farm impact in the Western Mediterranean. *Environ. Pollut.*, 116, 203-214.

- Mitchell G., Smith C., Makower M., Bird P.J.W.N., 1982. An economic appraisal of pig improvement in Great Britain. I. Genetic and production aspects. *Anim. Prod.*, 35, 215-224.
- Miyasaki T., Nozawa N., Kobayashi T., 2000. Clinical trial results on the use of recombinant feline interferon- $\omega$  to protect Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martenisii* from akoya-virus infection. *Dis. Aquat. Org.*, 43, 15-26.
- Miyazaki T., Taniguchi T., Hirayama J., Nozawa N., 2002. Receptors for recombinant feline interferon- $\omega$  in hemocytes of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martenisii*. *Dis. Aquat. Org.*, 51, 135-138.
- Mohney L.L., Lightner D.V., Bell T.A., 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquac. Soc.*, 25, 116-125.
- Monger B.C., Landry M.R., 1993. Flow cytometric analysis of marine bacteria with Hoechst 33342. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 905-911.
- Montanari M.P., Pruzzo C., Pane L., Colwell R.R., 1999. Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29(3), 241-247.
- Montero A.B., Austin B., 1999. Characterisation of extracellular products from an isolate of *Vibrio barveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, 22, 377-386.
- Moon-van der Staay S.Y., De Wachter R., Vaulot D., 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal new eukaryotic lineages. *Nature*, 409, 607-610.
- Morales J., Rodriguez J.M., Gertrudix L.J., Berrocal D., 1991. Evolution of some chemical characteristics of bottom soils from commercial shrimp ponds. I. Metals. In: *Aquaculture and the Environment*. De Pauw N. & Joyce J. (eds). European Aquaculture Society, Special publication N° 14, Bredene, Belgium, 221-222.
- Moreira D., Lopez-Garcia P., 2002. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends Microbiol.*, 10, 31-38.
- Moriarty D.J.W., 1985. Role of bacteria and meiofauna in the productivity of prawn aquaculture ponds. Proceedings of the first international conference on the culture of penaeid prawns/shrimps. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Philippines, 170 p.
- Moriarty D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.
- Moriarty D.J.W., Cook H.L., Hassan R.B., Thanabal M., 1987. Primary production and meiofauna in some penaeid prawn aquaculture ponds at Gelang Patah. *Malay. Agric. J.*, 54, 37-51.
- Morohashi M.T., Tsuchiya K., Mita T., Kawamura M., 1991. Identification of (Na, K) ATPase inhibitor in brine shrimp, *Artemia salina*, as long-chain fatty acids. *J. Comp. Physiol.*, 161B, 69-72.
- Morrison W.R., Smith L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5, 600-608.
- Moss S.M., Pruder G.D., Beber K.M., Wyban J.A., 1992. The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pondwater. *Aquaculture*, 101, 229-239.
- Mugnier C., Soyeux C., 2001. Effect of temperature decrease, hypoxia and molt stage on osmoregulatory capacity and survival in the penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: *Fifth international crustacean congress*, Melbourne 9-13 July, Australia, 107 p.
- Muñoz M., Vandenbulcke F., Garnier J., Bulet P., Guéguen Y., Saulnier D., Bachère É. (submitted). Structural characterization, cellular localization and expression profile of penaeidins from *Litopenaeus stylirostris* infected by *Vibrio penaeicida*. *J. Biol. Chem.*
- Muñoz M., Vandenbulcke F., Saulnier D., Bachère É., 2002. Expression and distribution of penaeidins antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *Eur. J. Biochem.*, 269, 2678-2689.
- Munsiri P., Boyd C.E., Teichert-Coddington D.R., Hajek F.B., 1996. Texture and chemical composition of soils from shrimp ponds near Choluteca, Honduras. *Aquac. Int.*, 4, 157-168.
- Munsiri P., Boyd C.E., Hajek, B.F., 1995. Physical and chemical characteristics of bottom soil profiles in ponds at Auburn, Alabama, USA and a proposed system for describing pond soil horizons. *J. World Aquac. Soc.*, 26(4), 346-376.
- Myrand B., Guderley H., Himmelman J.H., 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. *Maine Ecol. Prog. Ser.*, 197, 193-207.
- Naciri-Graven Y., Martin A.G., Baud J.P., Renault T., Gérard A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 224, 91-107.
- Nash G., Nithimathachoke C., Tungmandi C., Arkarjamorn A., Prathanpipat P., Ruamthaveesub P., 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R. (eds). *Diseases in Asian Aquaculture I*, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 143-155.
- Naylor R.L., Goldberg R.J., Mooney H., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Kautsky N., Lubchenco J., Primavera J.H., Williams M., 1998. Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. *Science*, 282, 883-884.
- Naylor R.L., Goldberg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H., Troell M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017-1024.
- Nell J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*, 210, 68-88.
- Nell J.A., Smith I.R., McPhee C.C., 2000. The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme: progress and goals. *Aquac. Res.*, 31, 45-49.
- Nelson D.W., Sommers L.E., 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: *Methods of soil analysis. II. Chemical and microbial Properties*. Page A.L., Miller R.H. & Keeney D.R. (eds). American Society of Agronomy, Madison, USA, 539-579.
- Nicolas J.L., Basuyaux O., Mazurié J., Thébault A., 2002. *Vibrio caribbeanus*, a pathogen of abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.*, 50, 35-43.
- Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R., Ansquer D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.*, 27, 67-76.

- Nilsson P., Sundbäck K., Jönsson B., 1993. Effect of the brown shrimp *Crangon crangon* L. on endobenthic macrofauna, meiofauna and meiofaunal grazing rate. *Neth. J. Sea Res.*, 31, 95-106.
- Nonnotte G., Aubree-Pelletier A., Colin D.A., 1987. Na<sup>+</sup> transport in perfused intestine and in isolated enterocytes of freshwater trout deprived of essential fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 66, 431-436.
- Norqvist A., Norrman B., Wolf-Watz H., 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.*, 58, 3731-3736.
- Norqvist A., Wolf-Watz H., 1993. Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheat antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.*, 61, 2434-2444.
- Oakey H.J., Owens L., 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio parvulus* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 702-709.
- OIE, 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases Third Ed.
- Ott M.E., Heisler N., Ultsch G.R., 1980. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67A, 337-340.
- Ottaviani E., Franchini A., Cassanelli S., Genedani S., 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell.*, 85, 87-91.
- Ottogalli L., Galinié C., Goxe D., 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* over ten generations in New Caledonia. *J. Aqua. Trop.*, 3, 111-125.
- Oubella R., Paillard C., Maes P., Auffret M., 1994. Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.*, 64, 33-39.
- Øvreås L., Bourne D., Sandaa R.A., Casamayor E.O., Benloch S., Goddard V., Smerdon G., Heldal M., Thingstad T.F., 2003. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 31, 109-121.
- Owens L., Haqshenas G., McElnea C., Coelen R., 1998. Putative spawner-isolated mortality virus associated with mid-crop mortality syndrome in farmed *Penaeus monodon* from northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 34, 177-185.
- Owens L., McElnea C., Snape N., Harris L., Smith M., 2003. Prevalence and effect of spawner-isolated mortality virus on the hatchery phases of *Penaeus monodon* and *P. merguensis* in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 53, 101-106.
- Paez-Osuna F., Guerrero-Galvan S.R., Ruiz-Fernandez A.C., 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico. *Mar. Pollut. Bull.*, 36, 65-75.
- Paillard C., Maes P., 1990. Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 310, 15-20.
- Paillard C., Maes P., Oubella R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 4, 219-240.
- Palacios E., Ibarra A.M., Ramirez J.L., Portillo G., Racotta I.S., 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in white Pacific shrimp (*Penaeus vannamei*), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquac. Res.*, 29, 183-189.
- Panko R.R., 2000. Two corpses of spreadsheet error. Proceedings of the thirty third Hawaii International Conference on System Sciences, Maui, Hawaii, January 2000.
- Parker M.S., Ourth D.D., 1999. Specific binding of human interferon gamma to particulates from hemolymph and protocerebrum of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122B, 155-163.
- Parker P.L., Anderson R.K., Lawrence A., 1989. A  $\delta^{13}C$  and  $\delta^{15}N$  tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond grow-out system. In: Stable isotopes in ecological research. Rundel P.W., Ehleringer J.R. & Nagy K.A. (eds), Springer-Verlag, New York, 288-303.
- Parrish C.C., Ackman R.G., 1985. Calibration of the Iatroscan-Chromarod system for marine lipid class analyses. *Lipids*, 20, 521-530.
- Pearson T.H., Rosenberg R., 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 16, 229-311.
- Pedersen K., Verdonck L., Austin B., Austin D.A., Blanch A.R., Grimont P.A.D., Jofre J., Kobravi S., Larsen J.L., Tiainen T., Vigneulle M., Swings J., 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* (Grimes *et al.*, 1984b) is a junior synonym of *Vibrio parvulus* (Baumann *et al.*, 1980). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 749-758.
- Penet L., Goyard E., Chim L., Cuzon G., Bureau D., Bédier E., Aquacop, 2001. Testing of two strains of *Penaeus stylirostris* after six generations of selection for growth and correlative responses on other traits. In: Books of Abstracts, World Aquaculture '2001, Lake Buena Vista, Florida, January 2001, p. 748.
- Perazzolo L.M., Gargioni R., Ogliari P., Barracco M.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress.
- Perdue J.A., 1983. The relationship between the gametogenic cycle of the Pacific oyster, *C. gigas*, and the summer mortality phenomenon in strains of selectively bred oysters. *Publ. Wash. Sea Grant. Washington Univ., (USA)*, WSG-TH-83-9.
- Pétard J., 1993. Les méthodes d'analyse. I. Analyses des sols. Notes techniques, laboratoire commun d'analyses 5. Orstom Nouméa.
- Phadtare S., Yamanaka K., Inouye M., 2000. The cold shock response. In: Bacterial stress responses. Storz G. & Hengge-Aronis R. (eds). ASM Press, 33-46.
- Phillips M.J., Kwein-Lin C., Beveridge M.C.M., 1993. Shrimp culture and the environment. Lessons from the world's most rapidly expanding warm water aquaculture sector. In: Environment and aquaculture in developing countries. Pullin R.S.V., Rosenthal H. & Maclean J.L. (eds). ICLARM Conf. Proc., 31, 171-197.
- Piechotta G., Lacorn M., Lang T., Kammann U., Simat T., Jenke H.S., Steinhart H., 1999. Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 42, 50-56.
- Platt H.M., Warwick R.M., 1980. The significance of free-living nematodes to the littoral ecosystem. In: The shore environment. II. Ecosystems. Price J.H., Irvine D.E.G. & Farnham W.F. (eds). Academic Press, London, 729-759.
- Platt T., Jassby A.D., 1976. The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 12, 421-430.



- Pougnard C., Catala P., Drocourt J.L., Legastelois S., Perin P., Pringuez E., Lebaron P., 2002. Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3102-3107.
- Prayitno S.B., Latchford J.W., 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. *Aquaculture*, 132, 105-112.
- Preston N.P., Jackson C.J., Thompson P.J., Austin M., Burford M.A., 2000. Prawn farm effluent: origin, composition and treatment. FRDC 95/162 Final Report, Fishing Industry Research and Development Corporation, Canberra, Australia. 71 p.
- Pruder G.D., 1987. Detrital and algal based food chains in aquaculture: a perspective. *In: Detritus and microbial ecology in aquaculture*. Moriarty D.J.W. & Pullin R.S.V. (eds), ICLARM Conf. Proc., Manila, Philippines, 14, 296-306.
- Rajalingham K., Chadwick D., Knight B., Edwards D., 2000. Quality control in spreadsheets: a software engineering-based approach to spreadsheet development. Proceedings of the thirty third Hawaii International Conference on System Sciences, Maui, Hawaii, January 2000.
- Randall D.J., 1970. Gas exchange in fish. *In: Fish physiology*. IV. Hoar W.S. & Randall D.J. (eds), London, Academic Press, 253-291.
- Ray W.M., Chien Y.H., 1992. Effects of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursery system. *Aquaculture*, 104, 231-248.
- Rees J.F., Curé K., Piyatiratitivorakul S., Sorgeloos P., Menasveta P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 122, 193-207.
- Reymond H., Lagardère J.P., 1990. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt marsh ponds: role of halophilic entomofauna. *Aquaculture*, 84(2), 125-143.
- Rikans L.E., Hornbrook K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1362(2-3), 116-127.
- Ringwood A.H., Connors D.E., Hogue J., 1998. Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 166, 163-171.
- Ritvo G., Dixon J.B., Lawrence A.L., Samocha T.M., Neill W.H., Speed F.M., 1998. Accumulation of chemical elements in Texas shrimp pond soils. *J. World Aquac. Soc.*, 29, 422-431.
- Ritvo G., Speed F.M., Neill W.H., Dixon J.B., Lawrence A.L., Samocha T.M., 1999. Regression analysis of soil chemical composition for two shrimp farms in Texas. *J. World Aquac. Soc.*, 30, 26-35.
- Roberts J.P., 2003. Flow cytometry. *The Scientist*, 17(9), 43-45.
- Robertson B.R., Button D.K., 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry*, 10, 70-76.
- Robertson B.R., Button D.K., Koch A.L., 1998. Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl. Environ. Microb.*, 64, 3900-3909.
- Rochelle J.M., Grossfeld R.M., Bunting D.L., Tylell M., Dwyer B.E., Xuc Z.Y., 1991. Stress protein synthesis by crayfish CNS tissue *in vitro*. *Neurochem. Res.*, 16, 533-542.
- Rojtinnakorn J., Hirono I., Itami T., Takahashi Y., Aoki T., 2002. Gene expression in haemocytes of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol.*, 13, 69-83.
- Roux M.M., Pain A., Klimpel K.R., Dhar A.K., 2002. The lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.*, 76(14), 7140-7149.
- Ruangpan L., Tabkaew R., Sangrungruang K., 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *In: Shariff M., Arthur J.R. & Subasinghe R.P. (eds). Diseases in Asian Aquaculture. II. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 141-149.
- Rubright J.S., Harell J.L., Holcomb H.W., Parker J.C., 1981. Responses of planktonic and benthic communities to fertilizer and feed applications in shrimp mariculture ponds. *J. World Maricult. Soc.*, 12, 281-299.
- Sanchez A., Pascual C., Sanchez A., Vargas-Albores E., Le Moullac G., Rosas C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198, 13-28.
- Sanchez M.P., Chevassus B., Labbé L., Quillet E., Mambrini M., 2001. Selection for growth of brown trout (*Salmo trutta*) affects feed intake but not feed efficiency. *Aquat. Living Resour.*, 14(1), 41-48.
- Sánchez-Páez H., 1994. Los manglares de Colombia. *In: El ecosistema de manglar en América Latina y la cuenca del Caribe: su manejo y conservación*. Suman D. (ed.). University of Miami & the Tinker Foundation, New York, 21-33.
- Sartoris E.J., Portner H.O., 1997. Increased concentrations of haemolymph Mg protect intracellular pH and ATP levels during temperature stress and anoxia in the common shrimp *Crangon crangon*. *J. Exp. Biol.*, 200, 785-792.
- Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J., 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 11, 173-186.
- Saulnier D., Avarre J.C., Le Moullac G., Ansquer D., Levy P., Vonau V., 2000b. Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Dis. Aquat. Org.*, 40, 109-115.
- Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D., 2000a. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191, 133-144.
- Sbordoni V., de Matthaeis E., Sbordoni M.C., La Rosa G., Mattoccia M., 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture*, 57, 239-251.
- Sellos D., Moal J., Dégremont L., Huvet A., Daniel J.Y., Nicoulaud S., Boudry P., Samain J.F., Van Wormhoudt A., 2003. Structure of the amylase genes in populations of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas*: tissue expression and allelic polymorphism. *Mar. Biotechnol.*, 5(2), 1-13.
- Sen G.C., 2001. Viruses and Interferons. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, 255-281.
- Servais P., Casamayor E.O., Courties C., Catala P., Parthuisot N., Lebaron P., 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33, 41-51.



- Servais P., Courties C., Lebaron P., Troussellier M., 1999. Coupling bacterial activity measurements with cell sorting by flow cytometry. *Microb. Ecol.*, 38, 180-189.
- Shelton G., Jones D.R., Milsom W.K., 1986. Control of breathing in ectothermic vertebrates. In: *Handbook of Physiology. II. Control of breathing*. Macklem P.R. & Mead J. (eds). American Physiological Society, Bethesda, MD, 857-909.
- Smith L.D., Coull B., 1987. Juvenile spot (Pisces) and grass shrimp predation on meiobenthos in muddy and sandy substrata. *J. Mar. Biol. Ecol.*, 105, 123-136.
- Smith P.T., 1996. Physical and chemical characteristics of sediments from prawn farms and mangrove habitats on the Clarence River, Australia. *Aquaculture*, 146, 47-83.
- Smith V.J., Johnston P.A., 1992. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C(3), 641-649.
- Smith V.J., Rarcliffe N.A., 1980. Cellular defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*: *in vivo* hemocytic and histopathological response to injected bacteria. *J. Invert. Pathol.*, 35, 65-74.
- SNI (Shrimp News International), 1997. World shrimp farming 1997. Rosenberry (ed.), San Diego, USA.
- Snieszko S.F., 1973. Diseases of fishes and their control in the US. In: *The two lakes fifth fishery management training course report*. Jansen, London, 55-66.
- Soletchnik P., Geairon P., Razet D., Goulletquer P., 1996. Physiologie de la maturation et de la ponte chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ifremer, Rapp. Intern., La Tremblade, DRV/RA, 27 p.
- Soletchnik P., Huver A., Le Moine O., Razet D., Geairon P., Faury N., Goulletquer P., Boudry P., 2002. Comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquat. Living Resour.*, 15(4), 243-250.
- Somero G.N., Yancey P.H., 1997. Osmolytes and cell volume regulation. In: *Physiological and evolutionary principles*. Hoffman J.F. & Jamieson J.D. (eds). Oxford University Press., 441-484.
- Song Y.L., Yu C.L., Lien T.W., Huang C.C., Linet M.N., 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 14, 317-331.
- Sonnenholzner S., Boyd C.E., 2000a. Chemical and physical properties of shrimp pond bottom soils in Ecuador. *J. World Aquac. Soc.*, 31(3), 358-375.
- Sonnenholzner S., Boyd C.E., 2000b. Vertical gradients of organic matter concentration and respiration rate in pond bottom soils. *J. World Aquac. Soc.*, 31(3), 376-380.
- Spann K.M., Donaldson R.A., Cowley J.A., Walker P.J., 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, 42(3), 221-225.
- Spees J.L., Chang S.A., Snyder M.J., Chang E.S., 2002. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. *Cell Stress Chaperones*, 7(1), 97-106.
- Sritunyaluksana K., Soderhall K., 2000. The proPO and clotting systems in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 53-69.
- Stafford C., 1999. A guide to phytoplankton of aquaculture ponds: collection, analysis and identification. Queensland Dep. of Primary Industries ed., Brisbane, Australia, 59 p.
- Staskawicz B.J., Mudgett M.B., Dangel J.L., Galan J.E., 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, 292, 2285-2289.
- Steffensen J.F., 2002. Metabolic cold adaptation of polar fish based on measurements of aerobic oxygen consumption: fact or artefact? *Comp. Biochem. Physiol.*, 132, 789-795.
- Sudheesh P.S., Xu H.S., 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*, 196, 37-46.
- Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 19, 111-118.
- Sultan Ali M.A., Krishna Murthy K., Prince Jeyaseelan M.J., 1983. Energy flow through the benthic ecosystem of the mangroves with special reference to nematodes. *Mahagasar*, 16, 317-325.
- Sunden S.L.F., Davis S.K., 1991. Evaluation of genetic variation in a domestic population of *P. vannamei* (Boone): a comparison with three natural populations. *Aquaculture*, 97, 131-142.
- Sung H.H., Hsu S.F., Chen C.K., Ting Y.Y., Chao W.L., 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquac. Res.*, 19, 101-110.
- Supungul P., Klinbunga S., Pichyangkura R., Jitrapakdee S., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A., 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol.*, 4, 487-494.
- Sweetman J.W., 1993. Perspectives and critical success factors in the present farming of fish. *Aquac. Eur.*, 18, 6-12.
- Tacon A.G.J., 1996. Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming systems. *Aquac. Nutr.*, 2(3), 165-174.
- Takahashi Y., Itami T., Nakagawa A., Nishimaru H., Abe T., 1985b. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51, 1639-1643.
- Takahashi Y., Shimomaya Y., Momoyama K., 1985a. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51, 721-730.
- Takeda T., 1990. Ventilation, cardiac output and blood respiratory parameters in the carp, *Cyprinus carpio*, during hyperoxia. *Respir. Physiol.*, 81, 227-240.
- Tanguy A., Boutet I., Bonhomme F., Boudry P., Moraga D., 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of metal exposure. *Biomarkers*, 7(6), 439-450.
- Taylor E.W., 1982. Control and coordination of ventilation and circulation in crustaceans: responses to hypoxia and exercise. *J. Exp. Biol.*, 100, 289-319.
- Taylor E.W., Butler P.J., 1978. Aquatic and aerial respiration of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15°C. *J. Comp. Physiol.*, 151, 185-190.
- Teichert-Coddington D.R., Rodriguez R., Toyofuku W., 1994. Cause of cyclic variation in Honduras shrimp production. *World Aquac.*, 25(1), 57-61.

- Teichert-Coddington D.R., Rouse D.B., Potts A., Boyd C.E., 1999. Treatment of harvest discharge from intensive shrimp ponds by settling. *Aquac. Eng.*, 19, 147-161.
- Tenore K.L., Corral J., Gonzalez N., 1985. Effects of intense mussel culture on food chain patterns and production in coastal Galicia, NW Spain. *In: Proceedings of the international symposium on utilization of coastal ecosystems: planning, pollution and productivity*. Chao N.L. & Kirby-Smith W. (eds). Furg, Rio Grande, Brazil, 321-328.
- Thingstad T.F., Høidal M., Bratbak G., Dunda I., 1993. Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trends Ecol. Evol.*, 8, 209-213.
- Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W., 1990. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxidases in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1045, 252-260.
- Thompson F.L., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Swings J., 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst. Appl. Microbiol.*, 24, 520-538.
- Thompson F.L., Thompson C.C., Li Y., Gomez-Gil B., Vandenberghe J., Hoste B., Swings J., 2003a. *Vibrio kanaluae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 753-759.
- Thompson F.L., Thompson C.C., Swings J., 2003b. *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*, 26, 65-69.
- Tidwell J.H., Schulmeister G., Mahl C., Coyle S., 1997. Growth, survival, and biochemical composition of freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* fed natural food organisms under controlled conditions. *J. World Aquac. Soc.*, 28(2), 123-132.
- Timasheff S.N., 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 67-97.
- Tossi A., Sandri L., 2002. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr. Pharm. Des.*, 8, 743-761.
- Tran D., Boudou A., Massabuau J.C., 2000. Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.*, 78, 2027-2036.
- Tréguer P., Le Corre P., 1975. Manuel d'analyses des sels nutritifs dans l'eau de mer. II. Utilisation de l'autoanalyseur. *Technicon R. Rapport L'BO*, 110 p.
- Troussellier M., Bouvy M., Courties C., Dupuy C., 1997. Variation of carbon content among bacterial species under starvation condition. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13, 113-119.
- Troussellier M., Courties C., Lebaron P., Servais P., 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29, 319-330.
- Troussellier M., Courties C., Vaquer A., 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell*, 78, 111-121.
- Troussellier M., Courties C., Zettlmaier S., 1995. Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: Fixation and storage effects. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 40, 621-633.
- Truchot J.P., 1987. Comparative aspects of extracellular acid-base balance. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 248 p.
- Truchot J.P., 1992. Respiratory function of arthropod hemocyanin. *In: Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Vol. 13. Mangum C.P. (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag., 377-410.
- Tubiash H.S., Chanley P.E., Leifson E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.*, 90, 1036-1044.
- Turek Z.F., Kreuzer F., Ringnald B.E.M., 1978. Blood gases at several levels of oxygenation in rats with a left-shifted blood oxygen dissociation curve. *Pflügers Arch.*, 376, 7-13.
- Van de Braak C., Botterblom M., Taverne N., van Muiswinkel W., Rombout J., van der Knapp W., 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol.*, 13(4), 293-309.
- Van Ham E.H., Hall M.R., 1998. The effects of prophylactic formalin bath treatment on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquac. Soc.*, 29(3), 357-363.
- Vandenberghe J., Verdonck L., Robles-Arozarena R., Rivera G., Bolland A., Balladares M., Gomez-Gil B., Calderon J., Sorgeloos P., Swings J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2592-2597.
- Vanderkooi J.M., Erecinska M., Silver I.A., 1991. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am. J. Physiol.*, 260C, 1131-1150.
- Vargas-Albores F., Guzman M.A., Ochoa J.L., 1993. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B, 407-413.
- Vargas-Albores F., Hernandez-Lopez J., Gollas-Galvan T., Montano-Perez K., Jimenez-Vega F., Yepiz-Plascencia G., (eds), 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products *In: Advances in shrimp biotechnology*. Flegel T.W. (ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 161-163.
- Vargas-Albores F., Yepiz-Plascencia G., 2000. Beta-glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191, 13-21.
- Varshney P.K., 1985. Meiobenthic study off Mahin (Bombay) in relation to prevailing organic pollution. *Mah. Bull. Natl. Inst. Oceanogr.*, 18, 27.
- Vaulot D., Courties C., Partensky F., 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*, 10, 629-636.
- Vaulot D., Romari K., Not E., 2002. Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends Microbiol.*, 10, 266-267.
- Veldhuis M.J.W., Kraay G.W., Van Bleijswijk J.D.L., Baars M.A., 1997. Seasonal and spatial variability in phytoplankton biomass, productivity and growth in the northwestern Indian Ocean (the SW- and NE-monsoon, 1992-1993). *Deep-Sea Res. I*, 44, 425-449.
- Venkateswaran K., Kim S.W., Nakano H., Onbé T., Hashimoto H., 1989. The association of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes with zooplankton and its relationship with bacterial indicators of pollution. *Syst. Appl. Microbiol.*, 11, 194-201.

- Vidal O.M., Granja C.B., Aranguren F., Brock J.A., Salazar M., 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, 32(4), 364-372.
- Vonau V., Ohresser M., Bierné N., Delsert C., Beuzart I., Bédier E., Bonhomme F., 1999. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Anim. Genet.*, 30, 234-235.
- Voorter, C.E.M., Wintjes J., Bloemendal H., de Jong W.W., 1992. Relocalization of alpha-beta-crystallin by heat shock in ovarian carcinoma cells. *FEBS Lett.*, 309, 111-114.
- Vranken G., Heip C., 1986. The productivity of marine nematodes. *Ophelia*, 26, 429-442.
- Wabete N., 2002. Étude physiologique des besoins métaboliques des crevettes pénelides (*Penaeus japonicus* et *Litopenaeus stylirostris*). Caractérisation des problèmes d'osmorégulation associés à la manipulation. DES Sciences Naturelles, université de Bordeaux I, 28 p.
- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L., Marissal E., Berthe F., 2002. Caractérisation de bactéries pathogènes de naissains d'huître creuse *C. gigas*. *C.R. Biologies*, 325, 1-8.
- Wajsbrodt N., Gasith A., Krom M.D., Samocho T.M., 1990. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 497-504.
- Walker P.J., Cowley J.A., Spann K.M., Hodgson R.A., Hall M.R., Withyauchumnarnkul B., 2001. Yellow head complex viruses: transmission cycles and typo-geographical distribution in the Asia-Pacific region. *In: The new wave. Proceedings of the Special Session of Sustainable Shrimp Culture*. Browdy C.L. & Jory D.E. (eds). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 292-302.
- Wang J.K., 1990. Managing shrimp pond water to reduce discharge problems. *Aquac. Eng.*, 9, 61-73.
- Warwick R.M., 1993. Environmental impact studies on marine communities: pragmatical considerations. *Austr. J. Ecol.*, 18, 63-80.
- Wedderburn J., Cheung V., Bamber S., Bloxham M., Depledge M.H., 1998. Biomarkers of biochemical and cellular stress in *Carcinus maenas*: an *in situ* field study. *Mar. Environ. Res.*, 46, 321-324.
- Weil L.S., Barry T.P., Malison J.A., 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, 193, 373-380.
- Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 61, 7213-7218.
- Weppe M., Bonami J.R., Lightner D.V., Aquacop, 1992. Demonstration de altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (SPR 43) resistente al virus IHNV. *In: Memorias del Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*. CENAIM, November 1992, Guayaquil, Ecuador, 229-232.
- Werner I., Nagel R., 1997. Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthrene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2392-2402.
- Wheatly M.G., Henry R.P., 1987. Branchial and antennal gland Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of euryhaline crayfish *Pacifastus leniusculus*. *J. Exp. Biol.*, 133, 73-86.
- Wiens M., Kuuskalu A., Kelve M., Werner E.G., Muller W.E.G., 1999. Origin of the interferon-inducible (2'-5') oligo-adenylate synthetases: cloning of the (2'-5') oligo-adenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *FEBS Lett.*, 462, 12-18.
- Wirth R., Muscholl A., Wanner G., 1996. The role of pheromones in bacterial interactions. *Trends Microbiol.*, 4, 96-102.
- Wohlfarth G.W., Hulata G., 1989. Selective breeding of cultivated fish. *In: Fish culture in warm water systems: problems and trends*. Shilo M. & Sarig S. (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 21-63.
- Wyban J., Swingle J., 1999. Selective breeding for fast growth and Taura syndrome resistance in high health *P. vannamei*. *In: Book of abstracts, WAS 1999, Sydney, Australia*.
- Wyban J., Walsh W.A., Godin D.M., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138, 267-279.
- Xu X.L., Ji W.J., Castell J.D., O'Dor R.K., 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*, 119, 359-370.
- Yancey P.H., 2001. Nitrogen compounds as osmolytes. *In: Fish Physiology*. Wright P. & Anderson P. (eds). Academic Press, 309-334.
- Yang Y., Poncet J., Garnier J., Zatylny C., Bachère É., Aumelas A., 2003. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.*, 278, 36859-36867.
- Yoganandhan K., Thirupathi S., Sahul-Hameed A.S., 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221, 1-11.
- Young J.C., Moarefi I., Ulrich Hartl E., 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Biol. Chem.*, 154, 267-273.
- Yu Z., Zhang Z., 1994. A study on the abundance of meiofauna in shrimp culture pond. *J. Ocean Univ. Qingdao*, 24(4), 519-526.
- Yura T., Kanemori M., Morita M.T., 2000. The heat shock response: regulation and function. *In: Bacterial stress responses*. Storz G. & Hengge-Aronis R. (eds). AMS Press, 3-18.
- Zarate J., Bradley T.M., 2003. Heat-shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture*, 223(1-4), 175-187.
- Zhang F.H., He Y., Qi L., Sun L., 1997. Studies on the restoration of cultured bay scallop *Argopecten irradians* through reintroduction of broodstock. *Oceanol. Limnol. Sin.*, 28(2), 146-152.
- Zubkov M.V., Sleigh M.A., Burkill P.H., 2000. Assaying picoplankton distribution by flow cytometry of underway samples collected along a meridional transect across the Atlantic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21, 13-20.
- Zurbug W., Smaal A., Héral M., Dankers N., 1994. Season dynamics and bivalve feeding in the bay of Marennes-Oléron (France). *Neth. J. Aquat. Ecol.*, 28, 459-466.



Réalisation, mise en page: XLC (02 98 30 50 07)

Achévé d'imprimer sur les presses de Cloître Imprimeurs

ISSN 0761-3962

ISBN 2-84433-134-3 / Dépôt légal 3<sup>e</sup> trimestre 2004

© 2004, Ifremer. Tous droits de reproduction, même partielle, par quelque procédé que ce soit, sont réservés pour tous pays.



## Styli 2003

### Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie

Le colloque « Styli 2003 » s'est tenu en Nouvelle-Calédonie en juin 2003. Il avait pour objectif de présenter les acquis scientifiques des différentes disciplines concernées par cette aquaculture : écologie des bassins, pathologie, physiologie, immunologie, nutrition et génétique. La participation d'une quinzaine de spécialistes extérieurs à la Nouvelle-Calédonie ainsi que la présence des partenaires de la filière ont permis, avec les chercheurs localement engagés dans ces recherches, d'entreprendre une réflexion critique sur les orientations du programme Désans (Défi Santé Stylirostris), programme dont ce colloque était l'évènement fondateur.

**Mots-clés :** Aquaculture marine, crevettes, Nouvelle-Calédonie, écologie, pathologie, physiologie.

## Styli 2003

### Thirty years of shrimp farming in New Caledonia

The conference « Styli 2003 » was held in June 2003 in New Caledonia. It examined research results in the fields related to this aquaculture: pond ecology, pathology, physiology, immunology, nutrition and genetics. The presence of industrial, institutional and scientific (local and outside) partners of the shrimp industry provided an opportunity to discuss the orientations of a new multidisciplinary project (Desans, Défi Santé Stylirostris) devoted to the understanding of shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) health in ponds.

**Keywords:** Mariculture, penaeids, New Caledonia, ecology, pathology, physiology.



Ifremer

actes de colloques

# 38

Éditions Ifremer

BP 70, F-29280 Plouzané  
tél. 33 (0)2 98 22 40 13  
fax 33 (0)2 98 22 45 86  
mél : editions@ifremer.fr

DIFFUSION :

Vente par correspondance :

INRA Éditions  
RD 10, F-78026 Versailles

Codex  
tél. 33 (0)1 30 83 34 06  
fax 33 (0)1 30 83 34 49  
mél :

INRA-Editions@versailles.inra.fr

Libraires et assimilés :

ALT Brest  
Service Logistique  
3, rue Edouard Belin - BP 23  
F-29801 Brest Cedex 9  
tél. 33 (0)2 98 02 42 34  
fax 33 (0)2 98 41 49 43  
mél :  
logistique.brest@alt-sa.com

ISBN 2-84433-134-3  
ISSN 0761-3962

45 €



9 782844 331342