



Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris*: Étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et de la reproduction

Emilie Cardona

► To cite this version:

Emilie Cardona. Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris*: Étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et de la reproduction. Zoologie des invertébrés. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2015. Français. NNT : 2015NCAL0001 . tel-02942509

HAL Id: tel-02942509

<https://unc.hal.science/tel-02942509>

Submitted on 18 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE NOUVELLE-CALÉDONIE

ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE (ED 469)

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

ÉMILIE CARDONA

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Nouvelle-Calédonie

Discipline : Biologie des organismes

Spécialité : Physiologie des organismes marins

Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris* : Étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et de la reproduction

Soutenue le 4 mars 2015 à l'Université de Polynésie française

Directeur de thèse : Liêt CHIM

Co-directeur de thèse : Laurent WANTIEZ

Travail réalisé à l'Ifremer dans l'unité de recherche « Ressources marines en Polynésie française » et l'unité de recherche « Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture durable en Nouvelle-Calédonie »

MEMBRES DU JURY

Mr Ilie RACOTTA, Directeur de recherche, CIBNOR, Mexique

Mr Grant VANDENBERG, Professeur, Université Laval, Canada

Mme Chantal CAHU, Directrice de recherche, Ifremer, Polynésie française

Mme Nabila GAERTNER-MAZOUNI, Professeur, Université de Polynésie française

Mr René GALZIN, Professeur, CNRS-EPHE Criobe, Polynésie française

Mr Denis SAULNIER, Cadre de recherche, Ifremer, Polynésie française

Mr Liêt CHIM, Directeur de recherche, Ifremer, Nouvelle-Calédonie

Mr Laurent WANTIEZ, Maître de conférences, Université de Nouvelle-Calédonie

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur

Co-directeur

Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris* : Étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et de la reproduction

Le biofloc est un système d'élevage intensif avec un faible renouvellement d'eau ; ainsi se développe une population diversifiée de micro-organismes (micro-algues, zooplanctons et bactéries) associée à de la matière organique qui forme les floculats. Ces derniers jouent le double rôle de filtre biologique et de complément alimentaire. Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre le fonctionnement de ce système d'élevage et ses interactions avec la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Dans cet objectif général s'inscrivent deux objectifs plus spécifiques : (i) mesurer les gains zootechniques apportés par l'élevage en biofloc (ii) étudier les interactions trophiques entre le milieu d'élevage et la crevette en lien avec les performances zootechniques. Nos résultats montrent des gains relatifs de l'élevage en biofloc aux niveaux de la survie, de la croissance, des performances de reproduction des femelles et de la qualité de leur progéniture. Ces meilleures performances s'expliquent par la contribution de la productivité naturelle, estimée entre 37 et 40%, dans l'alimentation de la crevette. Ce complément d'aliment, outre d'être toujours disponible dans le milieu d'élevage, apporte de l'énergie, des nutriments et des molécules bioactives. L'aliment naturel représente une source nutritive de lipides, particulièrement riche en phospholipides et en acides gras polyinsaturés, qui sont essentiels pour la reproduction et le développement des larves en phase de lécitotrophie ; ces lipides sont accumulés dans la glande digestive et les œufs des femelles élevées en biofloc. L'aliment naturel est également une source de glutathion, puissante molécule antioxydante, qui contribue au renforcement du système des défenses anti-radicalaires de la crevette et protège les lipides insaturés de la peroxydation, une cause du stress oxydant. Les bactéries sont prépondérantes dans la productivité naturelle d'un élevage en biofloc et contribuent donc à l'alimentation de la crevette. Aussi, dans le dernier volet de cette thèse, nous avons caractérisé la diversité taxonomique et l'abondance des bactéries du milieu d'élevage et montré son influence sur le microbiote intestinal des crevettes. De façon générale, nous observons une meilleure santé des animaux élevés en biofloc qui se traduit par une régulation positive des gènes impliqués dans l'immunité et les défenses anti-radicalaires après un stress au peroxyde d'hydrogène. Ainsi, les effets positifs de l'élevage en biofloc sur les survies, les croissances et la reproduction ont pour origine le complément d'aliment apporté par la productivité naturelle.

Mots clés : Biofloc, crevette, nutrition, stress oxydant, défenses antioxydantes, immunité, reproduction, œufs, larves, bactéries, microbiote.

Influence of trophic environment in biofloc rearing on the physiological performances of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Study of parameters of nutrition, immunity and reproduction

Biofloc is an intensive rearing system with zero or minimal water exchange where a diverse population of microorganisms (microalgae, zooplankton and bacteria) develops in association with organic matter to form the floc particles. These particles play the double role of biological filter and dietary supplement. This dissertation aims to better understand the process of this rearing system and its interactions with the *Litopenaeus stylirostris* shrimp. Two specific objectives were integrated within the framework of this general objective: (i) to measure the production gain from biofloc rearing and (ii) to study the interaction between biofloc environment and shrimp and to assess its role on production performances of shrimps. Thus, our results show production gains of shrimp reared in biofloc in terms of survival, growth, reproductive performances and quality of larvae. This better performance can be explained by the contribution of natural productivity, estimated between 37 and 40%, in shrimp food. This food supplement, constantly available in the environment, provides energy, nutrients and bioactive molecules. The natural productivity represents a source of lipids, in particular of phospholipids and polyunsaturated fatty acids, which were essential for the reproduction and development of larvae during the lecitotrophic stage; these lipids were accumulated in digestive gland and eggs from females reared in biofloc. The natural food is also a glutathione source, a powerful antioxidant molecule, which contributes to strengthen antioxidant defense system of shrimps and protects lipids against peroxidation, a cause of oxidative stress. Bacteria were dominant in natural productivity of biofloc environment and contribute to shrimp food. Thus, in the last part of this dissertation, we characterized the taxonomic diversity and abundance of bacteria in biofloc environment and showed their influence on shrimp intestinal microbiota. Generally, we observed a better health of biofloc resulting in up-regulation of the studied genes involved in immunity and anti-radical defenses after oxidative stress with hydrogen peroxide. The positive effects of biofloc rearing on survival, growth and reproduction originate from food complement provided by natural productivity.

Key words: Biofloc, shrimp, nutrition, oxidative stress, antioxidant defences, immunity, reproduction, eggs, larvae, bacteria, microbiota.

Remerciements

Je remercie en premier lieu les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie Ilie Racotta et Grant Vandenberg pour avoir accepté d'en être les rapporteurs et également Benoit Beliaeff, René Galzin, Nabila Gaertner-Mazouni et Denis Saulnier pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tout particulièrement Liet Chim, qui m'a permis de réaliser cette thèse et de m'avoir fait confiance depuis plusieurs années jusqu'à l'achèvement de ce travail. Je te remercie pour ton soutien, ton accompagnement et encadrement, et tout ton temps consacré à la réussite de cette thèse.

Je tiens à remercier Laurent Wantiez pour avoir accepté de codiriger cette thèse et pour sa gentillesse, son humour et sa disponibilité.

J'adresse mes remerciements à Marc Taquet, Lionel Loubersac, André Carpentier et Thierry Laugier pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Cette thèse, je la dois en grande partie à deux personnes, Bénédicte et Claire. Je remercie sincèrement Bénédicte pour m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Tu as été présente à chaque moment, au moment des échecs comme des réussites. La charge de travail était parfois considérable mais tu n'as jamais flanché, toujours là. On en a vécu des épreuves et des fous rires... Je remercie Claire Geffroy pour son soutien inconditionnel, sa foi en moi, ses heures consacrées aux expérimentations qui finalement n'ont pas abouti, ses moments partagés à la coloc'... Je vous remercie toutes les deux pour ses heures passées ensemble à faire de la zootechnie, de la plomberie, du recouvrement, de la pêche à la crevette, des dissections, des rations de mélasses et d'aliments, des paniers et même à s'entraîner pour éteindre des feux... Tous ces moments passés avec vous deux resteront mes meilleures moments de cette thèse.

Un immense merci à Denis Saulnier pour m'avoir aiguillé vers des chemins hors de mon sentier me permettant ainsi d'aborder des sujets passionnants que je n'aurais jamais pensé à ma portée sans son aide. Je te remercie pour ta grande implication dans ma thèse, tes conseils et ta bonne humeur.

Je remercie sincèrement Yannick Gueguen. Merci pour avoir toujours tout fait pour que cette thèse se réalise dans les meilleures conditions possibles, d'avoir veillé à que je ne manque de rien, de m'avoir soutenue jusqu'au bout de cette aventure. Tes conseils, tes critiques et le temps que tu m'as accordé ont été précieux et m'ont beaucoup apporté.

Un grand merci à Chantal Cahu pour son aide, ses conseils et son soutien au cours de cette thèse.

Je remercie l'équipe du CTA de Tahiti : Benoit pour m'avoir donné la chance de réaliser un nombre inconsiderable d'expérimentations réalisées à Tahiti, de son soutien, de son aide et de sa foi dans le biofloc ; Carine et Jean-Mi pour leur amitié, leur soutien, leur aide et leur intérêt pour mon travail et je n'oublie pas Tainui pour son soutien logistique, son ingéniosité et sa gentillesse ainsi que l'équipe poisson.

Je remercie Pierrette, qui en plus de m'avoir encadré et formé, a pris soin de moi comme une maman l'aurait fait. Je remercie Jeannot, un des membres à l'origine de cette thèse, qui a tout fait pour qu'une partie de la thèse se réalise à Tahiti, merci également pour ton soutien et ton aide, notamment en éclosion. Je remercie Ngoc et Trung pour ces heures passées ensemble à la station et pour m'avoir fait découvrir leur culture vietnamienne.

Je remercie mes collègues de Tahiti pour avoir rendu cette thèse vraiment sympathique: Oïhana, Kevin, Vaihiti, Julie, Carole, Jo, Yann, Agnès, Corinne, Peva,... et j'en oublie sûrement. Un merci particulier à Kevin pour sa précieuse aide dans les analyses et dissections, à Julie pour les coups de mains donnés lors des dissections et de la rédaction, Vai et Agnès pour les corrections qu'elles ont apportées à mon manuscrit et enfin Yann pour sa présence et son aide lors des analyses statistiques.

Je tiens à remercier particulièrement Gilles Le Moullac pour sa disponibilité, ses conseils et critiques qui m'ont énormément apportés surtout en cette fin de thèse qui n'a pas toujours été facile.

Merci à l'équipe Ifremer crevette de Tahiti, René, Stanley, Robert pour les coups de mains donnés lors des transferts, des cycles en éclosion et autres...

Je remercie l'équipe d'Ifremer de Nouvelle-Calédonie et particulièrement Aline, Marie Madeleine et Karl pour leur aide précieuse en laboratoire, Jacky pour sa participation aux séries de dissection, Flo et Sophie C pour ses très bons moments passés ensemble, Viviane pour ses nombreux conseils, Nelly, Domi, Babass, Matehau, Tatane, Thierry, Jean René, Jean Marie, Francis, Eugénie, Benoit, Karen... Un grand merci à tous pour leur aide, disponibilité et gentillesse.

Je tiens à remercier particulièrement Pierre Brun pour son soutien, sa générosité, sa sympathie et son affection.

Je remercie l'équipe de la DRMM, Moana pour sa participation dans la réalisation des manip et dans mon comité de thèse et Rarahu pour son aide dans l'analyse des bactéries.

Je remercie l'équipe du CTA de Nouvelle-Calédonie : Thomas pour avoir toujours considéré ma thèse comme importante et je remercie également toute son équipe et spécialement Sarah, pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie Pierre Richard et Gaël Guillou pour leur accueil au sein de leur laboratoire, leur aide et conseil pour la réussite de mes analyses isotopiques.

Merci à l'équipe de Brest, Hervé, Chantal et Fabrice pour leur aide dans la réalisation d'analyses des acides gras.

Merci aux filles de la cellule bio-info de Brest, Fanny et Laure, pour leur aide et pédagogie pour les analyses bio-informatiques.

Merci à l'équipe du laboratoire ACOBIOM, David Piquemal, Fabien Pierrat et Florent Noguier, pour leur collaboration.

Un grand merci aux stagiaires ayant contribué de près ou de loin à cette thèse : Clément, Matthieu, Sophie, Eléonore, Jaimee...

Un grand merci à mes parents et mes sœurs...

A Heifara pour m'avoir supportée, réconfortée, encouragée... un soutien sans faille tout au long de cette aventure.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux.....	2
Partie I - Introduction générale.....	3
1. Contexte de la crevetticulture	4
1.1 Situation de l'aquaculture mondiale	4
1.2 Situation de la crevetticulture mondiale	5
1.3 Panorama des systèmes de production	6
1.4 Les pathologies	7
1.5 Contexte Calédonien	8
1.6 Contexte Polynésien	10
2. Le modèle biologique : <i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson, 1874)	12
2.1 Systématique	12
2.2 Origine et distribution	12
2.3 Morphologie externe	13
2.4 Cycle biologique.....	14
2.5 Mue et croissance.....	16
2.6 Nutrition	16
2.7 Le microbiote intestinal	21
2.8 Immunité	23
2.9 Défenses anti-radicalaires et stress oxydant	26
2.10 Reproduction	28
3. Technologie d'élevage en biofloc.....	30
3.1 Principe de l'élevage en biofloc.....	30
3.2 Applications du système en biofloc à l'élevage de la crevette.....	30
3.3 Caractéristique et composition du biofloc	33
3.4 Biofloc et nutrition de la crevette.....	35
3.5 Biosécurité et santé de la crevette des élevages en biofloc.....	37
3.6 Biofloc et reproduction.....	38
4. Contexte, objectifs et démarche de la thèse	39
4.1 Intitulé de la thèse et encadrement	39
4.2 Présentation des sites d'accueil.....	39
4.3 Contexte de la thèse	42
4.4 Objectif et démarche de la thèse	44
Partie II - Influence de l'élevage en biofloc sur la nutrition, les défenses immunitaires et anti-radicalaires de la crevette <i>Litopenaeus stylirostris</i>	46
Introduction.....	47

Article 1: Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (<i>Litopenaeus stylirostris</i>) reared in biofloc: assessment by C and N stable isotope ratios and digestive enzymes gene expression and activity.	49
Highlights	49
Abstract.....	49
1. Introduction	50
2. Material and methods	51
3. Results.....	57
4. Discussion	61
5. Conclusion.....	65
Acknowledgements	65
References	65
Article 2: Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in <i>Litopenaeus stylirostris</i> shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress	69
Highlights	69
Abstract.....	69
1. Introduction	70
2. Materials and method	71
3. Results.....	74
4. Discussion	76
5. Conclusion.....	79
Acknowledgements	79
References	79
Conclusion	84
Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de <i>L. stylirostris</i> et aux réserves lipidiques des œufs : influence sur la reproduction et la survie des larves produites	86
Introduction.....	87
Article 3: The biofloc rearing technology improves the reproductive performance and the antiradical status of the shrimp <i>L. stylirostris</i> broodstock and eggs	89
Highlights	89
Abstract.....	89
1. Introduction	90
2. Materials and methods.....	92
3. Results.....	98
4. Discussion	103
5. Conclusion.....	106
Acknowledgements	106
References	106

Article 4: Biofloc contributions to antioxidant defence status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> : consequences for the quality of eggs and larvae	111
Highlights	111
Abstract.....	111
1. Introduction	112
2. Material and methods	113
3. Results.....	119
4. Discussion	126
5. Conclusion.....	131
Acknowledgements	131
References	131
Conclusion	136
Partie IV – L’environnement bactérien du biofloc : influence sur le microbiote intestinal de la crevette	138
Introduction.....	139
Article 5: Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> in biofloc system.....	141
Highlights	141
Abstract.....	141
1. Introduction	142
2. Materials and methods.....	142
3. Results and discussion	145
4. Conclusion.....	153
Acknowledgements	153
References	153
Conclusion	156
Partie V - Synthèse générale et perspectives	158
1. Synthèse des résultats.....	160
1.1 Influence de l’élevage en biofloc sur la survie, la croissance et la reproduction de la crevette <i>Litopenaeus stylirostris</i>	160
1.2 Relation trophique entre le milieu d’élevage et la crevette.....	162
2- Perspectives	164
2.1 Perspectives de recherche sur les interactions entre le milieu d’élevage et la crevette	164
2.2 Perspectives de recherche sur les communautés bactériennes du milieu d’élevage et de la crevette	166
Bibliographie	168

Liste des figures

Figure I-1 : Production mondiale de la pêche de capture et de l'aquaculture.	4
Figure I-2 : Evolution comparée de la production mondiale de crevettes par les pêches et l'aquaculture. 6	
Figure I-3 : Evolution de la production et de l'exportation de crevettes en Nouvelle – Calédonie.....	9
Figure I-4 : Evolution de la production de crevettes en Polynésie française.....	10
Figure I-5 : Répartition de <i>Litopenaeus stylirostris</i>	13
Figure I-6 : Morphologie externe d'une crevette Pénéide.	14
Figure I-7 : Cycle biologique des crevettes en mer.	15
Figure I-8 : Appareil digestif d'une crevette Pénéide.	17
Figure I-9 : Système circulatoire ouvert des crevettes Pénéides.	24
Figure I-10 : Représentation schématique du système immunitaire non spécifique de la crevette.....	26
Figure I-11 : Dimorphisme sexuel chez <i>Litopenaeus stylirostris</i>	29
Figure I-12 : Représentation schématique du fonctionnement d'un système d'élevage en biofloc.....	31
Figure I-13 : Illustrations des différents systèmes d'élevage en biofloc.....	32
Figure I-14 : Présentation des deux sites de réalisation de la thèse et des zones expérimentales utilisées	41
Figure II-1: Carbon (A) and Nitrogen (B) isotopic changes in muscle of shrimp according treatments: CW, BU or BF.	59
Figure II-2: Evolution of trypsin (A) and α -amylase (B) activities over the course of the feeding trial.	61
Figure II-3: Evolution of trypsin (A) and α -amylase (B) relative expression levels over the course of the feeding trial.	62
Figure II-4: Expression profiles of genes coding for the antioxidant enzymes Super oxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX) and Glutathione transferase (GSHT) in animals under both conditions before (BS) and after stress (AS).	75
Figure II-5: Expression profiles of genes coding for AMPs, Lysozyme (Lyso), Peneaidin 2 and 3 (Pen 2 and Pen 3) and Crustin (Cru) in animals from both conditions before (BS) and after stress (AS).	76
Figure III-1: Summary of experimental design.	95
Figure III-2: Evolution of cumulative relative spawning rates from eyes talk ablation (*) for 100 females per treatment (EEP and BFT) including all spawns (A) and according spawning rank 1 (B), spawning rank 2 (C) and spawning rank 3 (D).	100
Figure III-3: Star plot representation of oxidative status and antioxidant defenses in the digestive gland of broodstock before (A) and after reproduction period (B).	101
Figure III-4: Evolution of cumulative spawning rates after eyestalk ablation (*) for 75 females per treatment (CW and BFT), including all spawns (A) and according to spawning rank 1 (B) or spawning rank 2 (C).	123
Figure IV-1: Evolution of NO_2^- -N, NH_4^+ -N and Chlorophyll a concentrations over course of both rearing systems.	147
Figure IV-2: Relative abundance evolution of the five major taxa over course of rearing in BFT.	147
Figure IV-3: Venn diagram showing the unique and shared OTUs (3% of distance level) in the different libraries: BFT and CW intestines, BFT and CW water.	151
Figure IV-4: Non-metric multidimensional scaling (MDS) plot using the Bray-Curtis coefficient of pyrosequencing results associated with intestines and water samples from CW or BFT conditions after 35 days of rearing.	152
Figure V-1 : Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette <i>Litopenaeus stylirostris</i>	165

Liste des tableaux

Table I-1 : Typologie des différents systèmes d'élevage de crevette.	7
Table I-2 : Classification taxonomique de l'espèce <i>Litopenaeus stylirostris</i>	12
Table I-3 : Composition biochimique du biofloc selon différents auteurs.....	36
Table II-1: Composition of experimental diet.	52
Table II-2: Primers used for quantitative RT-PCR assay of <i>Litopenaeus stylirostris</i> trypsin, α -amylase, elongation factor 1- α and Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.	56
Table II-3: Final survival rate, Growth rate, final weight and weight gain at the end of the grow-out period in the both experiments.	58
Table II-4: Isotopic value ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and Carbon and nitrogen percentage in the two nutritional sources.....	58
Table II-5: Means values of α -amylase and trypsin relative expression levels and specific enzymatic activities for the three treatments (experiment 2).	60
Table II-6: PCR primers (F: Forward, R: Reverse) used to amplify antimicrobial peptides (Pen3, Pen2, Lyso, Cru), antioxidant enzymes (GPX, SOD, GSHT and CAT) and house-keeping genes (EF and GADPH) of the shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> in a real-time PCR procedure.	73
Table III-1: Zootechnical results at the end of the grow-out period for the two rearing systems (EEP vs BFT).....	98
Table III-2: The overall means $\pm$ s.d of measured water quality parameters for the both grow-out systems.....	99
Table III-3: Total spawning number, eggs and nauplii produced based on one hundred females per treatment (EEP vs BFT).	99
Table III-4: Mean values of antioxidant enzyme activities in the digestive gland of broodstock before and after reproduction for the both treatments.	102
Table III-5: Oxidative status and antioxidative defenses in ripe ovaries at stage 4 of female broodstock from the both treatments (EEP and BFT).	102
Table III-6: The overall means $\pm$ s.d of measured water quality parameters for both grow-out systems.	119
Table IV-1: Relative abundance of the most frequently identified bacterial phyla (>0.1% of total sequence) within water from different rearing conditions over all of rearing: clear water (CW) or biofloc (BFT).....	146
Table IV-2: Relative abundance of the most frequently identified bacterial orders (>1% of total sequences) within shrimp intestines from different rearing conditions: clear water (CW) or Biofloc (BFT)..	150

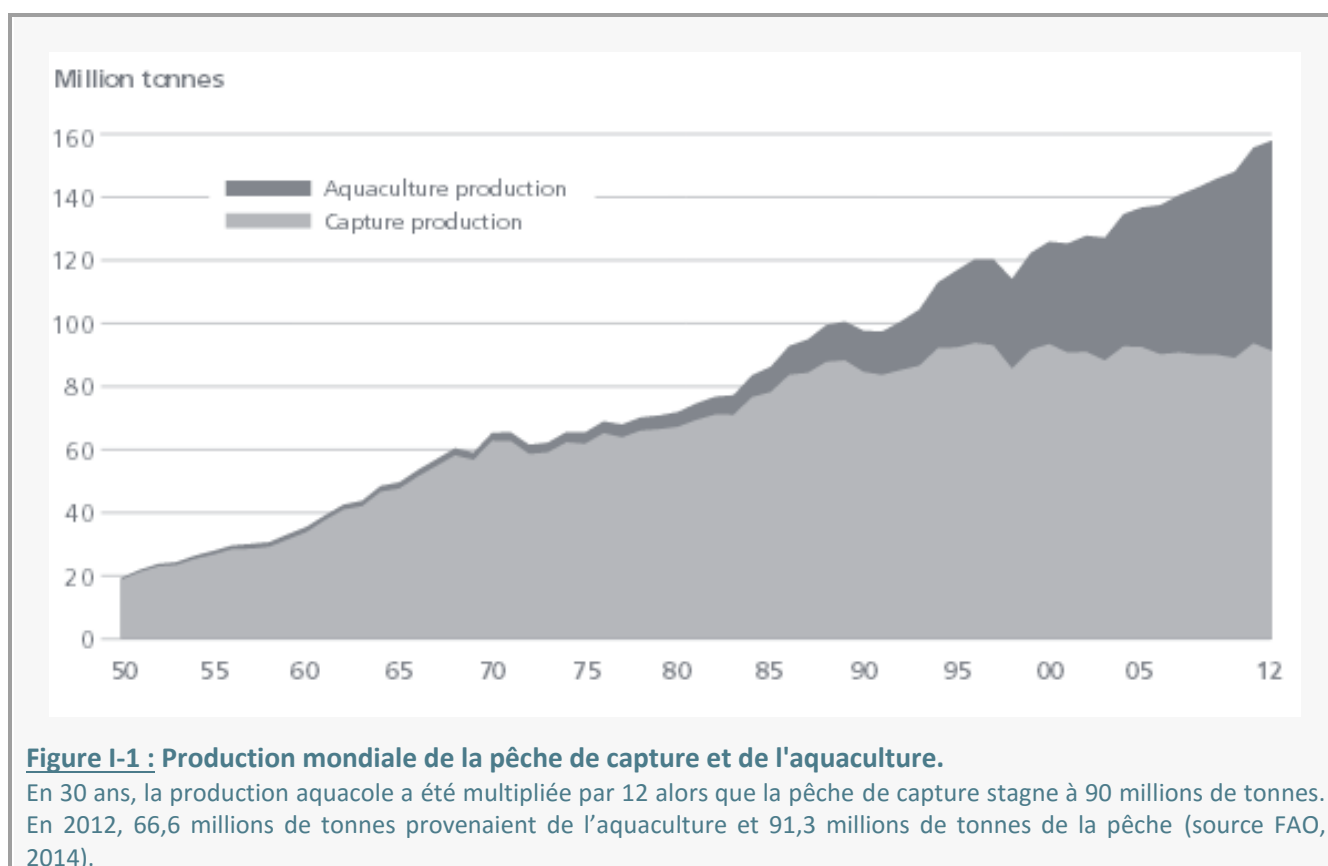
Partie I - Introduction générale

1. Contexte de la crevetticulture

1.1 Situation de l'aquaculture mondiale

Selon le rapport de la FAO (2014), la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture était de 158 millions de tonnes en 2012 pour une valeur totale de 217,5 milliards de dollars EU dont 137 millions de tonnes étaient destinées à l'alimentation humaine.

Depuis deux décennies, la production mondiale de pêche de capture demeure stable, à environ 90 millions de tonnes ; cela est dû notamment aux quotas imposés visant à éviter la surexploitation des ressources halieutiques. Alors qu'au contraire, le développement de l'aquaculture, toutes espèces confondues, poursuit sa croissance avec un rythme annuel moyen de 8,8% même si cette dernière est ralentie comparée aux années 1980 et 1990 (Figure I-1). L'aquaculture a produit, en 2012, 66,6 millions de tonnes (hors plantes aquatiques et produits non destinés à la consommation humaine), pour une valeur totale estimée à 120 milliards de dollars EU (FAO, 2014).



Il faut noter que les zones de production aquacoles sont très concentrées géographiquement. Ainsi, les pays d'Asie contribuaient en 2012 à 88,4 % de la production aquacole mondiale en volume. La production chinoise, à elle seule, représentait 61,4% de la production mondiale. L'Amérique (regroupant les Caraïbes,

l'Amérique latine et l'Amérique de Nord) forme le deuxième pôle de production aquacole avec 4,8% de la production mondiale.

Ainsi, l'aquaculture a compensé la stagnation des captures de la pêche et constitue une alternative réelle pour faire face à l'augmentation de la demande de produits d'origine aquatique liée à la croissance démographique mondiale.

1.2 Situation de la crevetticulture mondiale

La crevetticulture a commencé dans les années 1960-1970 et a connu une croissance très rapide, stimulée par la demande aux États-Unis, au Japon et en Europe occidentale. Elle a débuté par une culture traditionnelle d'animaux sauvages à faible densité en milieu naturel (étang) puis s'est petit à petit intensifiée en favorisant l'élevage d'animaux domestiqués en milieu contrôlé (Chim *et al.*, 2002 ; Chamberlain, 2010). A cette époque, la crevetticulture était pratiquement inexistante et était limitée à des centres de recherche au Japon (inventeur de l'élevage larvaire), aux USA (National Marine Fisheries Service Gavelston Laboratory) et en Polynésie française (CNEXO-Ifremer AQUACOP). La domestication et la mise au point d'une méthode d'élevage larvaire ont ainsi permis le développement de cette industrie. A partir de cette époque, l'élevage de crevettes s'est développé à un rythme soutenu : la crevetticulture est donc passée d'une activité ancestrale artisanale en Asie du Sud-Est à une industrie mondiale. En effet, la production aquacole des Crustacés, principalement des crevettes marines, a connu une forte croissance à partir des années 1970 (Figure I-2). Ce fort développement de la crevetticulture s'est fait au détriment de la pêche des Pénéides qui est en régression depuis 2007 (-8%). Entre 1970 et 2004, le taux de croissance annuel de ce secteur aquacole a été de 18,9% en moyenne. Les années 1990-2000 ont été marquées par un ralentissement de ce développement (+9,1%) essentiellement lié à l'apparition de maladies d'origine virale dans les principaux pays producteurs. Ce ralentissement a été suivi d'une reprise de la croissance sur la période 2000-2010 (croissance annuelle de +15%) ; en 2010, la production de crevettes Pénéides était estimée à 3,8 millions de tonnes. Plus récemment en 2012 et en 2013, les volumes de production ont diminué, principalement en raison de problèmes liés à des maladies émergentes telles que le syndrome de mortalité précoce (EMS) survenu dans certains pays d'Asie et d'Amérique latine (FAO, 2014).

En termes de valeurs, les crevettes, qu'elles proviennent de la pêche ou de l'aquaculture, se situent au premier rang des échanges mondiaux de produits aquatiques. Les exportations visent principalement les pays de l'Union Européenne, le Japon et les États-Unis. La production de crevette est principalement asiatique (87%), le reste de la production provient essentiellement du continent américain.

La grande majorité des crevettes d'élevage appartient à la famille des *Penaeidae* représentée par deux espèces seulement, *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* (crevette à pattes blanches) et *Penaeus monodon*

(crevette géante tigrée) ; ces deux espèces sont à l'origine de 90 % de la production crevetticole mondiale. Elles ont été retenues pour l'aquaculture car elles possèdent de bonnes performances de reproduction et de croissance en captivité. En 2010, *Litopenaeus vannamei* et *Penaeus monodon* représentaient respectivement 72% et 21% de la production de Pénéides. *Litopenaeus stylirostris*, l'espèce élevée en Nouvelle-Calédonie et en Polynésie française, ne représentait que 0,04% de la production mondiale (FAO, 2012).

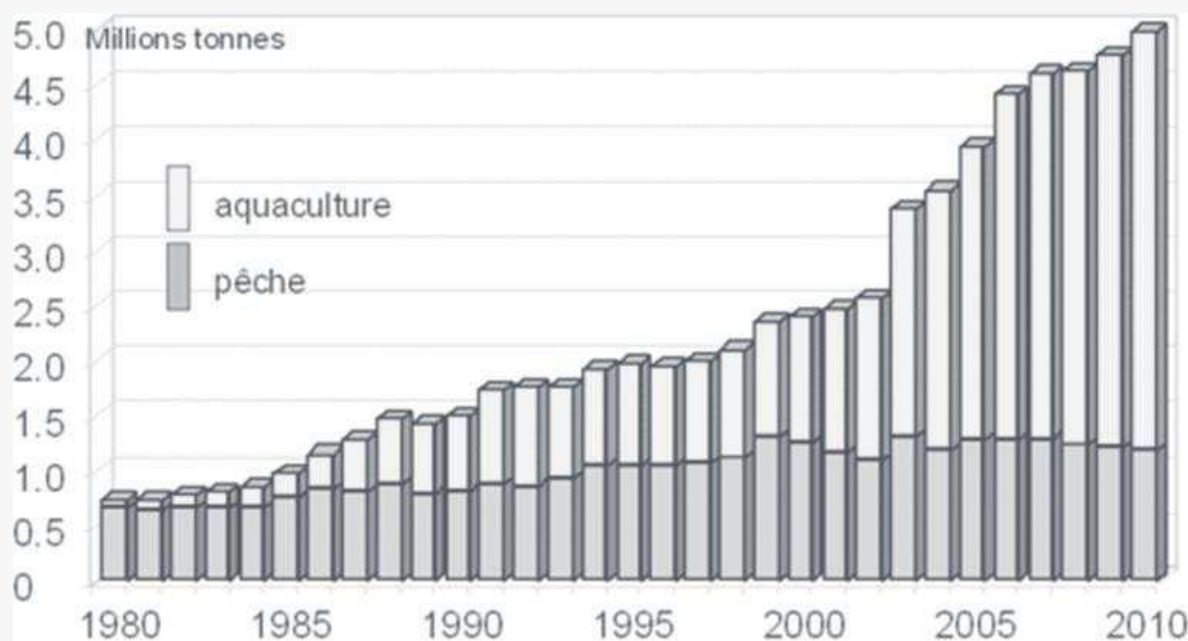


Figure I-2 : Evolution comparée de la production mondiale de crevettes par les pêches et l'aquaculture.

La pêche des Pénéides varie entre 0,8 et 1,3 millions de tonnes depuis les années 1980. La production aquacole, quant à elle, ne cesse d'augmenter pour atteindre 3,8 millions de tonnes produites en 2010 (Source FAO, 2012).

1.3 Panorama des systèmes de production

Les premiers élevages commerciaux de crevette étaient basés sur le système extensif caractérisé par de vastes bassins en terre de plusieurs dizaines d'hectares où l'eau était renouvelée naturellement par les marées. Les bassins étaient ensemencés par des post-larves sauvages qui se nourrissaient uniquement de la productivité naturelle de l'environnement d'élevage. Le système extensif est très peu productif et en même temps peu coûteux. Le démarrage de la crevetticulture a vraiment débuté quand les techniques d'écloserie ont été développées, grâce à l'effort international de recherche et développement (Japon, Etats-Unis, France), et permettaient de produire des post-larves en conditions contrôlées. A partir du moment où l'obtention des post-larves ne dépendait plus uniquement du recrutement naturel, les techniques de grossissement en fermes se sont intensifiées avec 3 niveaux : semi-intensif, intensif et hyper-intensif (tableau I-1). Ces 3 systèmes se sont développés en fonction du contexte social, économique et géographique local : les pays à main-d'œuvre bon marché et disposant de grandes surfaces se sont orientés vers l'élevage semi-intensif (Equateur, Madagascar, Chine...) et les pays disposant de peu d'espace et/ou de

main d'œuvre chère se sont davantage orientés vers des systèmes intensifs et hyper-intensifs (Japon, Thaïlande,...).

A Tahiti, l'élevage hyper-intensif a été développé dans les années 1980 et 1990 (AQUACOP, 1987 ; Hopkins *et al.*, 1993). Cette technologie repose sur le floc microbien (bactéries, phytoplancton, zooplancton) qui joue un double rôle *in situ* : il contribue au recyclage de la matière organique en excès et constitue une source d'aliment naturel pour les crevettes.

Table I-1 : Typologie des différents systèmes d'élevage de crevette.

PN : Productivité naturelle ; AC : Aliment composé ; FM : Floc microbien ; PL : Post-Larve ; ha : hectare (Adapté de Jory et Carbrera, 2003).

Paramètres	Type de système			
	Extensif	Semi-intensif	Intensif	Hyper-intensif
Unité de production	Bassin de terre 5-100ha	Bassin de terre 2 à 30 ha	Bassin de terre avec ou sans liner 0,5 à 1ha	Bassin liner 0,1 à 1ha
Apport alimentaire	PN	PN + AC	PN + AC	FM + AC
Densité (PL.m ⁻²)	1 - 5	5 - 25	25 - 120	120 - 1000
Rendement (kg.par ha ⁻¹)	50-500	500-5000	5000-20000	20000-100000

1.4 Les pathologies

La forte croissance des productions aquacoles des espèces exploitées et les échanges de crevettes vivantes entre les zones de production se sont accompagnés d'une augmentation de l'occurrence et de l'émergence de maladies infectieuses.

En élevage de crevettes marines, les pertes les plus importantes sont dues aux virus. L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) a répertorié six maladies virales chez les crevettes Pénéides: le Syndrome de Taura, la maladie des points blancs (*White spot syndrome virus*), la maladie de la tête jaune (*Yellow Head Virus*), la baculovirose tétraédrique (*Baculovirus penaei*), la baculovirose sphérique (baculovirus spécifique de *Penaeus monodon*), et la nécrose hypodermique et hematopoiétique infectieuse (*Infectious Hypodermic and Hematopoietic Virus*). Cependant, les bactérioses constituent également un problème zosanitaire important en crevetticulture. Presque tous les animaux marins en élevage peuvent être atteints par ces bactéries, cependant les problèmes paraissent exacerbés chez les crevettes Pénéides. Parmi ces bactérioses, il y a *Vibrio harvey*, à l'origine de vibriose lumineuse, qui affecte les élevages larvaires de crevettes d'Amérique du Sud et d'Asie ou encore *Vibrio parahaemolyticus* responsable du syndrome de nécrose hépatopancréatique aiguë (AHPNS) connu aussi sous le nom de syndrome de mortalité précoce (EMS). L'EMS est une maladie émergente à l'origine de mortalités massives dans les élevages de crevettes affectant fortement la production des pays concernés. Cette maladie est à l'origine en 2011 de pertes de

près de 80% en Chine. En Thaïlande, la production de crevette a chuté de 30% en 2013 par rapport à l'année précédente sous l'effet de la maladie (Taw, 2013).

Pour pallier à ces problèmes de maladies, des traitements désinfectants et antibiotiques sont très généralement utilisés. Le traitement désinfectant est techniquement difficile dans le cas des fermes du fait des très grandes surfaces considérées qui nécessiteraient des quantités excessivement importantes de produits. Les antibiotiques sont régulièrement utilisés en écloséries et en fermes pour prévenir ou traiter les maladies d'origine bactérienne, cependant la pratique conduit à la sélection de bactéries résistantes qui posent un réel problème de santé publique. Les maladies d'origine virale sont généralement contrôlées en amont en éliminant tous les vecteurs du virus incriminé : filtration de l'eau de renouvellement des bassins pour éviter l'entrée des copépodes, ensemencement des élevages avec des post-larves exemptes de tous pathogènes connus...

Au cours des dernières années, l'industrie aquacole a développé un certain nombre de stratégies pour réduire l'incidence des maladies en élevage de crevettes. Dans ce cadre, les recherches portent essentiellement sur l'amélioration (i) de l'aliment en relation avec la santé de l'animal avec l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques et (ii) de l'environnement d'élevage tout en augmentant la biosécurité (élevage en biofloc sans renouvellement d'eau, élevage en circuit fermé, traitements des eaux entrantes,...).

1.5 Contexte Calédonien

L'idée de l'élevage de la crevette marine en Nouvelle-Calédonie a émergé au début des années 70. La première implantation pour des études techniques de faisabilité fut construite dans la baie de St Vincent dans les années 72-73 avec le soutien du Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO), ancien nom de l'Ifremer. Les essais d'élevages ont été réalisés sur cinq espèces de Pénéides (espèces locales et importées) et ont permis de sélectionner l'espèce *Litopenaeus stylirostris* en raison de ses performances de croissance dans les conditions climatiques de Nouvelle-Calédonie. La première ferme de *L. stylirostris* a vu le jour en 1978 mais c'est seulement en 1983, que la production commerciale a réellement démarré (figure I-3).

Aujourd'hui, l'activité crevetticole représente le second secteur à l'exportation de la Nouvelle-Calédonie après celui du nickel et génère un chiffre d'affaires moyen annuel de 20 millions d'euros. En 2011, les 18 fermes aquacoles calédoniennes ont produit 1539 tonnes sur une surface totale de 688 ha dont 50% étaient exportées et 50% vendues localement. Les post-larves nécessaires à l'ensemencement des bassins d'élevages proviennent de 5 écloséries (ISSE, 2012). Cependant, depuis 2005, la production ne cesse de diminuer en passant ainsi de 2278 tonnes à 1539 tonnes de crevettes en 2011 (Figure I-3).

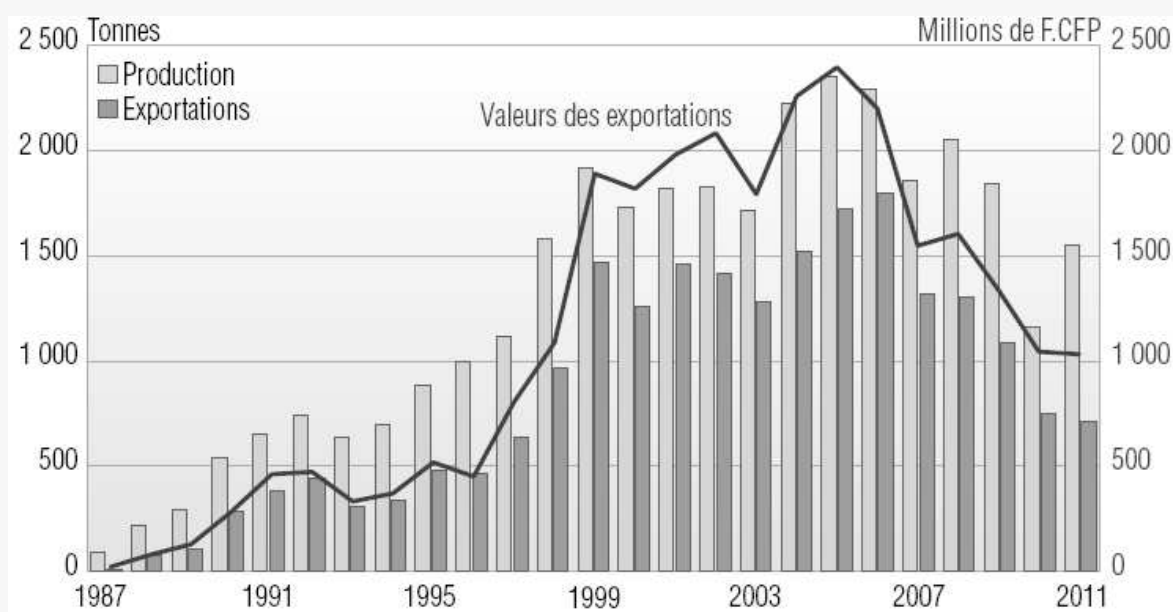


Figure I-3 : Evolution de la production et de l'exportation de crevettes en Nouvelle – Calédonie.

Augmentation progressive de la production et des exportations de 1987 à 2005 (production de 2278 tonnes) suivie d'une diminution continue pour atteindre une production de 1539 tonnes en 2011 (source ISSE, 2012).

Plusieurs causes expliquent ce recul de la production, et parmi celles-ci, les plus importantes sont d'une part des mortalités en bassins causées par des vibrioses et d'autre part des difficultés de production de post-larves par les écloseries.

En effet, depuis plusieurs années, deux pathologies saisonnières d'origine bactérienne affectent les élevages de Nouvelle-Calédonie (Herbland et Harache, 2008) :

-le « syndrome d'hiver », apparu en 1993, se traduit par des mortalités massives aux intersaisons lors des variations thermiques aux limites inférieures du préférendum de *L. stylirostris*. Ces mortalités sont associées à la présence de la bactérie *Vibrio penaeicida* ;

-le « syndrome d'été », apparu en 1997, se manifeste durant la saison chaude en présence d'une autre bactérie *Vibrio nigripulchritudo* dont certaines souches sont hautement pathogènes.

De plus, l'activité est confrontée depuis quelques années à des difficultés biotechniques au niveau des écloseries qui empêchent la production en quantité et en qualité de post-larves nécessaires à l'ensemencement des fermes d'élevage. Cette pénurie de post-larves, particulièrement marquée durant les saisons de production 2006/07, 2008/09 et 2009/10, a conduit à un manque à gagner estimé respectivement à 469, 100 et 380 tonnes de crevettes (Chim, 2011).

1.6 Contexte Polynésien

De 1972 à 1978, le CNEXO, basé au Centre Océanique du Pacifique à Tahiti, a entrepris des recherches sur la mise au point et la maîtrise des techniques d'élevage d'une dizaine d'espèces de crevettes originaires d'Amérique Centrale et d'Asie. La première ferme pilote démarra en 1978, et deux autres fermes débutèrent leur activité dans les années qui suivirent. Une éclosérie territoriale ouvrit en 1990. Mais la filière polynésienne, contrairement à la Nouvelle-Calédonie, s'est développée de façon limitée avec une production annuelle oscillant de 40 à 80 tonnes pour alimenter le marché local (Figure I-4). En 2013, 3 fermes polynésiennes étaient en exploitation pour une production annuelle de 79,2 tonnes sur une superficie de 9 hectares ; alors que la consommation locale de crevettes est de 600 tonnes par an (source Direction des Ressources Marines et Minières (DRMM)). Le chiffre d'affaires global de cette filière est de 148 millions de CFP soit 1 240 000 € en 2013 avec 16 emplois dont 75% à temps plein (source DRMM). La production se fait actuellement en bassins de terre en semi-intensif (5 à 8 tonnes/ha/an de crevettes de bon calibre 30/40 par kg).

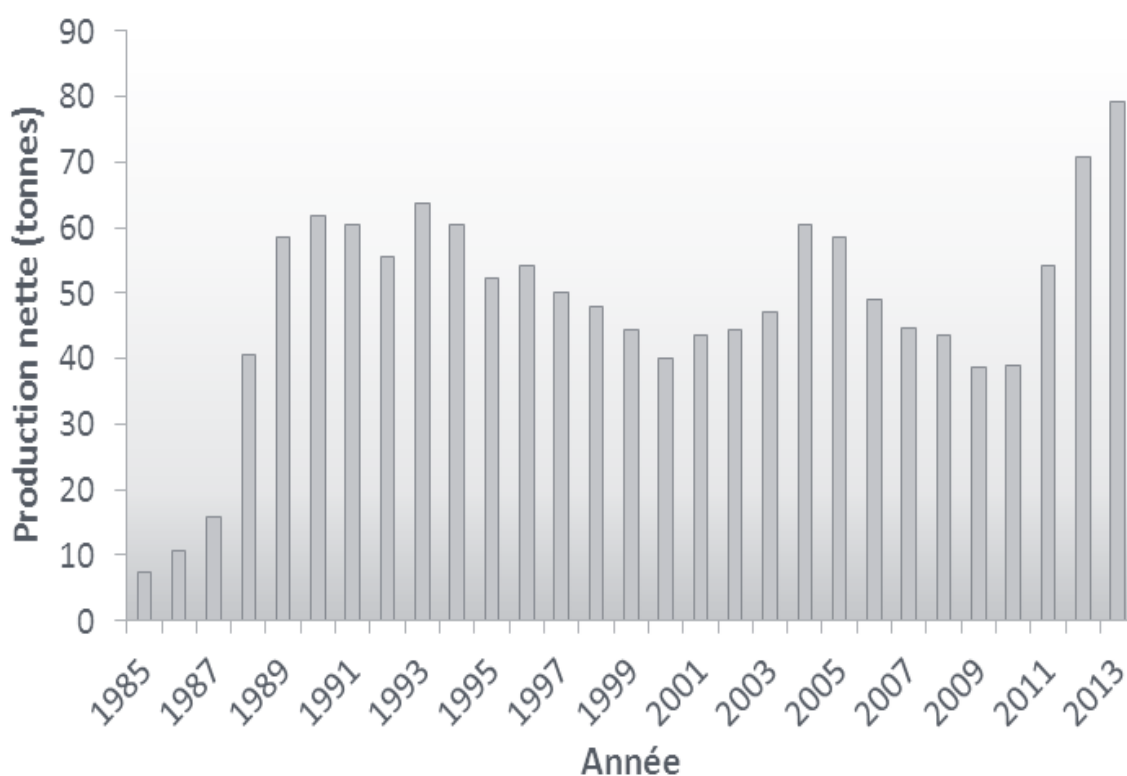


Figure I-4 : Evolution de la production de crevettes en Polynésie française.

La production à l'échelle commerciale a débuté dans le milieu des années 80. Après la production a oscillé entre 40 et 80 tonnes. La production augmente depuis 2011 pour atteindre un pic de 79 tonnes en 2013 (source DRMM).

Depuis quelques années, une stratégie de développement aquacole durable a été élaborée par la DRMM. De nombreuses actions coordonnées ont été mises en place par l'ensemble des acteurs du secteur aquacole polynésien (DRMM, Ifremer, Coopérative des Aquaculteurs de Polynésie Française (CAPF)). Dans ce cadre, l'écloserie du Pays (Centre Technique Aquacole VAIA) a été construite avec un co-financement entre l'Etat et la Polynésie française. En mars 2011, l'import sur le territoire polynésien de Crustacés porteurs de maladies reconnues a été arrêté afin de protéger les élevages du pays (arrêté n° 651 CM du 7 mai 1998 modifié réglementant les conditions zoo-sanitaires et hygiéniques de l'importation des produits d'origine animale en Polynésie française). D'autant plus que la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* élevée en Polynésie française est exempte de toutes les maladies à déclaration obligatoire à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). Les autorités de Polynésie française, afin de compenser cette fermeture de l'importation de crevettes et de répondre à la demande du marché local, ont la volonté de développer la filière du pays. L'objectif de production de crevettes à moyen terme est de 300 à 400 tonnes par an. Cet objectif, pour être atteint, passera par une intensification des élevages qui doit se faire à travers une technologie soutenable et respectueuse de l'environnement. Dans ce but, la DRMM, en collaboration avec l'Ifremer, expérimente de nouvelles techniques d'élevage : les cages ou enclos lagunaires et le biofloc. Depuis 2013, 3 fermes en élevage hyper intensifs en enclos lagunaires ont démarré leur exploitation dans les îles polynésiennes (Tahiti, Bora Bora et Tikehau).

2. Le modèle biologique : *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874)

2.1 Systématique

La crevette *Litopenaeus stylirostris*, communément appelée « cevette bleue », appartient à l'embranchement des Arthropodes, ordre des Décapodes, famille des Pénéides (Table I-2).

Table I-2 : Classification taxonomique de l'espèce *Litopenaeus stylirostris*.

Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Sous embranchement	<i>Crustacea</i>
Classe	<i>Malacostraca</i> (Latreille, 1802)
Sous classe	<i>Eumalacostraca</i>
Super ordre	<i>Eucarida</i>
Ordre	<i>Decapoda</i>
Sous ordre	<i>Dendobranchiata</i>
Super famille	<i>Penaeidae</i>
Genre	<i>Litopenaeus</i> (Perez Farfante, 1997)
Espèce	<i>Litopenaeus stylirostris</i>

2.2 Origine et distribution

La distribution des crevettes de la famille des Pénéides est limitée à une zone déterminée par les isothermes de surface de 20°C en été, ce qui correspond à peu près à 40° latitude Nord et Sud (Figure I-5). Les crevettes de cette famille vivent à de faibles profondeurs allant de 0 à 25 mètres et sur des fonds vaseux ou sablonneux avec un comportement d'enfouissement plus ou moins prononcé suivant l'espèce. Les adultes demeurent au large des côtes en milieu océanique alors que les juvéniles se développent plutôt en milieu estuarien.

L'espèce *Litopenaeus (Penaeus) stylirostris* est originaire de la côte Pacifique, son aire de répartition va du nord du Mexique jusqu'au sud du Pérou dans des zones où la température de l'eau de mer est au-dessus de 20°C (Wyban et Sweeney, 1991).



Figure I-5 : Répartition de *Litopenaeus stylirostris*.

La crevette *Litopenaeus stylirostris* est originaire des côtes Pacifique d'Amérique centrale. Sa répartition géographique s'étend du nord du Mexique au sud du Pérou (Carte d'E.Cardona adaptée des données de la FAO).

2.3 Morphologie externe

Comme tous les Crustacés, les crevettes Pénéides sont caractérisées par une métamérisation du corps divisé en trois parties (Figure I-6) :

- la tête ou acron,
- le thorax ou péréion,
- l'abdomen ou pléon terminé par le telson.

Chez les Crustacés Décapodes, la tête et le thorax soudés forment le céphalothorax. Les crevettes de la famille des Pénéides sont caractérisées par un rostre à dents en position ventrale et en position dorsale. *Litopenaeus stylirostris* possède un rostre très développé possédant huit dents sur le bord dorsal et trois en position ventrale. On reconnaît aussi les Pénéides à la présence de pinces aux trois premières paires de pattes thoraciques (péréiopodes). La partie abdominale est composée de 6 segments (métamères) portant chacun une paire de pattes nageuses (pléopodes) sauf sur le dernier segment qui se termine par le telson. La cuticule est lisse et légèrement pigmentée en bleu-vert chez la crevette *L. stylirostris*, d'où son appellation « crevette bleue ».

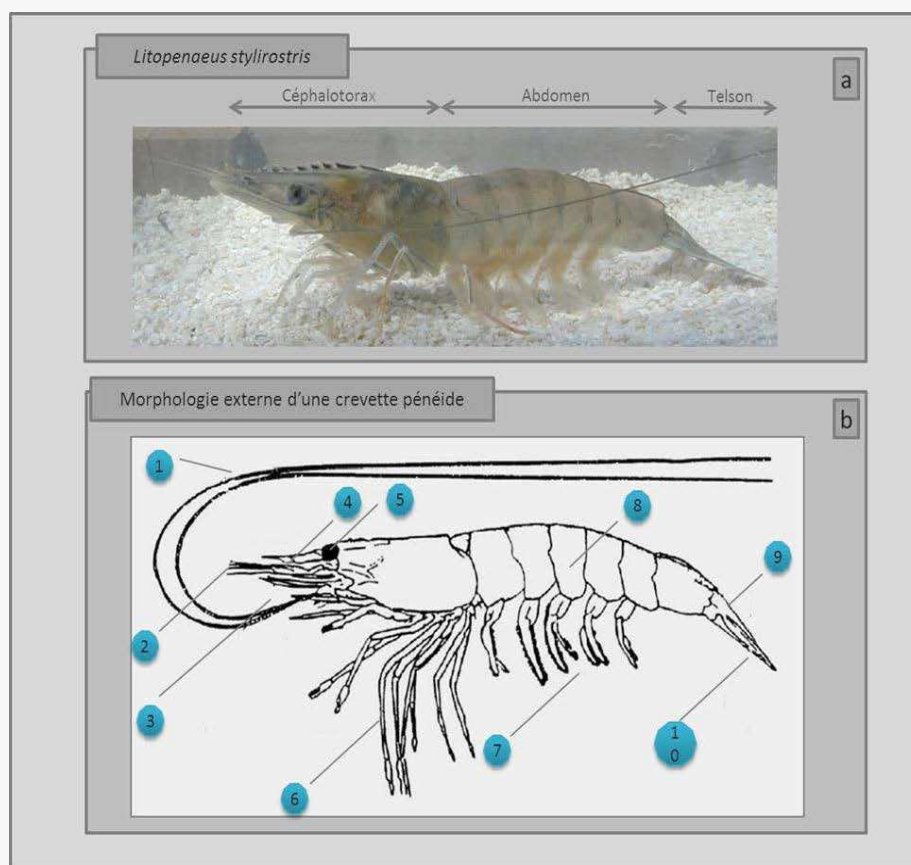


Figure I-6 : Morphologie externe d'une crevette Pénéide.

a : crevette bleue *Litopenaeus stylirostris* ; b : morphologie externe - 1 : antennes (1 paire) ; 2 : antennules (1 paire) ; 3 : écailles antennaires ; 4 : rostre ; 5 : pédoncule oculaire et œil ; 6 : périopodes (5 paires) ; 7 : pléopodes (5 paires) ; 8 : segments abdominaux (6 unités) ; 9 : telson ; 10 : uropodes (1 paire) (Photo d'Ifremer et schéma d'E.Cardona adapté de Castex, 2009).

2.4 Cycle biologique

Le cycle biologique des crevettes Pénéides comprend généralement trois phases caractérisées par des changements morphologiques, des modifications du comportement, de régime alimentaire et d'habitat (Figure I-7) :

- la phase méroplanctonique et planctonique qui a lieu en zone océanique et côtière (stades larvaires),
- la phase benthique, au niveau des estuaires, pour les post-larves et juvéniles,
- la phase de migration sexuelle durant laquelle les animaux migrent vers le large pour se reproduire.

La reproduction et la ponte ont lieu en pleine mer. La femelle prête à pondre (ovules de l'ovaire arrivées en fin de vitellogénèse secondaire) s'accouple avec le mâle qui dépose deux spermatophores au niveau du thélycum qui est une simple dépression à la face ventrale du céphalothorax située à la sortie des pores génitales de la femelle. Au moment de la ponte, les ovules sont fécondés par les spermatozoïdes libérés par les spermatophores. Les œufs sont pondus en pleine eau et restent pélagiques jusqu'à l'éclosion. Après 10 et

12h de développement embryonnaire, l'éclosion libère le nauplius qui est le premier stade larvaire. On reconnaît cinq à six stades naupliens successifs, les larves sont alors lécitotrophes. Après un à deux jours (suivant la température), les nauplii se transforment en zoés qui vont également se développer en trois stades successifs : zoé 1, 2 et 3. Chaque stade dure un peu plus de 24 heures. Les zoés 1 et 2 se nourrissent de phytoplancton, la taille des micro-algues peuvent varier de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres de diamètre ; les zoés 3 commencent à se nourrir de zooplanctons (rotifères, nauplii d'artémia). En fin de développement, la larve zoé 3 se métamorphose en larve mysis qui se développe également en trois stades : mysis 1, 2 et 3. Chaque stade dure un peu plus de 24 heures. Les mysis se nourrissent uniquement de zooplancton (nauplii d'artémia en aquaculture). Enfin, la larve mysis 3 se métamorphose et donne naissance à une post-larve, qui présente la plupart des caractéristiques morphologiques de l'adulte. Les post-larves d'abord pélagiques deviennent benthiques au bout de 10 à 20 jours et vont poursuivre leur développement dans les lagunes le long des côtes. En lagune où la production biologique est élevée et la nourriture abondante, les crevettes ont une croissance rapide pour atteindre en quelques semaines des tailles comprises entre 8 à 12 cm de longueur. A partir de ces tailles, les crevettes sub-adultes quittent les lagunes pour retrouver la pleine mer où elles poursuivent leur croissance pendant encore 8 à 12 mois avant de se reproduire. A l'état sauvage, le cycle prend une quinzaine de mois environ.

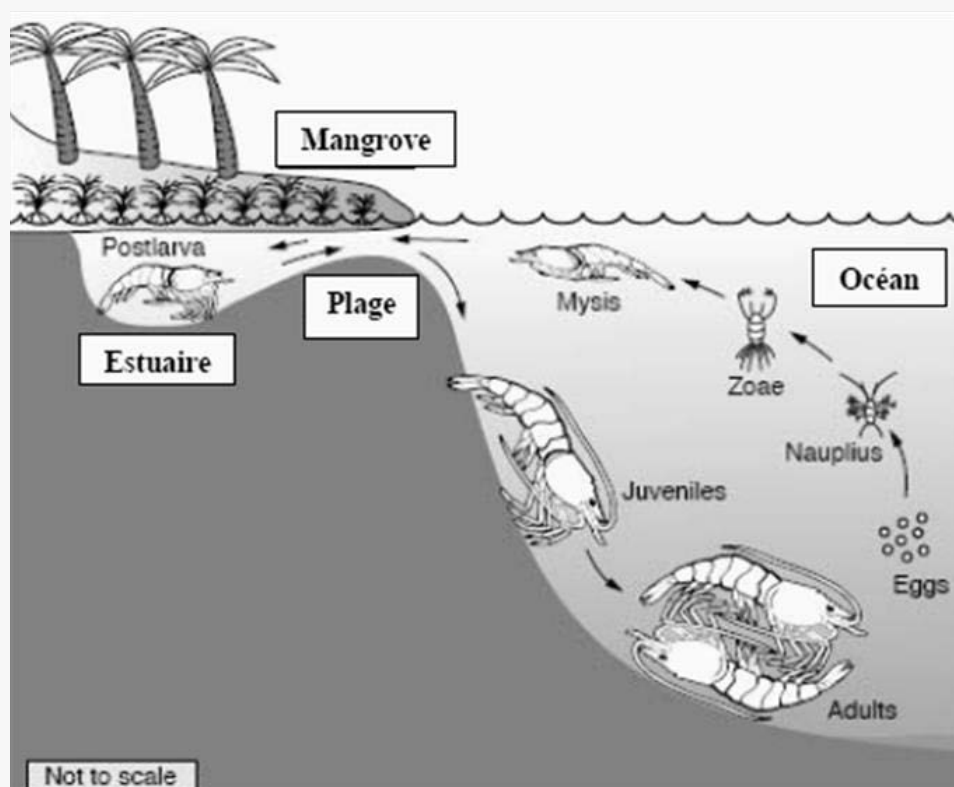


Figure I-7 : Cycle biologique des crevettes en mer.

La reproduction ainsi que le développement larvaire se font en pleine mer, les phases post-larves et juvéniles, quant à elles, se déroulent dans les estuaires (Rosenberry, 2001).

2.5 Mue et croissance

Chez les Crustacés, la croissance est un phénomène discontinu qui se fait par mues successives. L'ancienne cuticule est remplacée par une nouvelle, permettant une augmentation de la taille et du poids de l'animal. Ainsi, le cycle de mue est une répétition cyclique d'exuviations entre lesquelles 3 grandes étapes interviennent : la post-mue (stade A, B (1-2), C (1-2-3)), l'inter-mue (stade C4), et la pré-mue (D0, 1, 2, 3, 4). L'inter-mue (stade C4), ou inter-mue, est un état de stabilité physiologique, et pour cette raison, retenu et recherché pour les mesures effectuées dans le cadre de travaux expérimentaux.

2.6 Nutrition

2.6.1 Anatomie

Le tractus digestif des Décapodes est classiquement divisé en trois parties: la partie antérieure regroupant bouche, œsophage et estomac, l'intestin moyen comprenant la glande digestive, encore appelée hépatopancréas, et l'intestin postérieur (Figure I-8). Malgré l'usage de termes analogues, l'estomac et la glande digestive des Crustacés sont des organes très différents, anatomiquement et fonctionnellement du foie ou encore du pancréas des Vertébrés.

La **bouche** est entourée par plusieurs paires d'appendices spécialisés dans la chémoréception et la préhension : maxilles, maxillules, mandibules et maxillipèdes. Ces derniers sont spécialisés dans la préhension des aliments, le tri et la pré-dilacération en particules de taille adaptée. La partie antérieure de la bouche est renforcée par un labre jouant le rôle de clapet.

L'**œsophage** est relativement court et musculeux chez les crevettes Pénéides, constitué d'une paroi interne de nature chitino-protéique souple. L'œsophage pénètre au niveau de la partie antéro-ventrale de la chambre cardiale de l'estomac.

L'**estomac** est constitué d'une chambre cardiale et d'une chambre pylorique séparées par une sorte de valvule. Chez les crevettes Pénéides, la partie antéro-ventrale de la chambre cardiale comprend une crête garnie d'une rangée de 14 ossicules calcifiés et articulés. Ces pièces dotées d'une musculature spéciale constituent le moulin gastrique, organe de broyage qui comprend également une dent dorsale puissante. Ossicules et dent dorsale sont renouvelés à chaque mue ainsi que les parois de l'œsophage et de l'estomac. Les formations calcifiées se prolongent dans la chambre pylorique. Cette chambre est constituée de replis, d'épines calcifiées et de soies qui servent de filtre et ne laissent passer que les particules les plus fines du bol alimentaire. L'estomac pylorique a une fonction de pressage, de tri et de filtration. Le trajet des particules alimentaires est complexe au sein de l'estomac (Grassé, 1994), et les particules insuffisamment broyées sont renvoyées vers la chambre cardiale jusqu'à ce que le broyage soit suffisant. Les particules ayant franchi le

filtre pylorique sont dirigées vers l'intestin moyen et l'organe d'absorption (la glande digestive). Chez la plupart des espèces, le pH du contenu stomacal demeure neutre ou légèrement alcalin. L'organe ne comporte aucune glande ou cellule à sécrétion acide ou enzymatique.

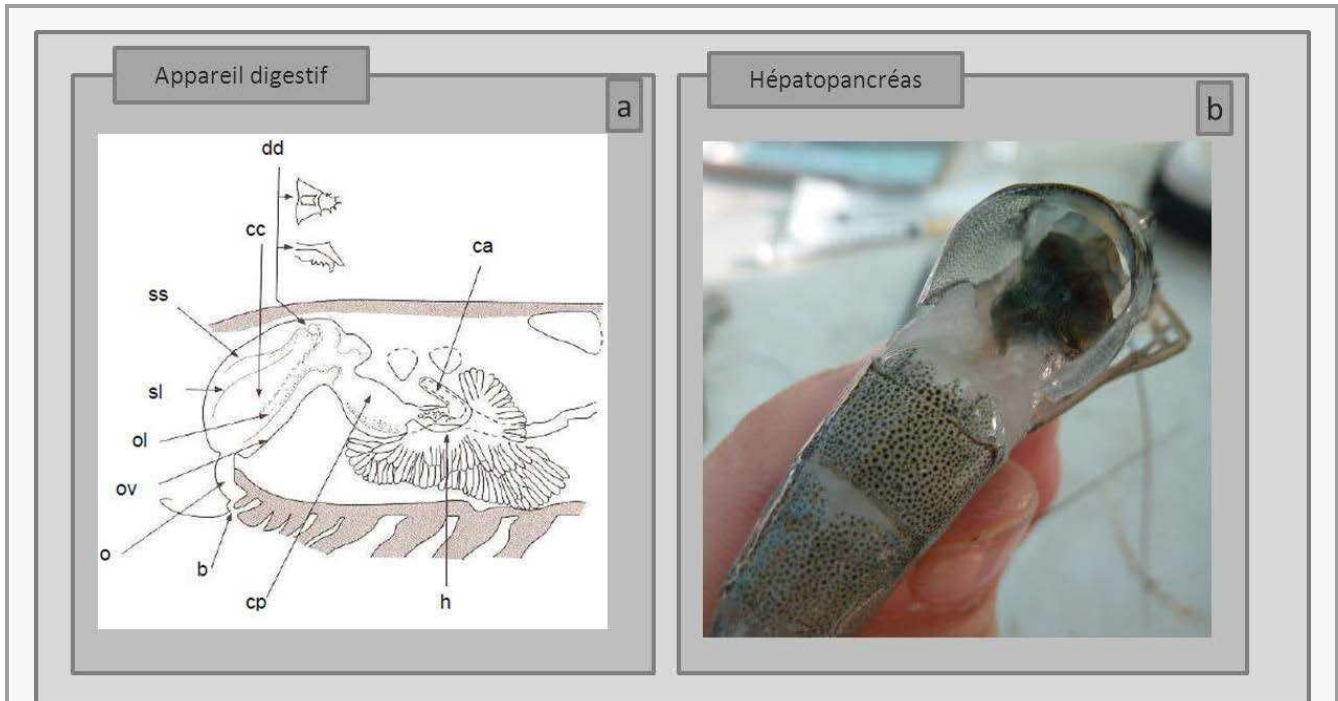


Figure I-8 : Appareil digestif d'une crevette Pénéide.

a : b, bouche ; ca, caecum antérieur ; cc, chambre cardiale ; cp, chambre pylorique ; dd, dent dorsale ; h, hépatopancréas ; o, œsophage ; ol, ossicules latéraux ; ov, ossicules ventraux ; sl, sillon latéral ; sv, sillon ventral b : prélèvement d'un hépatopancréas au cours d'un échantillonnage (schéma d'après Ceccaldi (1997) et photo d'E. Cardona).

La **glande digestive** est l'organe majeur chez les Crustacés Décapodes et a de nombreuses fonctions physiologiques. Au plan anatomique, c'est un organe massif (2 à 6 % de la masse corporelle) constitué de deux lobes symétriques enveloppés de tissu conjonctif. Il est situé dans la partie dorsale du céphalothorax immédiatement sous le cœur. Chaque lobe est constitué de centaines de tubules fermés à une extrémité et débouchant de l'autre sur deux chambres symétriques qui s'ouvrent dans la chambre pylorique. La lumière de chaque tubule est bordée d'un épithélium unicellulaire enveloppé d'un double réseau de fibres musculaires longitudinales et circulaires assurant des mouvements péristaltiques permettant le transport des phases liquides.

L'**intestin moyen**, qui va du pylore au rectum, est rectiligne. Dans son épithélium, on distingue des cellules nerveuses, des hémocytes ainsi que des cellules de type endocrinien. Cet épithélium sécrète du mucus qui enrobe les déchets solides issus de l'estomac, ainsi qu'une pellicule de chitine qui forme la membrane péritrophique des excréments. La partie distale de l'intestin moyen, riche en mitochondries, pourrait jouer un rôle dans la régulation ionique.

Enfin, l'intestin postérieur est une formation tubulaire à replis longitudinaux comportant des muscles circulaires qui assurent la défécation par des mouvements péristaltiques et la réabsorption de l'eau en milieu marin ou hyper salé.

2.6.2 Fonctionnement de l'appareil digestif

Les Crustacés choisissent leur nourriture grâce à des substances dissoutes libérées dans l'eau. Ces substances, qui sont des petites molécules (acides aminés, bases organiques, nucléotides et nucléosides, hexoses), sont connues pour leur pouvoir attractant et phagostimulant chez les Crustacés. Elles sont détectées par la crevette à l'aide de chémorécepteurs externes localisés sur les appendices (Lee & Meyers, 1997). Une fois l'aliment saisi, la crevette s'alimente lentement et le temps du repas est d'autant plus long que l'aliment est dur et que les particules sont grosses. La digestion se déroule ensuite en trois phases :

- La trituration et le broyage de l'aliment sont assurés par les appendices péribuccaux et parachevés par l'estomac. La nourriture ainsi broyée par le moulin gastrique est mélangée à des enzymes digestives qui proviennent de la glande digestive. La digestion est uniquement enzymatique, l'absence de sécrétion acide ne permettant pas de digestion chimique.

- Les produits de cette pré-digestion mécanique et enzymatique, le chyme (aliments semi-solides partiellement digérés) sont filtrés et envoyés dans la glande digestive où s'effectue la fin de la digestion enzymatique et l'absorption des produits de la digestion; les particules trop grosses (diamètre supérieur à 100 nm) passent directement dans l'intestin moyen pour être éliminées.

- Les débris cellulaires sont finalement extrudés hors de l'épithélium des tubules de la glande digestive pour être à leur tour éliminés. Dans l'intestin moyen se maintient une légère activité d'absorption des nutriments, et se fait l'enrobage des excréments. Enfin, l'ensemble des résidus non digérés passe dans le tube digestif postérieur pour être éliminé.

D'une manière générale, le transit intestinal est un processus très rapide chez les crevettes. Ainsi, chez les espèces Pénéides tropicales, l'émission des fèces chez l'animal sub-adulte (20g) à 28°C débute environ 90 minutes après la prise de nourriture et s'achève dans les 4 heures après l'ingestion. Il faut noter que peu d'études ont été réalisées et que la régulation du transit digestif reste très mal connue.

2.6.3 Les enzymes digestives

Les enzymes digestives chez les Crustacés sont produites par la glande digestive. Elles n'ont pas encore été totalement inventoriées :

- **les enzymes protéolytiques** : parmi les protéases, la trypsine est la principale enzyme protéolytique. Sainz *et al.* (2005) ont démontré l'existence de 3 iso-enzymes (A, B et C) de la trypsine chez *L. vannamei*. Cette enzyme est synthétisée de façon massive et peut représenter plus du tiers des protéines solubles de l'hépatopancréas. La chymotrypsine est également bien représentée, et a une forte activité, chez les crevettes Pénéides, bien que son rôle ait longtemps été sous-estimé (Eisen *et al.*, 1973). Des cathepsines (protéases à cystéine) ont également été inventoriées chez les crevettes, comme la cathepsine L chez *Metapenaeus ensis* (Hu & Leung, 2004). Enfin, une enzyme très différente, l'astacine, une métallo-protéase à spectre très large, absente chez les Vertébrés, a été trouvée chez de nombreux Crustacés. L'action de ces endoprotéases est complétée par un ensemble d'exoprotéases similaires à celles des Vertébrés: les carboxypeptidases A et B, les aminopeptidases et les dipeptidases (Galgani *et al.*, 1984).

- **Les enzymes glycolytiques** sont au nombre de quatre et deux sont systématiquement retrouvées chez les Crustacés: l'amylase et la chitinase. Les deux autres sont des glucanases hydrolysant spécifiquement les liaisons β 1s -3 (laminarinas) et β 1-4 (cellulases). Certains auteurs se sont particulièrement intéressés à l' α -amylase et à son rôle dans la digestion des carbohydrates chez les crevettes Pénéides (Al-Mohanna & Nott, 1987 ; Wigglesworth & Griffith, 1994 ; Rosas *et al.*, 2000, 2002). L'activité de cette enzyme semble liée au niveau de carbohydrates présents dans l'aliment et serait un des facteurs contrôlant l'utilisation des carbohydrates (Rosas *et al.*, 2002). La chitinase est quant à elle, réduite et ne permettrait qu'une digestion partielle des exuvies ingérées par les crevettes. Les laminarinas sont assez mal connues mais seraient présentes, permettant l'hydrolyse de la laminarine des algues. Les β glucanases interviendraient également dans la dégradation des β -glucanes présents dans les parois de nombreux micro-organismes (Wigglesworth & Griffith, 1994). Outre l' α glucosidase, d'autres enzymes hydrolysant les dimères glucidiques ont été répertoriées, avec notamment : la β -N-acetyl-glucosaminidase (chitobiase), les β -glucosidases, les cellulases, saccharase, mannosidase. Des glucoronidases participant à la digestion des résidus glucidiques des glycoprotéines ont également été recensées.

- **les lipases** des Crustacés ont été très peu étudiées. De nombreuses estérases ont été mises en évidence, avec un rôle apparemment supérieur aux lipases chez certaines espèces (Lee *et al.*, 1980). On connaît cependant mal leur localisation et leur rôle précis.

2.6.4 Besoins nutritionnels

Protéines

Les animaux aquatiques ont généralement des besoins en protéines supérieurs aux animaux terrestres, cela étant probablement dû au fait que le milieu marin offre une plus grande abondance en protéines et lipides qu'en carbohydrates (Guillaume *et al.*, 1999). Chez les crevettes, les protéines alimentaires

représentent la source énergétique principale (Deshimaru & Shigeno, 1972 ; Rosas *et al.*, 2000). En effet, les crevettes seraient mieux adaptées à l'utilisation des protéines comme source d'énergie (Rosas *et al.*, 2000). Sur un plan énergétique, l'utilisation des protéines induit une dépense plus forte, due en partie au phénomène de désamination, mais en retour l'énergie dérivée des acides aminés semble mieux utilisée que celle dérivée du glucose, au vu des résultats de croissance. De nombreux travaux se sont donc intéressés à déterminer la teneur en protéines dans l'aliment permettant la meilleure croissance des crevettes Pénéides. La teneur en protéines ainsi déterminée est fonction de l'espèce considérée, de la taille des animaux et des conditions expérimentales (composition de l'aliment, source des protéines utilisées, température...). Cependant, très peu d'études ont été menées pour quantifier les besoins en protéines. Parmi celles-ci, Kureshy et Davis (2002) ont déterminé pour la crevette *L. vannamei* les besoins journaliers en protéines nécessaires pour l'entretien et la croissance maximale. Ainsi les besoins journaliers en protéines, pour la croissance maximale d'un kg de crevettes, sont de 46 mg et de 24 mg respectivement pour des animaux juvéniles (1,3 g) et sub-adultes (7,5 g) nourris avec un aliment à 32 % de protéines, ces valeurs étant légèrement plus faibles pour une teneur en protéines de 48 %.

Lipides

Les lipides sont importants pour la nutrition des crevettes. Ils représentent une source d'énergie hautement digestible et d'acides gras essentiels nécessaires à la physiologie et à la bonne croissance des animaux. Les lipides servent par ailleurs de transporteur aux vitamines liposolubles et fournissent d'autres composés essentiels comme les stérols et les phospholipides. En effet, ces derniers sont des composés structuraux des membranes cellulaires et jouent sur leur fluidité. Par ailleurs les stérols sont importants pour la synthèse des hormones stéroïdes qui interviennent dans la mue chez les Crustacés. Les effets bénéfiques des phospholipides et des stérols sur la croissance et la survie des crevettes ont été bien étudiés (Teshima *et al.*, 1997 a et b). Généralement, les niveaux de phospholipides recommandés sont compris entre 3 et 5 % et sont apportés dans l'alimentation par la lécithine de soja.

La source principale de lipides dans l'aliment composé destiné aux crevettes est l'huile de poisson. La digestibilité de l'huile de poisson est généralement supérieure à 80 % pour des niveaux d'inclusion variant de 5 à 8 %. Des niveaux trop élevés de lipides peuvent conduire à des effets délétères sur la croissance. Au-delà de 10 % de matières grasses dans l'aliment, il y a une accumulation de lipides dans la glande digestive pouvant ainsi limiter le niveau du métabolisme énergétique. De plus, l'excès de lipides augmente le contenu énergétique de l'aliment qui sera alors moins consommé par l'animal.

Sur le plan qualitatif, les Crustacés sont dépendants des apports en acide gras essentiels tels que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI). Ils ont en effet des capacités limitées en termes d'élongation et de désaturation des acides gras linoléique et linoléique. Il a ainsi été montré chez des

juvéniles de *L. vannamei* que les AGPIs de la série n-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque avaient des valeurs nutritionnelles supérieures à celles des AGPIs de série n-6. En général, les besoins recommandés en acides gras essentiels sont autour de 1 % (Kanazawa *et al.*, 1985), cependant ce pourcentage serait fonction de la teneur en acides gras totaux et du rapport entre les différents AGE, notamment entre les séries n-3 et n-6 (Glencross & Smith, 2001).

Vitamines et minéraux

Les Pénéides requièrent onze vitamines hydrosolubles (thiamine, riboflavine, niacine, vitamines B6, acide pantothenic, biotine, folate, vitamine B12, choline, myo-inositol, vitamine C) et quatre vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, K) (Conklin, 1997). La vitamine E (α -tocophérol) et la vitamine C (acide ascorbique) sont reconnues pour avoir des propriétés antioxydantes ; elles protègent les lipides contre la peroxydation. Elles agissent principalement au niveau des lipides membranaires et au niveau cytoplasmique respectivement pour la vitamine E et vitamine C (Cahu, 2003).

Le phosphore et le calcium représentent les principaux minéraux essentiels requis dans l'alimentation de la crevette. Les besoins journaliers en minéraux s'expliquent par les pertes répétées de certains éléments au cours des mues (Shiau, 1998). Le calcium est indispensable à la fabrication de la carapace et au déroulement de nombreuses fonctions métaboliques (Della Patrona et Brun, 2008).

2.7 Le microbiote intestinal

Le tractus intestinal est un écosystème complexe qui arbore une diversité des communautés bactériennes ; ces dernières influenceraient l'immunité, le processus de nutrition ou de protection de l'animal hôte (Rungrasamee *et al.*, 2013). Or, aujourd'hui, relativement peu d'études détaillées existent sur le microbiote des crevettes Pénéides. Et ces quelques travaux se sont essentiellement intéressés à la présence et à la nature de la microflore (Chaiyapechara *et al.*, 2012 ; Rungrasamee *et al.*, 2013, 2014 ; Zhang *et al.*, 2014) mais rarement à son implication sur la physiologie de l'hôte (Castex, 2009).

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique. Par exemple, le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, constitue l'ensemble des microorganismes vivant dans l'intestin.

Différents types d'associations peuvent exister entre les animaux et leur microbiote intestinal (Harris, 1993). Ainsi les bactéries ingérées peuvent coloniser ou simplement survivre au passage du tractus intestinal. Ces bactéries, ou les substances qu'elles libèrent, peuvent au cours de leur passage avoir une contribution nutritionnelle et/ou influencer la composition du microbiote intestinal. Les bactéries résidentes

pourront s'installer de façon durable dans la partie postérieure de l'intestin ou proliférer dans certaines régions du tractus digestif, constituant alors la population microbienne permanente. Les quelques études réalisées chez les crevettes ont montré que le microbiote du tube digestif était principalement composé des genres *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* et *Vibrio* (Yasuda and Kitao, 1980 ; Dempsey *et al.*, 1989 ; Moss *et al.*, 2000 ; Oxley *et al.*, 2002). Cependant, tous ces résultats proviennent d'études utilisant les techniques de culture anaérobique qui révèlent uniquement les bactéries cultivables. Or ces dernières ne représentent qu'entre 10-50% des populations totales des bactéries de l'échantillon mesuré (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Wilson et Blitchington, 1996). Récemment, à l'aide de techniques moléculaires (PCR-DGGE et pyrosequençage principalement), certains auteurs ont montré que le microbiote du tube digestif de la crevette était composé de *Proteobacteria*, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* avec une prédominance des *Gamma-Proteobacteria*, classe comprenant les genres *Vibrio* et *Photobacterium* (Liu *et al.*, 2011 ; Chaiyapechara *et al.*, 2012 ; Rungrassamee *et al.*, 2013, 2014 ; Zhang *et al.*, 2014).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la composition bactérienne intestinale. Parmi eux, nous pouvons noter des facteurs spécifiques à l'hôte, tels que le stade de développement, la structure de l'intestin, la nature de la paroi intestinale, le type d'alimentation et l'état physiologique de l'hôte (Austin et Baker, 1988 ; Harris, 1993 ; Rungrassamee *et al.*, 2013). Mais des facteurs environnementaux peuvent également influencer ce microbiote (Luo *et al.*, 2006). En effet, Chaiyapechara *et al.* (2012) montrent que le microbiote intestinal de la crevette est différent selon les fermes d'élevage d'origine. Cependant, l'influence des populations bactérienne de l'environnement d'élevage sur le microbiote intestinal de l'animal en culture a été très peu étudiée.

Parmi les effets démontrés de microbiote intestinal sur la physiologie des invertébrés marins, nous pouvons noter (Sugita *et al.*, 1987 ; Ramirez et Dixon, 2003 ; Izvekova, 2006 ; Kar et Ghosh, 2008 ; Castex, 2009 ; Tzuc *et al.*, 2014):

- une contribution enzymatique via la production d'enzymes exogènes,
 - une stimulation des activités enzymatiques de l'hôte,
 - une fixation d'azote ou la synthèse et la libération de nutriments (acides aminés essentiels, vitamines...)
- par les bactéries au bénéfice de l'hôte,
- un pré-conditionnement de l'aliment permettant une amélioration de la digestion par l'hôte,
 - une production d'éléments essentiels pour le métabolisme de l'hôte,
 - une amélioration de la résistance de l'hôte à diverses toxines,
 - une contribution à l'osmorégulation.

D'autres effets probables, inspirés de travaux réalisés chez les poissons, peuvent également être mentionnés : des modifications de l'anatomie du tube digestif, des modifications du système immunitaire au niveau intestinal (Pichiatti *et al.*, 2008), un effet barrière vis-à-vis des souches bactériennes exogènes, notamment par un phénomène de compétition-exclusion (production de substances inhibitrices, compétition en nutriments, en espace ou en oxygène). Des travaux complémentaires sont bien entendus nécessaires afin de préciser les rôles du microbiote intestinal chez les crevettes Pénéides.

2.8 Immunité

Les invertébrés marins vivent dans un environnement aquatique riche en microorganismes, protozoaires, micro-algues, champignons, levures et bactéries. Certains de ces organismes constituent leurs microbiotes et s'établissent comme commensaux. Cependant, des bactéries peuvent devenir pathogènes pour les crevettes dans certaines conditions d'élevage et environnementales ou conditions inhérentes à la physiologie des crevettes (Goarant *et al.*, 1998 ; Vaseeharan et Ramasamy, 2003 ; Bachère *et al.*, 2004). La préservation de l'homéostasie des crevettes nécessite la mise en place d'un certain nombre de mécanismes de défense, permettant de détecter et de discriminer les micro-organismes bénéfiques de ceux qui sont néfastes pour l'animal.

Système circulatoire

Le système circulatoire des Crustacés est ouvert, de ce fait, les microorganismes ou particules indésirables peuvent être retrouvés dans la circulation (Figure I-9). Pour éliminer ces composants extérieurs, les Crustacés possèdent des organes excréteurs, comme les glandes antennaires, qui sont irrigués par l'hémolymph à partir des sinus hémolympatiques (Bell et Lightner, 1988). Un autre organe, présent chez les crevettes Pénéides, fortement irrigué est l'organe lymphoïde, qui peut aussi être impliqué dans les processus de filtration et d'élimination chez les crevettes (Oka, 1969).

Immunité innée

Les invertébrés ne possèdent pas de systèmes immunitaires adaptés, comme les vertébrés, basés sur des anticorps hautement spécifiques et récepteurs à antigènes, appelés immunité acquise. L'immunité des invertébrés, de type innée, fait appel à un système immunitaire impliquant des mécanismes de réponses rapides et peu spécifiques à médiation humorale et cellulaire (Figure I-10).

La réponse immunitaire des Crustacés passe tout d'abord par un nombre limité de récepteurs connus sous le nom de « Pattern-Recognition Receptors » (PRR) qui vont reconnaître des motifs du non soi présents à la surface des microorganismes, les « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP). La reconnaissance

des PAMP par les PRR induit l'activation de la réponse immunitaire innée. L'étape suivante de la reconnaissance des micro-organismes infectieux sera leur élimination, faisant intervenir des composés cellulaires et des composants humoraux du système immunitaire. Ces deux types de réponse immunitaire peuvent agir de façon indépendante ou conjuguée (Hultmark, 2003 ; Dimopoulos, 2003 ; Brennan et Anderson, 2004).

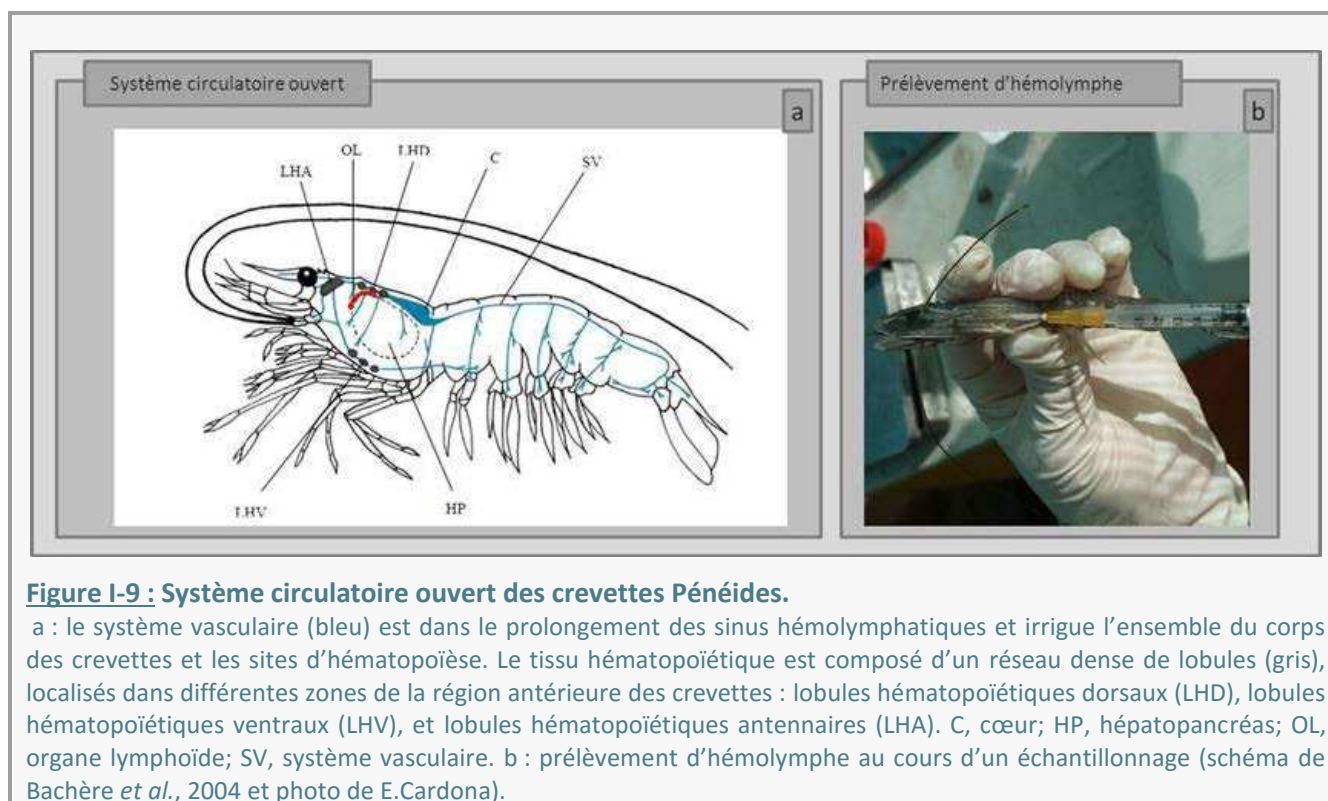


Figure I-9 : Système circulatoire ouvert des crevettes Pénéides.

a : le système vasculaire (bleu) est dans le prolongement des sinus hémolymphatiques et irrigue l'ensemble du corps des crevettes et les sites d'hématopoïèse. Le tissu hématopoïétique est composé d'un réseau dense de lobules (gris), localisés dans différentes zones de la région antérieure des crevettes : lobules hématopoïétiques dorsaux (LHD), lobules hématopoïétiques ventraux (LHV), et lobules hématopoïétiques antennaires (LHA). C, cœur; HP, hépatopancréas; OL, organe lymphoïde; SV, système vasculaire. b : prélèvement d'hémolymphe au cours d'un échantillonnage (schéma de Bachère *et al.*, 2004 et photo de E.Cardona).

Les hémocytes, véhiculés par l'hémolymphe, constituent les effecteurs principaux de l'immunité des Crustacés. Il en existe trois formes qui se différencient par le nombre et la forme des granules qu'ils contiennent : les cellules granuleuses (contenant de nombreux granules), les cellules semi-granuleuses (à granules plus petits et moins nombreux) et les hyalinocytes (absence de granules) (Bauchau, 1981). Ces cellules, dites immuno-compétentes, protègent les Crustacés par trois actions cellulaires (Feng, 1988 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) :

- L'infiltration : de nombreux hémocytes s'infiltrant et se concentrent sur le site de lésion ou d'infection. Il se forme un amas d'hémocytes agrégés. Un remplacement des tissus endommagés par des hémocytes allongés se produit, il s'en suit un dépôt de collagène. Pour finir, les tissus nécrotiques sont éliminés par des hémocytes phagocytaires et l'architecture normale du tissu est restaurée.

- La phagocytose : l'organisme reconnaît l'agent étranger par l'intermédiaire de récepteurs et de lectines. Ceci entraîne l'adhésion de la particule étrangère sur l'hémocyte et la contraction du cytosquelette

permettant à la membrane cytoplasmique d'englober la particule étrangère. Ensuite, la particule est internalisée dans le cytoplasme de l'hémocyte sous la forme d'un phagosome qui fusionne avec un ou plusieurs lysosomes pour former le phagolysosome. Puis la particule est détruite par des enzymes lysosomales ou à la suite d'un choc respiratoire par des espèces réactives de l'oxygène (EROs).

- L'encapsulation : les agents pathogènes métazoaires (trématodes, cestodes) de grande taille ne peuvent pas être phagocytés, et sont alors entourés d'une couche interne constituée de cellules comparables à des fibroblastes et d'une couche externe constituée de matériel fibreux contenant des glycoprotéines et/ou des mucoprotéines et infiltrée par des hémocytes.

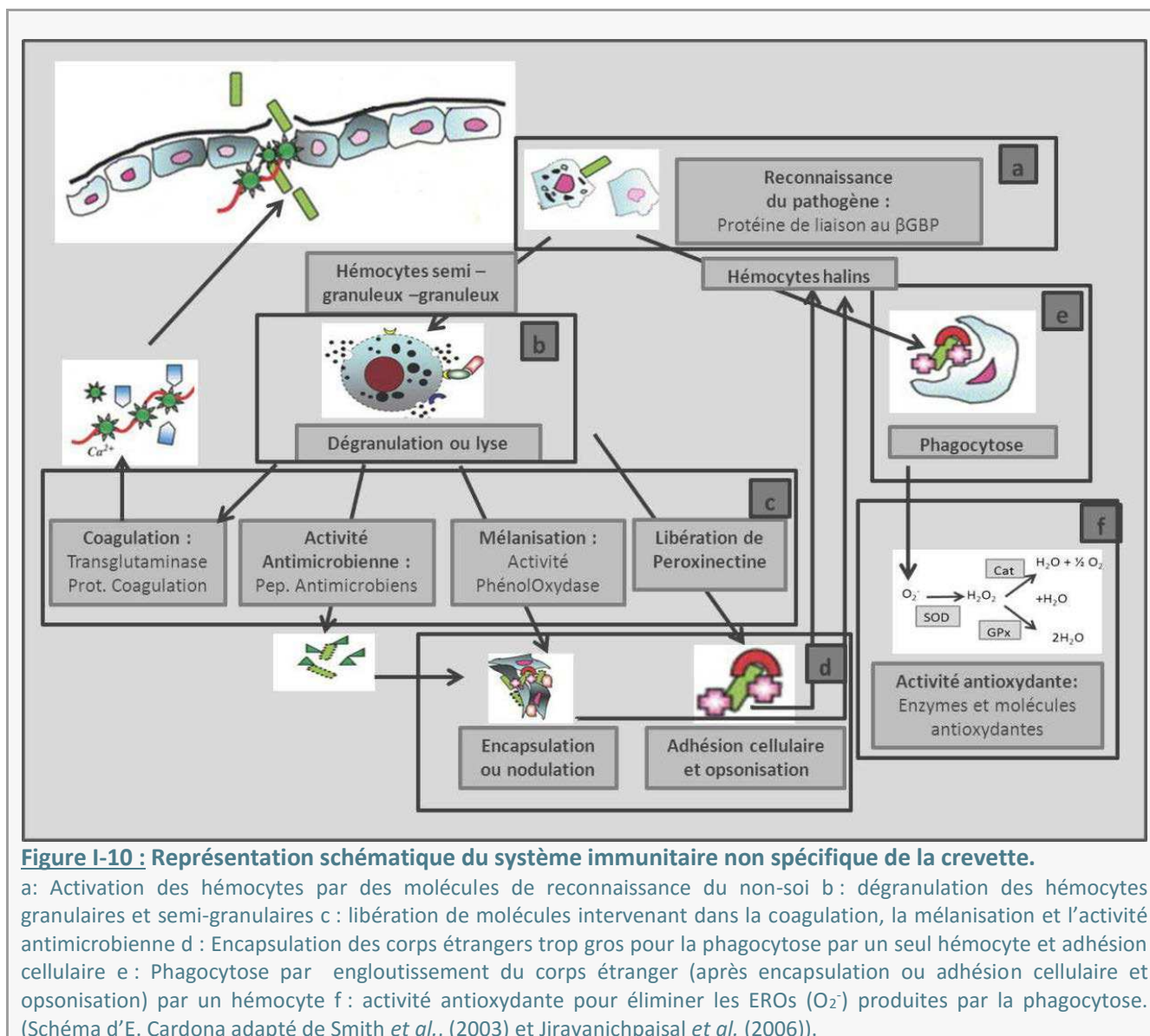
La réponse immunitaire innée des Crustacés s'appuie également sur une défense humorale. Plusieurs effecteurs entrent en jeu :

- Les peptides antimicrobiens (AMPs) : Ils sont sans doute les molécules les plus efficaces pour lutter contre les infections microbiennes. Ce sont des molécules de petites tailles au spectre d'activité très large. Elles sont extrêmement répandues dans le règne vivant et elles constituent l'une des premières lignes de défenses contre les agents pathogènes. Chez les crevettes Pénéides, deux types de peptides antimicrobiens ont été décrits : les penaeidines et les peptides dérivés de l'hémocyanine. Par ailleurs, l'étude de l'expression et de la localisation des penaeidines au cours d'une stimulation ou d'infection bactérienne, a permis de caractériser la réponse immunitaire des crevettes, mettant en évidence deux phases distinctes (Bachère *et al.*, 2004). Une première phase, six heures après infection, correspond à une réaction locale caractérisée par la migration des hémocytes (granulocytes) exprimant continuellement les penaeidines, au site d'infection, et par leur lyse, libérant les peptides. Une seconde phase, phase systémique (après 12-24 heures), correspond à une activation de l'hématopoïèse et de l'activité transcriptionnelle des penaeidines (Muñoz *et al.*, 2004).

- Le système prophénoloxydase (proPO) : un autre mécanisme qui fait partie de la défense humorale est constitué par le système d'activation des phénoloxydases (PO). Chez les invertébrés, la PO est présente sous une forme inactive, prophénoloxydase (proPO). Le système proPO correspond à la cascade biochimique responsable de l'activation des PO (Söderhäll et Cerenius, 1998). Il est impliqué dans la ligne de défense immunitaire inductible de l'hôte infesté par un pathogène (Fan *et al.*, 2009). Les POs initient la formation d'un dépôt de mélanine, qui participe à la séquestration des pathogènes (Reid *et al.*, 2003 ; Ling et Yu, 2005).

- le stress oxydant : lorsqu'un agent pathogène est phagocyté, l'activation du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires peut conduire à un stress oxydant. L'activation de la NADPH-oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase) membranaire conduit à une augmentation de la consommation d'oxygène et à la surproduction de radicaux libres ou EROs à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, tels que

l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet ou l'anion hypochlorite. Les EROs ont de forts pouvoirs microbicides et sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior, 1984). Ceci sera décrit plus en détail dans le paragraphe 2.9.



2.9 Défenses anti-radicalaires et stress oxydant

L'oxygène se distingue des autres éléments par la présence de deux électrons non appariés (biradical). Cette propriété limite sa capacité à interagir avec les molécules organiques à moins d'être activé. La réduction univalente de la molécule d'oxygène conduit à la production d'intermédiaires réactifs tels que des radicaux libres, comme l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyle ($OH^\bullet$), et d'autres entités non radicalaires de l'oxygène comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et finalement l'eau (H_2O). Ces produits issus de la réduction de l'oxygène sont appelés espèce réactive de l'oxygène (ERO).

En conditions physiologiques, une partie de l'oxygène de la respiration qui arrive aux tissus est transformée au niveau de la mitochondrie en ERO : toutes les cellules photosynthétiques et les cellules respiratoires en produisent. Ainsi, chez les animaux, le métabolisme aérobie est la première source de production d'ERO (Winston et Di Giulio, 1991) ; on estime ainsi entre 0,4 à 4 % la part de l'oxygène du métabolisme oxydatif qui donnera naissance à des espèces réactives de l'oxygène. Les ERO sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, sucres,...) et sont à l'origine de dégâts cellulaires importants tels que la cassure et la mutation de l'ADN (Imlay et Linn, 1988), la peroxydation lipidique membranaire (Fridovich, 1998), l'inactivation des protéines et des enzymes, l'oxydation des sucres ou encore l'oxydation des protéines (Lesser, 2006). Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, les organismes ont développé des systèmes permettant de réguler la production et l'accumulation des EROs (Lesser, 2006) ; l'organisme va produire des antioxydants enzymatiques ou non qui vont éliminer ces EROs.

*Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée d'EROs ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'EROs et systèmes de défense caractérise l'état de **stress oxydant** et s'accompagne par l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.*

Certaines molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes) agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur (« *scavenger* » en anglais). La molécule piégeuse sera ensuite régénérée ou détruite par des systèmes de détoxification. La plus importante de ces molécules est le glutathion réduit. Ce dernier, comme les autres « piégeurs » de faible poids moléculaire, est considéré comme la première « ligne de défense » contre les attaques radicalaires. Le glutathion et les thiols en général, sont d'excellents réducteurs, donateurs d'hydrogène et de puissants « piégeurs » de radicaux, réagissant directement avec le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde, le radical hydroxyle et le monoxyde d'azote (Halliwell et Gutteridge, 1999). Il est également un substrat essentiel pour l'enzyme antioxydante la glutathione peroxydase. Ainsi, le glutathion réduit (GSH), une fois oxydé, forme un radical thiol qui réagit avec une deuxième molécule pour former un pont disulfure (GSSG). Le ratio GSSG/GSH (ou GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un indicateur du degré de stress oxydant.

Une autre stratégie, de nature enzymatique, consiste à détruire directement les superoxydes ou les peroxydes. Elle implique notamment les superoxydes dismutases (SOD) qui transforment les anions

superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Le peroxyde d'hydrogène issu de la dismutation de l'anion superoxyde via l'action de la SOD est converti en eau et en oxygène moléculaire par les catalases (CAT) ou les glutathions peroxydases (Gpx). D'autres enzymes telles que les myeloperoxydase, ou peroxinectines des Crustacés sont également impliquées dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène et la formation d'acide hypochlorique (Holmblad et Söderhäll, 1999). Notons également les enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase, la glutathion réductase ou les thiorédoxines peroxydases intervenant à différents niveaux du processus de défense face aux ERO.

2.10 Reproduction

La femelle

Chez la femelle, la paire d'ovaires est en position dorsale disposée de part et d'autre de l'axe médian de l'animal. Au niveau du céphalothorax, les ovaires sont constitués de deux lobes antérieurs et de 6 lobes latéraux. Les deux oviductes partent des lobes latéraux et débouchent sur les pores génitaux situés à la base de la 3ème paire de péréiopodes. L'ovogénèse débute avec la méiose qui se déroule dans la zone germinale de la gonade et donne les ovogonies. Celles-ci sortent de la zone germinative pour donner les ovocytes qui vont faire leur vitellogenèse.

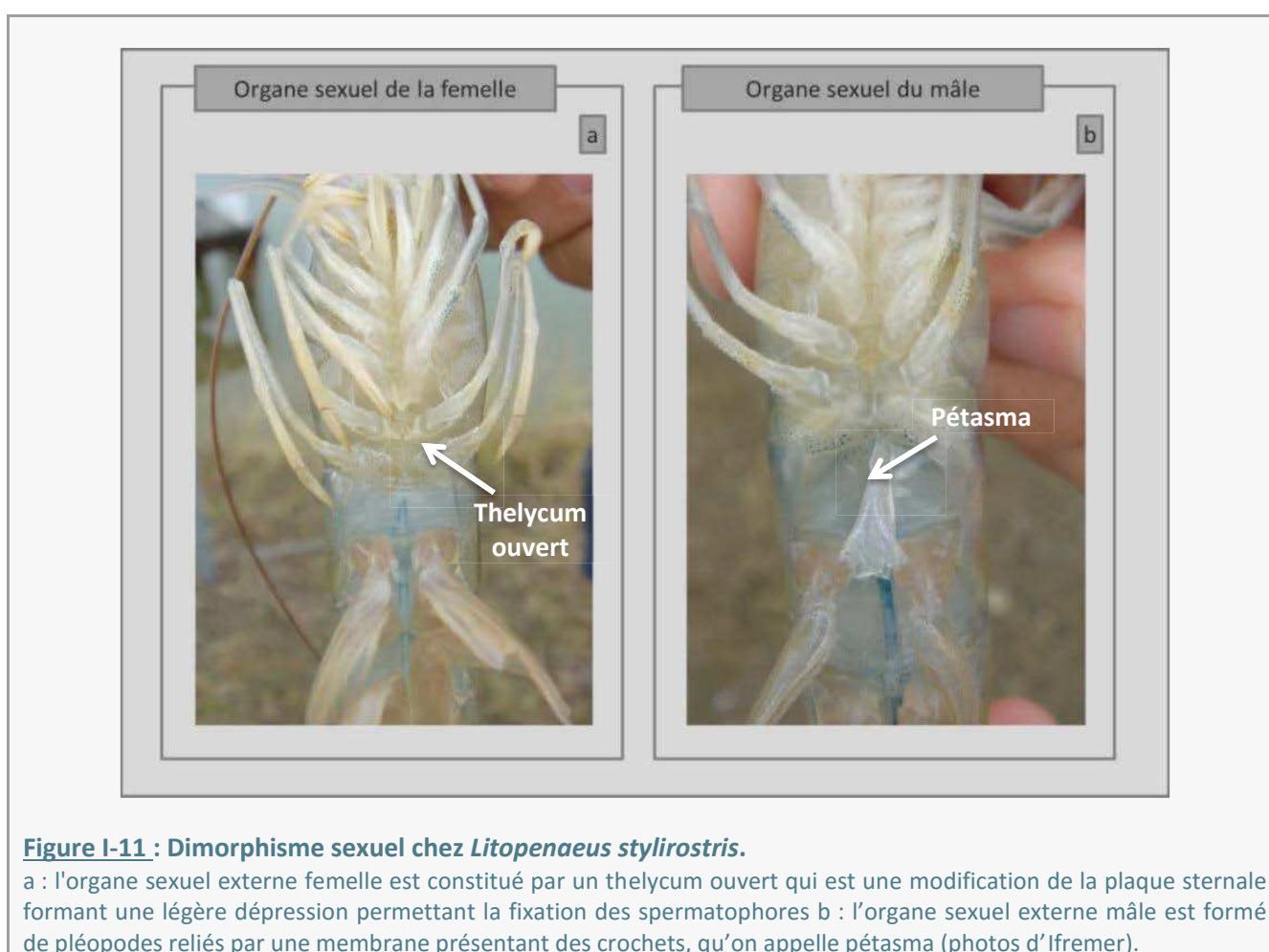
Au cours de la vitellogenèse, la maturation ovarienne chez les Pénéides résulte d'une synthèse et accumulation rapides de la protéine majeure de l'œuf, la vitelline qui est dérivée de son précurseur, la vitellogénine. Deux étapes de la vitellogenèse sont décrites : la vitellogénèse primaire avec synthèse protéique endogène de l'ovocyte qui augmente de taille et la vitellogénèse secondaire ou exogène caractérisée par une accumulation de vitellus d'origine endogène et exogène (Charniaux-Cotton et Payen, 1988). La vitellogénèse est inhibée par la GIH (Gonado-Inhibiting Hormone), un neuropeptide produit au niveau du pédoncule oculaire. La GIH, synthétisée dans le complexe medulla terminalis et organe X, est sécrétée et stockée dans la glande du sinus d'où elle est libérée dans l'hémolymphe (Treerattrakool *et al.*, 2008). La régulation hormonale de la vitellogénèse ferait également intervenir un facteur stimulateur et des hormones stéroïdes.

L'organe sexuel externe femelle est constitué par le thélycum qui est une modification de la plaque sternale formant une légère dépression permettant la fixation des spermatophores (Figure I-11a).

Le mâle

Chez le mâle, la spermatogénèse se réalise dans une paire de testicules constitués de tubules séminifères (unité fonctionnelle) organisés en lobes. Les testicules situés en dessous du cœur, reposent sur

l'hépatopancréas. Les spermatozoïdes sont évacués vers les spermiductes qui débouchent sur les pores génitaux situés à la base de la 5ème paire de péréiopodes (pattes ambulatoires). Les cellules épithéliales des spermiductes sécrètent l'enveloppe du spermatophore qui vient entourer les spermatozoïdes. Comme chez les femelles la GIH participe à la régulation du développement des organes génitaux et de la spermatogenèse. Il existe également l'hormone androgène sécrétée par la glande androgène (glande endocrine fixée sur l'ampoule terminale du spermiducte). L'hormone androgène induit la différenciation mâle chez les animaux juvéniles; en son absence (ablation de la glande androgène), le jeune mâle se différencie en femelle (Charniaux Cotton et Payen, 1988). Chez les mâles pubères, les endopodites de la première paire de pléopodes se joignent pour former le pétasma (Figure I-11b). Cet organe intervient lors de la copulation pour le transfert des spermatophores.



3. Technologie d'élevage en biofloc

3.1 Principe de l'élevage en biofloc

Le principe de l'élevage en biofloc est de développer dans la colonne d'eau une population diversifiée de microorganismes comprenant des micro-algues, du zooplancton et des bactéries. Ces micro-organismes jouent le rôle d'un filtre biologique en pleine eau en dégradant la matière organique en excès et en éliminant les formes azotées toxiques pour la crevette. Le système d'élevage en biofloc ne nécessite donc peu ou pas de renouvellement de l'eau mais en contrepartie il doit être constamment oxygéné et remis en suspension. En outre, la microfaune et la microflore dont les bactéries constituent un complément alimentaire riche en nutriments et oligo-éléments essentiels pour les crevettes. Le développement des bactéries hétérotrophes qui représentent une source nutritionnelle en protéines est favorisé par l'ajustement du rapport C :N du milieu d'élevage : le C :N optimal se situe entre 10 :1 et 22 :1 (Avnimelech, 2009). Ce rapport C/N est ajusté, dans la plupart des cas, par l'ajout au milieu d'élevage d'une source de carbone sous forme de carbohydrate (mélasse de canne, amidon, tapioca...). Cependant, l'utilisation d'un aliment artificiel faible en protéines favorise également l'élévation du rapport C/N (Avnimelech, 1999). A titre d'exemple, des aliments à 30% et 40% de protéines présentent respectivement un rapport C/N de 13 :1 et de 8 :1. Un schéma du fonctionnement d'un biofloc est présenté dans la Figure I-12.

“Aquaculture using bioflocs technology (BFT) offers a solution to both problems. It combines the removal of nutrients from the water with the production of microbial biomass, which can in situ be used by the culture species as additional food source” (De Schryver et al., 2008).

3.2 Applications du système en biofloc à l'élevage de la crevette

Initiée au Centre Océanologique du Pacifique dans les années 1980 (Blancheton *et al.*, 1987), cette méthode d'élevage est actuellement très utilisée dans le monde pour les élevages en grossissement de crevettes et de tilapias. Le système d'élevage en biofloc confère de nombreux avantages.

En termes de biosécurité, la technique en biofloc est particulièrement appropriée dans la mesure où les échanges d'eau entre le milieu d'élevage et l'environnement extérieur sont minimales. Cette technique d'élevage réduit de façon considérable les risques d'entrée de pathogènes tout en minimisant les impacts sur l'environnement. Dans le contexte actuel de la crevetticulture mondiale, avec l'émergence de nouvelles maladies comme l'« *Acute hepatopancreatic necrosis disease* » (AHPND), l'élevage en biofloc pourrait représenter une solution d'avenir (Browdy *et al.*, 2014).

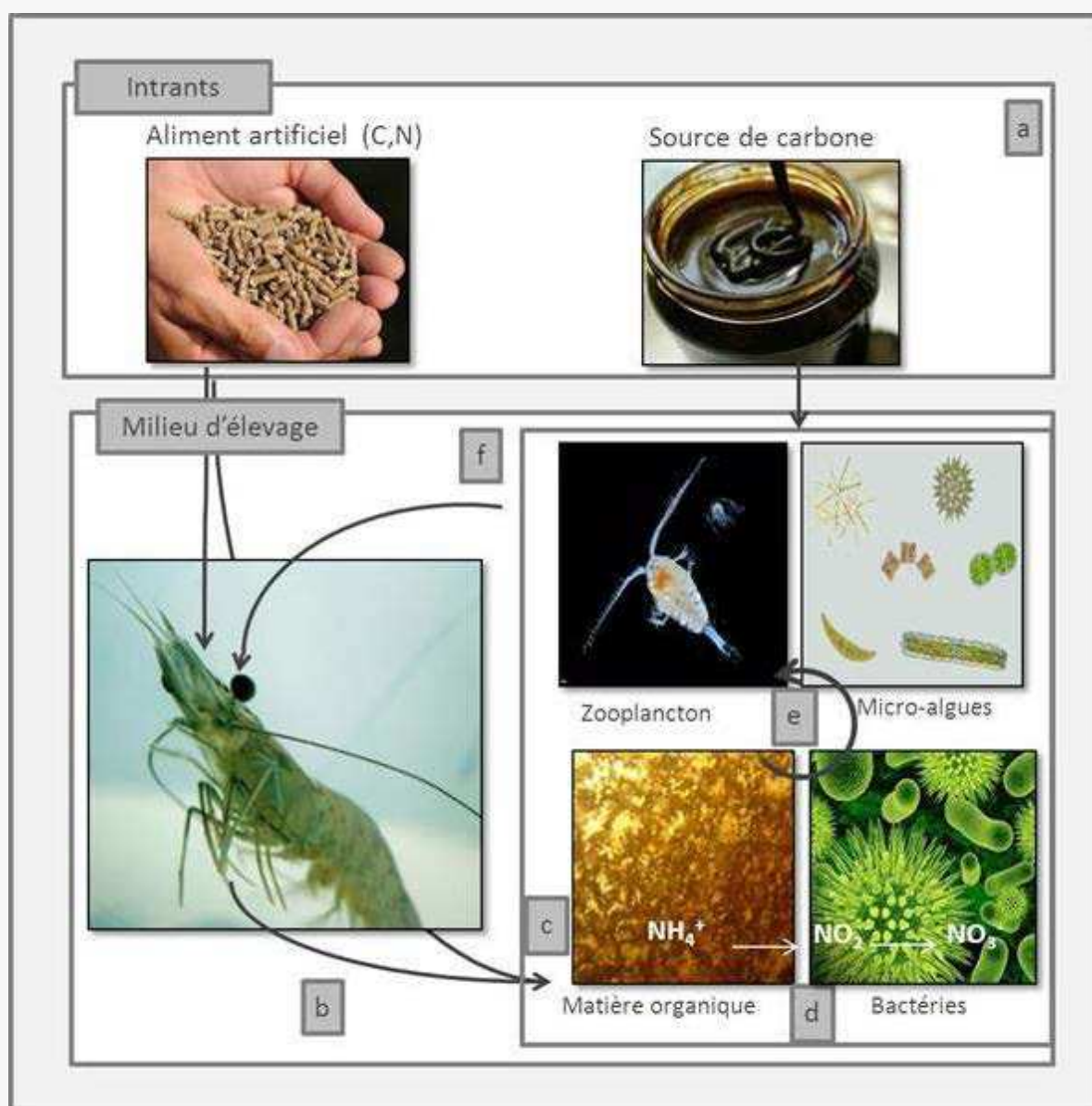


Figure I-12 : Représentation schématique du fonctionnement d'un système d'élevage en biofloc.

a : Nourrissage de la crevette avec de l'aliment artificiel; contribution au développement du biofloc (principalement des bactéries hétérotrophes) par ajout d'une source de carbone (mélasse de canne dans le cadre de cette thèse) b : Consommation d'une partie de l'aliment artificiel par la crevette ; Production d'ammoniac (NH_4^+) par l'excrétion et la production de fèces de la crevette c : Accumulation de matières organiques issues des crevettes et de l'aliment artificiel non consommé (NH_4^+) d : Conversion de NH_4^+ en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-) par les bactéries e : mise en place d'un réseau trophique de la matière organique au zooplankton f : Consommation du biofloc (source de protéines microbiennes) par la crevette (Schéma d'E.Cardona ; photos de C.Geffroy et photos libres de droits).

En termes nutritionnel, l'élevage en biofloc procure aux animaux un complément d'aliment naturel composé de matières organiques et de microorganismes. En termes de rendement, l'élevage en biofloc est un système hautement intensifié, les biomasses de crevettes finales pouvant atteindre 7 à 10 $kg.m^{-3}$ (Otoshi *et al.*, 2007 ; Mishra *et al.*, 2008 ; Arnold *et al.*, 2009) alors que dans un système semi-intensif traditionnel, tel que pratiqué en Nouvelle-Calédonie, les charges en fin d'élevage vont de 200 à 400 $g.m^{-2}$.

Différents types de systèmes d'élevage ont été développés et appliqués à l'aquaculture commerciale (Figure I-13). Cependant, on reconnaît deux grands types d'élevage en biofloc : le biofloc mixotrophe et le biofloc hétérotrophe. L'élevage en biofloc mixotrophe est exposé à la lumière naturelle et se fait dans différents types d'enceintes : bassins avec liner en extérieur, raceways sous serres. Dans ces conditions, le biofloc qui se développe est un mélange complexe de matière organique associée à des bactéries, des micro-algues et du zooplancton. La présence de micro-algues donne une couleur verte à rouge au biofloc qui pour cette raison est nommé « biofloc vert ». Le système de biofloc mixotrophe est le plus répandu au niveau mondial en production commerciale des crevettes Pénéides. La Figure I-12 résume le principe de fonctionnement d'un élevage en biofloc mixotrophe. L'élevage en biofloc hétérotrophe se fait dans l'obscurité ; il est basé uniquement sur le développement bactérien. Du fait de sa couleur brune, ce système d'élevage est appelé « biofloc marron ».

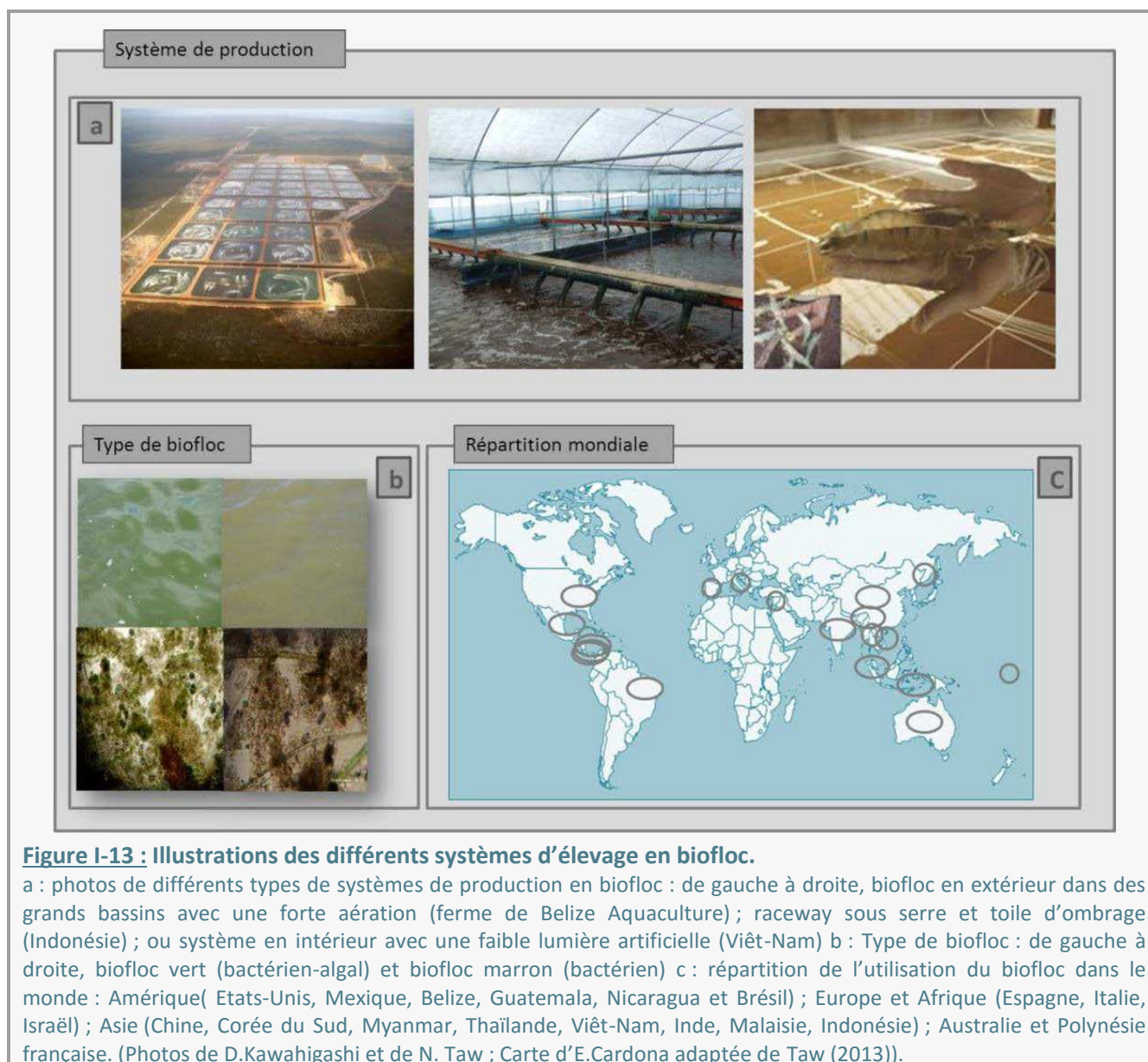


Figure I-13 : Illustrations des différents systèmes d'élevage en biofloc.

a : photos de différents types de systèmes de production en biofloc : de gauche à droite, biofloc en extérieur dans des grands bassins avec une forte aération (ferme de Belize Aquaculture) ; raceway sous serre et toile d'ombrage (Indonésie) ; ou système en intérieur avec une faible lumière artificielle (Viêt-Nam) b : Type de biofloc : de gauche à droite, biofloc vert (bactérien-algal) et biofloc marron (bactérien) c : répartition de l'utilisation du biofloc dans le monde : Amérique (Etats-Unis, Mexique, Belize, Guatemala, Nicaragua et Brésil) ; Europe et Afrique (Espagne, Italie, Israël) ; Asie (Chine, Corée du Sud, Myanmar, Thaïlande, Viêt-Nam, Inde, Malaisie, Indonésie) ; Australie et Polynésie française. (Photos de D.Kawahigashi et de N. Taw ; Carte d'E.Cardona adaptée de Taw (2013)).

3.3 Caractéristique et composition du biofloc

Les particules du biofloc, dont la taille peut être supérieure à 1000µm, sont composées d'une mixture hétérogène de microorganismes, cellules mortes, particules colloïdes, polymères organiques, cations (Jorand *et al.*, 1995). Les microorganismes associés aux particules de biofloc comprennent :

- des bactéries libres ou attachées ; la taille des individus est de l'ordre de 1µm (Madigan et Martinko, 2006),
- des micro-algues,
- du zooplancton : copépodes, rotifères, ciliés, protozoaires flagellés, nématodes (Azim et Litle, 2008 ; Ballester *et al.*, 2010).

Les particules de biofloc présentent des formes irrégulières et ont une large distribution de tailles ; elles sont facilement compressibles et très poreuses (jusqu'à plus de 99% de porosité) et sont perméables aux fluides (Chu et Lee, 2004). La particule typique du biofloc est composée de 2-20% de microorganismes vivants, de 60-70% de matière organique et de 30-40% de matière inorganique (Wilén *et al.*, 2003).

La floculation des communautés microbiennes est un processus complexe qui reste encore largement inconnu. La matrice du biofloc est composée de substances polymériques extracellulaires qui encapsulent les cellules microbiennes, et jouent un rôle majeur dans la liaison des composants des floculats (De Schryver *et al.*, 2008).

Les bactéries

Le biofloc est composé d'une concentration en bactéries hétérotrophes allant de 10^5 à 10^9 bactéries.mL⁻¹ d'eau selon les auteurs (Burford *et al.*, 2003 ; Avnimelech, 2009 ; Kim *et al.*, 2013). Par contre, les bactéries de genre *Vibrio* sont faiblement représentées (Souza *et al.*, 2014). Or, les *Vibrio* sont réputés dans la littérature pour être extrêmement abondants et souvent majoritaires dans les milieux marins (Saulnier *et al.*, 2000). Il semble donc que le biofloc soit néfaste au développement des *Vibrio* ; cette observation est d'autant plus intéressante qu'un grand nombre de pathogènes bactériens pour les crevettes appartient au genre *Vibrio* (Saulnier *et al.*, 2000). Deux raisons principales peuvent expliquer cette faible proportion de *Vibrio* dans les bioflocs :

- la première est la forte compétition pour les sites d'adhésion avec les bactéries hétérotrophes, très présentes dans le système en biofloc;
- la seconde explication a trait au quorum sensing (QS) qui module la virulence des *Vibrio* (Milton, 2006 ; Defoirdt *et al.*, 2008) et qui serait perturbé par la forte abondance des bactéries hétérotrophes. C'est ainsi

que Crab *et al.* (2010b), expliquent l'action protectrice du biofloc vis-à-vis d'*Artemia franciscana* infecté par *Vibrio harveyi*.

Le système en biofloc étant basé sur un très faible taux de renouvellement de l'eau, les déchets azotés s'accumulent dans le milieu d'élevage sous la forme d'ammonium (NH_4^+). Les bactéries du biofloc contribuent à éliminer l'ammonium suivant deux voies :

La première est la nitrification assurée par des bactéries chémo-autotrophes qui réduisent l'ammonium en nitrite (NO_2^-) puis en nitrate (NO_3^-). Les nitrates sont moins toxiques pour les animaux aquatiques que l'ammonium et le nitrite. La seconde voie est assurée par les bactéries hétérotrophes qui utilisent l'ammonium comme source d'azote pour leur synthèse protéique (Ebeling *et al.*, 2006 ; Hargreaves, 2006).

Dans le système biofloc, la nitrification est donc assurée par les bactéries chémo-autotrophes et hétérotrophes ainsi que par le phytoplancton comme nous le verrons ci-après (Ebeling *et al.*, 2006 ; Hargreaves *et al.*, 2006). La part prise dans ce processus par les différents microorganismes fait débat. Cohen *et al.* (2005) considèrent que la photosynthèse et l'utilisation de l'ammonium par les bactéries hétérotrophes sont les principales voies d'élimination des déchets toxiques de l'azote. Pour leur part, Vinatea *et al.* (2010) trouvent que la nitrification opérée par les bactéries chémo-autotrophes et l'utilisation de l'ammonium par les bactéries hétérotrophes sont les deux principaux processus de régulation des déchets azotés dans le système d'élevage en biofloc.

Les micro-algues

La présence des micro-algues dans le système en biofloc est fonction de la lumière disponible. D'après Schrader *et al.* (2011), les communautés phytoplanctoniques qui se développent dans les biofloc en extérieur sont dominées par de petites colonies unicellulaires à croissance rapide telles que les algues vertes (chlorophytes) et les diatomées (bacillariophytes) et à croissance lente telles que les cyanobactéries. Plusieurs espèces d'algues, plus particulièrement les diatomées, sont nutritives et peuvent être profitables à la croissance des crevettes en apportant un complément nutritionnel en acides aminés et acides gras polyinsaturés essentiels (Moss *et al.*, 2001 ; Ju *et al.*, 2008a). Cependant, on trouve également des cyanobactéries dont certaines sont capables de produire des toxines qui peuvent affecter la croissance des crevettes voire causer leur mort (Alonso-Rodriguez et Paéz-Osuna, 2003 ; Zimba *et al.*, 2006).

Les micro-algues assimilent l'azote sous formes d'ammonium et de nitrate (Burford *et al.*, 2003 ; Cohen *et al.*, 2005) et contribuent ainsi à réguler l'accumulation des déchets azotés potentiellement toxiques pour les crevettes en élevage. Elles viennent renforcer les processus décrits supra assurés par les bactéries

chémo-autotrophes et hétérotrophes. Cependant, les bioflocs basés sur le développement des micro-algues subissent de fortes variations nycthémérales de l'oxygène dissous et du pH.

Le zooplancton

En haut de la chaîne trophique du biofloc se trouve le zooplancton qui consomme les bactéries et les micro-algues associées à la matière organique particulaire. Le zooplancton est principalement constitué de copépodes, de rotifères, de ciliés, de protozoaires flagellés et de nématodes (Azim et Little, 2008 ; Ballester *et al.*, 2010). Le zooplancton tel que les rotifères représente un complément alimentaire qui contribue significativement à couvrir les besoins de la crevette en énergie et protéines (Focken *et al.*, 1998). Cependant, le zooplancton des systèmes en biofloc a fait l'objet de très rares études ; les connaissances de la diversité et de la dynamique de ce groupe zoologique dans les élevages en biofloc restent excessivement parcellaires.

3.4 Biofloc et nutrition de la crevette

De nombreuses études montrent un effet bénéfique du biofloc sur la croissance des animaux (Browdy *et al.*, 2001 ; Burford *et al.*, 2004 ; Wasielesky *et al.*, 2006 ; Xu et Pan, 2012). Cet effet est dû au complément alimentaire provenant de la productivité naturelle du biofloc composée de matières organiques et de biomasse microbienne (bactéries, micro-algues, zooplanctons) (Moss et Pruder, 1995 ; Epp *et al.*, 2002 ; Tacon *et al.*, 2002 ; Burford *et al.*, 2004 ; Hari *et al.*, 2006 ; Spolaore *et al.*, 2006 ; Avnimelech, 2007 ; Ju *et al.*, 2008a). La consommation de la productivité naturelle par les organismes cultivés augmente l'efficacité générale de l'utilisation de l'aliment granulé dont les pertes (fèces, ammonium, granulé non consommé...) sont recyclées par la boucle microbienne en aliment naturel pour la crevette (Burford *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 2005 ; Wasielesky *et al.*, 2006 ; Hargreaves, 2006). De plus, la disponibilité constante de cette productivité naturelle dans le milieu d'élevage permet à l'animal de se nourrir en continu (Avnimelech, 1999).

La part de la productivité naturelle du biofloc dans l'alimentation de la crevette a été estimée par la mesure des isotopes stables de carbone et de l'azote (Epp *et al.*, 2002 ; Burford *et al.*, 2004 ; Avnimelech, 2007 ; Avnimelech et Kochba, 2009). Cette technique présente cependant plusieurs limitations car la distinction isotopique des différentes sources d'aliment peut s'avérer être difficile dans un système fermé tel que le biofloc où les déchets organiques sont recyclés par la boucle microbienne. En effet, les études avec les isotopes stables nécessitent de bien connaître la signature isotopique des différentes sources alimentaires et celle-ci doit être suffisamment différente d'un aliment à l'autre pour permettre de les discriminer et de calculer leurs contributions relatives (Epp *et al.*, 2002). Pour pallier à cette difficulté, certains auteurs ont utilisé des sources de carbone et de l'azote enrichies en isotopes lourds comme traceurs. Ainsi, Epp *et al.*

(2002) ont montré que 31% de l'azote et 50% du carbone assimilés pour la croissance par la crevette proviennent de la productivité naturelle. Burford *et al.* (2004) estiment, pour sa part, que 18 à 29% de l'azote assimilé par la crevette résulte de la productivité naturelle.

Le complément alimentaire provenant de la productivité naturelle du biofloc permet de faire des économies sur l'aliment granulé dont la concentration en protéines peut être abaissée (Wasielesky *et al.*, 2006 ; Xu et Pan, 2013a). Browdy *et al.* (2001) ont ainsi montré, chez la crevette *Litopenaeus vannamei* élevée en biofloc, que la baisse du taux de protéines de l'aliment granulé de 45% à 30% n'induisait aucun ralentissement de la croissance. Enfin, en comparant des aliments de différents teneurs en protéines (31,15% ; 21,6% ; 18,45% ; 16,25%) chez la crevette *Penaeus Semisulcatus* élevée en biofloc, Megahed (2010) a montré que l'aliment le moins dosé à 16,25% de protéines contribuait à une meilleure qualité de l'eau de l'élevage et représentait le meilleur rapport coût/bénéfice.

D'autres auteurs ont incorporé du biofloc concentré directement dans l'aliment granulé en remplacement partiel des farines de poisson ou de soja pour nourrir les crevettes (Kuhn *et al.*, 2009, 2010 ; Shyne-Anand *et al.*, 2013 ; Bauer *et al.*, 2012). Ces auteurs ont ainsi montré deux choses : la première est que le biofloc possède des propriétés bioactives qui stimulent la croissance des animaux (Ju *et al.*, 2008a), la seconde est que le biofloc peut remplacer partiellement ou totalement la farine de poisson dans un régime artificiel.

La valeur nutritionnelle du biofloc répond généralement bien aux besoins des crevettes Pénéides (Burford *et al.*, 2004 ; Wasielesky *et al.*, 2006 ; Ju *et al.*, 2008b ; Xu et Pan, 2013a). Cependant, cette valeur nutritionnelle est très variable suivant le système de biofloc (Tableau I-3) et pour un même système, elle évolue avec le temps.

Table I-3 : Composition biochimique du biofloc selon différents auteurs.

Résultats exprimés en % de matière sèche.

Auteurs	Protéines brutes (%)	Lipides (%)	Carbohydrates (%)	Cendres (%)
McIntosh <i>et al.</i> (2000)	43	12,5	-	26,5
Tacon <i>et al.</i> (2002)	31,2	2,6	-	28,2
Wasielesky <i>et al.</i> (2006)	31,07	0,49	23,59	44,85
Azim et Little (2008)	37,93-38,41	3,16-3,23	-	11,83-13,38
Megahed (2010)	19,8-20,1	11,6-11,9	-	-
Xu et Pan (2012)	25,61-31,14	2,17-2,66	-	27,12-38,87
Becerra-Dórame <i>et al.</i> (2012)	17,5	6,5	34,9	41,1

Ju *et al.* (2008a) et Xu et Pan (2012) suggèrent une relation entre la valeur nutritionnelle du biofloc et les microorganismes prédominants dans le milieu d'élevage. L'exemple le plus évident est celui des lipides. En

effet, un biofloc à dominance bactérien apportera peu de lipides avec très peu d'acides gras polyinsaturés (AGPI) (Crab *et al.*, 2010a ; Shyne-Anand *et al.*, 2013). A l'inverse, des bioflocs mixotrophes à dominance phytoplanctonique peuvent être une source significative de lipides riches en AGPI, les micro-algues étant plus riches en AGPI que les bactéries (Meyers et Latscha, 1997 ; Zhukova et Kharlamenko, 1999).

Enfin, des auteurs ont montré une stimulation des activités enzymatiques du tractus digestif (amylase, protéase, lipase et cellulase) chez les animaux élevés en biofloc (Xu et Pan, 2012 ; Xu *et al.*, 2013 ; Becerra-Dórame *et al.*, 2012) ou chez ceux nourris avec du biofloc concentré incorporé dans l'aliment granulé (Shyne-Anand *et al.*, 2013). L'élévation de l'activité des enzymes digestives peut s'expliquer de deux façons : la première est que le biofloc ingéré apporte un complément d'enzymes exogènes (Xu et Pan, 2012), la seconde est une stimulation par le biofloc de la production endogène de ces enzymes (Shyne-Anand *et al.*, 2013).

3.5 Biosécurité et santé de la crevette des élevages en biofloc

Browdy *et al.* (2014) estiment que le système d'élevage en biofloc réduit l'incidence et la sévérité des épidémies qui affectent les élevages de crevettes et de poissons. Cela s'explique d'une part parce que le système en biofloc procure un niveau maximal de biosécurité aux élevages, du fait de l'absence de renouvellement d'eau, et d'autre part l'apport trophique du système contribue à la santé des animaux qui de ce fait résistent mieux aux agents pathogènes.

Biosécurité

“Biosecurity in aquaculture has been defined as the sum of all procedures in place to protect living organisms from contracting, carrying, and spreading diseases and other non-desirable health conditions” (Moss et al., 1998).

L'échange d'eau est une des principales voies d'entrée et de sortie de maladies et/ou d'organismes pathogènes. Ainsi, la méthode d'élevage en biofloc s'est avérée être une solution à ce risque puisqu'elle nécessite un minimum d'échange d'eau. Pour illustrer ce fait, Taw (2013) rapporte un épisode de mortalité causé par le virus du white spot (WSSV) en Indonésie où seules les fermes dont les élevages se faisaient en biofloc étaient sorties indemnes.

Santé de l'animal

De nombreux résultats de recherches convergent et montrent un effet bénéfique du biofloc sur la survie des animaux (Avnimelech, 2009). Il semblerait en effet que les animaux élevés en biofloc sont en meilleure

santé et présentent une plus grande résistance aux agents pathogènes (Avnimelech, 2009 ; Avnimelech, 2013 ; Taw, 2013). Récemment, des études ont montré une stimulation de l'immunité non spécifique caractérisée par l'activation de la cascade prophenoloxydase et l'augmentation du nombre des hémocytes circulants et de leur capacité de phagocytose chez les crevettes élevées en biofloc (Kim *et al.*, 2013 ; Xu et Pan, 2013b ; Ekasari *et al.*, 2014). Ekasari *et al.* (2014) ont également montré une augmentation de la cascade prophenoloxydase chez les animaux provenant d'élevage en biofloc et infectés par le virus myonécrose.

Ces résultats découleraient de la consommation par la crevette (i) de composants bioactifs contenus dans le biofloc tels que des vitamines, des caroténoïdes, des enzymes, des phytostérols et des photopigments (Burford *et al.*, 2004 ; Ju *et al.*, 2008a) et/ou (ii) de microorganismes probiotiques qui modèleraient les défenses immunitaires de l'hôte (Johansson et Söderhäll, 1985 ; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Jang *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2013 ; Avnimelech, 2013).

Probiotics are “a live microbial adjunct which has a beneficial effect on the host by modifying the host-associated or ambient microbial community, by ensuring improved use of the feed or enhancing its nutritional value, by enhancing the host response towards disease, or by improving the quality of its ambient environment” (Verschuere et al., 2000).

3.6 Biofloc et reproduction

Les recherches sur l'élevage de géniteurs des crevettes Pénéides en biofloc sont très récentes (Huber *et al.*, 2010 ; Goguenheim, 2010 ; Chim *et al.*, 2010 ; Emerenciano *et al.*, 2012) et nombre de résultats originaux sur le sujet seront présentés dans cette thèse. Les tous premiers essais d'élevage en biofloc de reproducteurs de la crevette *L. stylirostris* ont été réalisés en 2004 au centre de l'Ifremer de Tahiti (Goguenheim et Chim, 2009). Depuis cette date, une quinzaine de générations de reproducteurs de *L. stylirostris* ont été produites par la technique du biofloc avec des résultats tout à fait prometteurs tant au niveau du grossissement qu'au niveau de la reproduction (Goguenheim et Chim, 2009).

4. Contexte, objectifs et démarche de la thèse

4.1 Intitulé de la thèse et encadrement

La thèse s'intitule « Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris* : étude de paramètres de la nutrition, de l'immunité et de la reproduction ». Cette thèse a démarré le 9 mars 2012. Elle a été réalisée sous la direction de Dr Liêt Chim (Ifremer, Nouvelle-Calédonie) et Dr Laurent Wantiez (Université de Nouvelle-Calédonie). Dr Denis Saulnier (Ifremer, Tahiti), Dr Yannick Gueguen (Ifremer, Tahiti et Montpellier) et Dr Chantal Cahu (Ifremer, Direction Scientifique, Brest) ont contribué à l'encadrement scientifique de cette thèse.

4.2 Présentation des sites d'accueil

Cette thèse s'est déroulée à l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer). L'Ifremer est un établissement public à caractère industriel et commercial né de la fusion de deux organismes, le CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans) et l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes) par décret du 5 juin 1984. Dans le cadre de cette thèse, les expérimentations ont été conduites dans les deux sites du centre Ifremer du Pacifique l'un situé à Tahiti en Polynésie Française et l'autre en Nouvelle-Calédonie. Les sites sont présentés dans la Figure I-14.

Unité de recherche de Polynésie française

L'unité de recherche de Polynésie française est située dans la commune de Taïarapu-Ouest, à Vairao sur la presqu'île de Tahiti (-17.805271, -149.293445). Elle a pour principale vocation la recherche en appui au développement des filières aquacoles locales : la crevetticulture, la pisciculture avec un effort prioritaire porté sur la perliculture. Actuellement, une trentaine de chercheurs et techniciens, bénéficiant d'un support logistique et administratif, travaille au sein de cette unité. Les recherches portant sur la crevetticulture sont menées en collaboration, dans le cadre d'une convention, avec la Direction des Ressources Marines et Minières de Polynésie française (DRMM) et ont pour but principal de développer, d'optimiser et de valoriser de nouvelles techniques d'élevage de la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Les recherches portent essentiellement sur l'élevage de crevette en cages lagunaires. Ces travaux sont rattachés au projet crevetticulture de l'Ifremer géré par la station de Nouvelle-Calédonie.

Centre Technique Aquacole VAIA (CTA – Tahiti)

Le Centre Technique Aquacole (CTA) VAIA géré par la Coopérative des Aquaculteurs de Polynésie Française (CAPF) a été le site d'accueil des expérimentations zootechniques menées à Tahiti. Il a ouvert en

septembre 2011. Il a essentiellement un rôle de production de post-larves de crevettes *Litopenaeus stylirostris* et d'alevins de *Platax orbicularis* à destination des aquaculteurs polynésiens. Six employés permanents travaillent au sein du CTA.

La réalisation de cette thèse a bénéficié d'un fort appui en personnels et logistique du CTA qui nous a mis à disposition deux zones expérimentales : l'une comprenant 12 bacs de 25m³ et l'autre équipée de 36 bacs de 250L (Figure I – 14c et d).

Station de Nouvelle-Calédonie

Le département Lagons Ecosystème et Aquaculture Durable de Nouvelle-Calédonie (LEAD NC) est réparti sur 2 sites : (i) la station expérimentale de St Vincent se situant à 80 km au nord de Nouméa, sur la presqu'île de Beupré de la commune de Boulouparis (ii) des bureaux localisés à Nouméa regroupant l'unité administrative et les équipes de recherches « aires marines protégées », « micro-algues » et « modélisation ». L'unité de recherche LEAD NC comprend une trentaine de cadres de recherche, techniciens et administratifs. Les programmes de recherche du LEAD sont inscrits dans le contrat de Développement Etat/Inter-collectivités.

Les recherches en crevetticulture sont réalisées à la station de St Vincent en collaboration, sur certaines thématiques, avec les laboratoires de l'Institut de recherche et développement (IRD) et de l'Université (UNC) en Nouvelle Calédonie et les laboratoires Ifremer de métropole. Depuis 2012, les infrastructures de la station de St Vincent sont gérées par le Centre Technique Aquacole (CTA) calédonien qui dépend de l'Agence de Développement Économique de la Nouvelle-Calédonie (ADECAL). Le programme actuel de recherche en crevetticulture DEDUCTION (DEveloppement DURable de la Crevetticulture, Traitement de l'Information et Observatoire du système en Nouvelle-Calédonie) a débuté en 2007.

Le programme DEDUCTION s'articule autour de 4 thématiques complémentaires ; chacune d'elle étant portée par une équipe :

- Ecophysiologie et nutrition - Cette thèse est rattachée à cette thématique qui s'intéresse à quelques aspects de la physiologie de la crevette (nutrition, osmorégulation, respiration, stress oxydant...) en interaction avec son environnement d'élevage.

- Environnement - Les travaux portent ici sur l'environnement bassin de la crevette et les impacts des élevages sur l'environnement côtier (mangrove et lagon).

- Pathogènes Infection et Epidémiologie – les recherches sur cette thématique s'intéressent, en particulier, aux *Vibrios penaeicida* et *nigripulchritudo* mis en causes dans les syndromes d'été et 93 à l'origine de mortalités des animaux dans les fermes.

- Zootechnie - il s'agit ici d'une activité transversale menée en soutien aux autres thématiques, en fournissant les crevettes nécessaires aux expérimentations.

Les expérimentations réalisées, dans le cadre de cette thèse en Nouvelle-Calédonie, l'ont été à la station de St Vincent sur deux zones expérimentales (Figure I-14 e et f) : une zone de 16 bacs de 500L et une serre contenant 9 bacs de 4m³.



Figure I-14 : Présentation des deux sites de réalisation de la thèse et des zones expérimentales utilisées

a : Centre Ifremer (à droite) et Centre Technique Aquacole (à gauche) situés à Vairao (Tahiti) b : station Ifremer de Saint Vincent située à Boulouparis (NC). - Zone expérimentale de Tahiti située au Centre Technique Aquacole- c : zone de 36 bacs d'une capacité de 250L ; d : zone de 12 bacs d'une capacité de 25m³. Zone expérimentale de Nouvelle- Calédonie – e : zone de 16 bacs d'une capacité de 500L ; f : serre abritant 9 bacs de 4m³ - (Photo d'Ifremer et E.Cardona).

4.3 Contexte de la thèse

Cette thèse est co-financée par l'Ifremer dans le cadre d'un partenariat entre la Nouvelle-Calédonie (Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie ; les provinces Sud, Nord et des îles) et la Polynésie française (DRMM). Le développement de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie et en Polynésie française ne se situe pas à la même échelle et l'ordre des difficultés est différent.

En Nouvelle-Calédonie, l'activité crevetticole représente aujourd'hui le second secteur à l'exportation, bien derrière le Nickel, et génère un chiffre d'affaires moyen de 20 millions d'euros. Cependant, l'activité est confrontée depuis quelques années à des difficultés biotechniques au niveau des écloséries qui empêchent la production en quantité et en qualité de post-larves nécessaires à l'ensemencement des fermes d'élevage. Au centre de ces difficultés se situe l'élevage des géniteurs et leur reproduction en captivité. Actuellement, l'élevage extensif en bassin de terre des géniteurs de *L. stylirostris* pose des problèmes à deux niveaux. Le premier concerne la qualité extrêmement variable des animaux produits et le second touche au domaine de la biosécurité. La principale raison à ces problèmes réside dans l'utilisation de bassins ouverts de grandes dimensions où l'éleveur dispose de peu de moyens de contrôle de la qualité de l'eau (renouvellement d'eau et fertilisation) en vue de conformer les paramètres d'élevage (température, salinité, oxygène dissous ...) aux besoins physiologiques des animaux. Cela est d'autant plus important que nous connaissons l'extrême sensibilité de la crevette *L. stylirostris* aux conditions de son habitat qui peuvent compromettre sa survie et sa reproduction (Chim *et al.*, 2008). En effet, les animaux reproducteurs, élevés suivant le protocole actuel, doivent faire face à de nombreuses agressions de leur environnement. Il s'agit notamment de la température quand elle fluctue de façon importante en marge ou en dehors du préférendum thermique de l'espèce (Lemaire *et al.*, 2002). Par ailleurs, le système d'élevage extensif des géniteurs en bassin de terre est très peu productif car il reçoit peu d'intrant en matières organiques ; il n'est donc pas rare, dans ces conditions, que l'eau des bassins soit claire pouvant conduire *in situ* à des situations dommageables pour la crevette comme par exemple une exposition stressante à la lumière du soleil, une élévation excessive de la température de la colonne d'eau et/ou le développement d'algues benthiques qui participent à la réduction du fond du bassin. Dans ce système traditionnel, la biosécurité est également mise à mal du fait que l'élevage se déroule dans des bassins ouverts, nécessitant des renouvellements de grands volumes d'eau (jusqu'à 30% par jour), construits sur le même site que la ferme où sont produits en masse les animaux pour la consommation. Dans ces conditions, il existe des risques de contamination entre les élevages de finalité différente. Le modèle calédonien de production en extensif des géniteurs est donc, pour toutes les raisons évoquées précédemment, de plus en plus remis en question. La filière calédonienne souhaite aujourd'hui sécuriser sa production de post-larves et pour cela elle cherche à fiabiliser l'élevage des géniteurs. Les objectifs spécifiques de cette filière géniteurs sont de :

- Biosécuriser la souche calédonienne en cas de crise sanitaire,
- Sécuriser la filière géniteurs par la mise en œuvre de techniques d'élevage hors sol,
- Garantir l'approvisionnement en nauplii.

En Polynésie française, une stratégie de développement aquacole durable a été élaborée depuis quelques années par la DRMM et son ministère de tutelle. De nombreuses actions ont été mises en place par l'ensemble des parties prenantes du secteur aquacole (DRMM, Ifremer, CAPF). La principale action a été la construction d'une écloserie du Pays (Centre Technique Aquacole VAIA) cofinancée par l'Etat Français et la Polynésie française. Dans ce contexte, les filières aquacoles basées sur l'approvisionnement en post-larves issues de l'écloserie doivent en priorité augmenter leurs productions. Actuellement trois fermes polynésiennes sont en exploitation pour une production annuelle de 90 tonnes par an sur une superficie de 9 hectares alors que la demande locale est estimée à 600 tonnes par an. En mars 2011, l'import de Crustacés, porteurs de maladies reconnues sur le territoire polynésien, a été arrêté afin de protéger la souche polynésienne de crevettes. Les autorités locales souhaitent profiter de cette fermeture d'import pour développer la filière crevetticole locale avec pour objectif à court terme une production annuelle de 300 à 400 tonnes. Cependant, la principale difficulté est le manque de foncier nécessaire à la construction de nouvelles fermes. En même temps, les autorités polynésiennes souhaitent que ce développement se fasse dans le respect de l'environnement. Dans ce contexte, une stratégie pourrait être d'intensifier les élevages à travers un système ne nécessitant pas de renouvellement d'eau. Un tel système d'élevage existe, c'est le biofloc (voir supra) mis au point par l'Ifremer à Tahiti dans les années 80 et que la Polynésie française envisage d'appliquer dans des fermes commerciales.

Il est intéressant de noter que le système d'élevage en biofloc pourrait répondre aux attentes différentes de la Nouvelle-Calédonie et de la Polynésie française. L'élevage en biofloc pourrait résoudre les difficultés rencontrées avec la production de géniteurs de la filière calédonienne et l'intensification des élevages dans le respect de l'environnement pour la filière polynésienne.

Bien que la technique d'élevage en biofloc ait été mise au point par le Centre Océanologique du Pacifique (COP) dans les années 80, elle n'est pas encore complètement maîtrisée en particulier pour la production d'animaux reproducteurs. Un travail de recherche est donc nécessaire afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce système d'élevage et les interactions du biofloc avec la crevette *Litopenaeus stylirostris*.

4.4 Objectif et démarche de la thèse

La littérature et les précédents travaux des équipes d'Ifremer de Tahiti et de Nouvelle-Calédonie sur l'élevage en biofloc mettaient en avant les bénéfices de ce système aquacole sur la nutrition, la santé et la reproduction des crevettes (Avnimelech, 2009 ; Chim *et al.*, 2010 ; Huber *et al.*, 2010). Au commencement de cette thèse, deux hypothèses étaient avancées pour expliquer ces meilleures performances des élevages en biofloc :

(i) La première est d'ordre nutritionnel, en effet quelques recherches (Tacon *et al.*, 2002 ; Azim et Little, 2008 ; Ju *et al.*, 2008b ; Avnimelech, 2009 ; Crab *et al.*, 2010a) ont montré que les animaux se nourrissent des particules présentes dans le milieu d'élevage qui sont une source d'énergie et de nutriments (acides aminés et acides gras essentiels, vitamines, oligo-éléments...) ainsi que de facteurs de croissance et de probiotiques.

(ii) La seconde hypothèse touche au « bien-être » de l'animal. Un animal élevé dans des conditions de confort physiologique peut attribuer l'énergie nécessaire à son développement et à sa reproduction. Dans le cas contraire, l'animal sera contraint à diriger son énergie pour répondre aux stress environnementaux et ce au dépend de son développement et de sa reproduction.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai choisi d'étudier la première hypothèse. Ainsi, l'objectif général de mon travail était de mieux comprendre le fonctionnement de ce système d'élevage et ses interactions avec la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Dans cet objectif général, j'ai inscrit les objectifs spécifiques suivants :

- Mesurer les gains zootechniques apportés par l'élevage en biofloc (survie, croissance, performances de reproduction et conséquence sur la qualité des larves) ;
- Etudier les interactions trophiques entre le milieu d'élevage et l'animal ; en évaluer l'influence d'une part sur la nutrition, le statut immunitaire et des défenses anti-radicalaires de *L. stylirostris* et d'autre part sur les performances zootechniques rappelées supra.

Notre démarche expérimentale est basée sur la comparaison des élevages en biofloc avec des élevages témoins en eau claire. Les élevages témoins sont en tout point semblables aux élevages en biofloc à l'exception du taux de renouvellement d'eau qui est très supérieur dans les premiers afin d'éliminer la matière organique en excès et ainsi empêcher le développement du biofloc. De la sorte, il nous est possible de déduire les variations, qui sont imputables au biofloc, des différents paramètres zootechniques et biologiques étudiés.

Sur cette base expérimentale, nous montrerons que l'élevage en biofloc améliore les performances zootechniques avec des taux supérieurs de survie, de croissance des animaux et une meilleure capacité de

ponte des femelles. Pour expliquer ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la productivité naturelle du biofloc contribue à la nutrition de la crevette. Pour vérifier cette hypothèse, nous mesurerons, à l'aide des isotopes stables de l'azote et du carbone, la part de cette productivité naturelle dans l'alimentation des animaux. Nous évaluerons également l'influence du biofloc consommé par les animaux sur l'activité et l'expression génique de deux enzymes digestives. Avec la même idée, et pour expliquer l'origine des gains de performances des reproducteurs issus des élevages en biofloc, nous doserons les lipides apportés aux animaux par la productivité naturelle. En effet, les lipides, et particulièrement les phospholipides et les acides gras à longue chaîne polyinsaturée assimilés par la mère, jouent un rôle clef dans la vitellogénèse et le développement embryonnaire et larvaire en phase de lécitotrophie. Au cours de nos expérimentations, nous évaluerons la santé des animaux par le suivi des mortalités et du statut immunitaire et des défenses anti-radicales ; ainsi il nous sera possible de révéler un possible lien entre l'apport trophique du biofloc, la santé des animaux et les performances zootechniques.

La lécitotrophie correspond à la première phase larvaire qui suit directement la fécondation et se caractérise par une utilisation des réserves vitellines pour soutenir le développement de la larve.

Enfin pour clore ce travail de thèse, nous nous intéresserons aux bactéries qui composent le biofloc. Nous savons par la littérature qu'elles sont, en terme de biomasse, prépondérantes dans le biofloc. Elles jouent un double rôle dans l'élevage : (i) consommées par la crevette, elles représentent une source nutritive et peuvent jouer le rôle de probiotique et (ii) dans la colonne d'eau, elles participent à l'élimination des déchets azotés toxiques et au recyclage de la matière organique en excès. Bien que le rôle trophique des bactéries en relation avec la santé des élevages soit très fortement présumé (Xu et Pan, 2013a et b ; Kim *et al.*, 2013 ; Ekasari *et al.*, 2014), très peu d'études ont été effectuées sur le sujet. Dans cette perspective, nous terminerons ce travail de thèse en caractérisant la diversité taxonomique et l'abondance des bactéries du milieu d'élevage en biofloc et nous tâcherons de voir si cette flore bactérienne interfère avec le microbiote intestinal de la crevette.

Partie II - Influence de l'élevage en biofloc sur la nutrition, les défenses immunitaires et anti- radicalaires de la crevette *Litopenaeus stylirostris*

Introduction

Comme nous l'avons vu dans la partie I, le biofloc est décrit dans la littérature comme un système d'élevage bénéfique pour la crevette. Il améliorerait à la fois sa survie (critère de bonne santé), sa nutrition et sa croissance. Cependant, ces conclusions restent pour la plupart basées sur des observations zootechniques ; les mécanismes physiologiques sous-jacents explicatifs de ces résultats sont en effet très peu connus.

D'après la littérature, c'est la contribution de la productivité naturelle dans l'alimentation de la crevette élevée en biofloc qui expliquerait les améliorations observées de son statut nutritionnel et de sa croissance. Sur cette question, les recherches ont été effectuées principalement sur l'espèce *Litopenaeus* (*Penaeus*) *vannamei* (Tacon *et al.*, 2002 ; Burford *et al.*, 2004 ; Vinatea *et al.*, 2010 ; Xu et Pan, 2012, 2013a et b) avec quelques rares travaux sur *Penaeus monodon* (Arnold *et al.*, 2009), et une seule étude sur *Litopenaeus stylirostris* (Emerenciano *et al.*, 2012). Parmi ces recherches, peu ont été menées afin d'évaluer la part de la productivité naturelle du biofloc dans l'alimentation de la crevette. Les quelques études réalisées sur le sujet ont utilisé des aliments enrichis avec des niveaux très élevés de ^{13}C et ^{15}N (isotopes lourds) permettant ainsi une alternative aux marqueurs radioactifs. De cette façon, l'aliment enrichi sert de traceur permettant de distinguer clairement la consommation de l'animal. Ces mesures de l'incorporation du marqueur sur très court terme fournissent une mesure du taux d'ingestion. Cependant, ces analyses réalisées sur une courte échelle de temps de 12 à 24h impliquent une incorporation du marqueur sous des conditions contrôlées ou limitées, fournissant une mesure relativement instantanée de la performance physiologique. En revanche, les études utilisant les isotopes naturellement présents dans les aliments peuvent être conçues pour réaliser des mesures qui intègrent l'ingestion, l'assimilation de l'aliment et la croissance sur une durée plus longue dans les conditions naturelles d'un élevage (Le Vay et Gamboa-Delgado, 2011). Cependant, contrairement aux niveaux très élevés d'isotopes lourds présents dans les aliments enrichis, l'abondance naturelle des isotopes de carbone et d'azote ne permet pas d'obtenir de grandes différences de signatures isotopiques entre les différentes sources alimentaires. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi les isotopes naturellement présents dans les différentes sources d'aliments afin d'avoir une mesure qui prend en compte la croissance de l'animal et les conditions environnementales d'un élevage. Afin de pouvoir discriminer les différentes sources alimentaires dans un biofloc, nous avons construit un protocole expérimental basé sur les valeurs isotopiques contrastées du soja (concentré protéique de soja) et du poisson (farine de poisson) : ainsi, nous avons nourris les animaux avec un aliment à base de soja et enrichi la productivité naturelle avec un mélange riche en farine de poisson. Dans ces conditions, il nous a été possible de clairement discriminer les signatures isotopiques des deux sources alimentaires (productivité naturelle et aliment granulé) de la crevette élevée en biofloc. Enfin, pour estimer la part de la productivité naturelle dans l'alimentation de la

crevette, nous avons utilisé le modèle de Phillips et Gregg (2001). Pour ce faire, nous avons utilisé comme référence des animaux élevés en eau claire avec pour seule source alimentaire le granulé à base de soja et des animaux élevés en biofloc avec pour seule source alimentaire la productivité naturelle enrichie (Article 1).

Le complément alimentaire apporté par le biofloc apparaît stimuler l'activité des enzymes digestives de la crevette *L. vannamei* (Xu et Pan, 2012). Nous avons, dans le cadre de cette étude, souhaité confirmer ce résultat avec la crevette *L. stylirostris* dans nos conditions expérimentales. Pour cela, nous avons cherché à savoir si l'élevage en biofloc influençait les activités enzymatiques du tractus digestif de la crevette *stylirostris* et, si nous confirmions les résultats de Xu et Pan (2012), de chercher à comprendre l'origine de cette stimulation enzymatique qui pourrait être double : production d'enzymes digestives endogènes modulée par le biofloc ingéré et/ou apport exogène par l'aliment naturel consommé. Dans cette perspective, il nous est apparu nécessaire de combiner deux approches, moléculaire et biochimique, afin de pouvoir distinguer le cas échéant, les origines exogène ou endogène des deux enzymes digestives étudiées, l' α -amylase et la trypsine, des animaux élevés en biofloc (Article 1).

Outre l'implication du biofloc dans la nutrition et la croissance de la crevette, de nombreuses recherches montrent son effet bénéfique sur la survie des animaux qui est améliorée par rapport à celle d'animaux provenant des systèmes d'élevage traditionnels intensifs ou semi-intensifs en eau claire (Avnimelech, 2009 ; Xu et Pan, 2012). Il semble en effet que les animaux élevés en biofloc soient en meilleure santé et présentent notamment une plus grande résistance aux agents pathogènes (Avnimelech, 2009 ; Taw, 2013 ; Browdy *et al.*, 2014). Quelques études récentes ont confirmé que les crevettes élevées en biofloc présentent une immunité non spécifique renforcée se traduisant d'une part par l'activation de la cascade prophenoloxdase (Kim *et al.*, 2013) et d'autre part par l'augmentation du nombre des hémocytes circulants et de leur capacité de phagocytose (Xu et Pan, 2013b). Ekasari *et al.* (2014) ont également montré une augmentation de la cascade prophenoloxdase chez les animaux provenant d'élevage en biofloc et infectés par le virus myonécrose. L'évaluation de l'état de santé des crevettes dans le cadre de notre étude a été réalisée par la mesure de l'expression des gènes codant d'une part pour quelques enzymes des défenses anti-radicalaires (super oxyde dismutase, catalase, glutathione peroxydase et glutathione transférase) et d'autre part pour quatre peptides antimicrobiens (peneaidine 2 et 3, lysozyme et crustine). L'expression de ces gènes a été mesurée dans le cadre expérimental chez des animaux exposés à un stress standardisé au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Article 2). Le stress standardisé à l' H_2O_2 a été élaboré et validé par l'équipe de l'Ifremer de St Vincent avant cette thèse (Givaudan, 2008 ; Nicolini, 2011 ; Chim, 2011).

Article 1: Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: assessment by C and N stable isotope ratios and digestive enzymes gene expression and activity.

Emilie Cardona^{1,2}, Bénédicte Lorgeoux¹, Claire Geffroy², Pierre Richard³, Denis Saulnier¹, Yannick Gueguen^{1#}, Gaël Guillou³, Liet Chim².

¹ Ifremer, Unité de recherche Ressources Marines, Centre Océanologique du Pacifique B.P 7004, 98719 Taravao, French Polynesia.

² Ifremer, Unité de recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle Calédonie B.P. 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia.

³Laboratoire Littoral, Environnement et Sociétés, UMR 6250 du CNRS-Université de La Rochelle, 2 Rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.

Present address: Ifremer, UMR 5244 IHPE, UPVD, CNRS, Université Montpellier, F-34095 Montpellier, France.

Article accepté dans le journal *Aquaculture*

Highlights

- Biofloc system promotes growth and survival of shrimps compared to clear water systems.
- Natural productivity contributes to shrimp growth for 39.8% and 36.9%, for C and N, respectively.
- Biofloc shrimps showed higher gene expression and activities of digestive enzyme, α -amylase and trypsin, compared to clear water shrimps.

Abstract

The aim of this study was to assess the relative contribution of natural productivity and compound food to the growth of the juvenile blue shrimp *L. stylirostris* reared in a biofloc system. Two experiments were carried out based on the same protocol with three treatments: clear water with experimental diet (CW), biofloc with experimental diet (BF) and biofloc unfed (BU). Shrimp survival was significantly higher in biofloc rearing than in CW rearing. The contribution of the biofloc to shrimp diet was estimated through measurement of carbon and nitrogen stable isotope ratios in shrimp and food sources. Different isotopic composition between feeds was obtained by feeding natural productivity with a mixture rich in fishmeal and the shrimps with a pellet containing a high level of soy protein concentrate. Using a two source one-isotope mixing model, we found that the natural productivity of the biofloc system contributed to shrimp growth at a level of 39.8% and 36.9%, for C and N, respectively. The natural food consumed by the shrimps reared in the biofloc system resulted in higher gene expression (mRNA transcript abundance) and activities of two digestive enzymes in their digestive gland: α -amylase and trypsin. The growth of shrimps reared in biofloc was, on average, 4.4 times that of those grown in clear water. Our results confirmed the best survival and

promoted growth of shrimps using biofloc technology and highlighted the key role of the biofloc in the nutrition of rearing shrimps.

Key words: biofloc - shrimps - stable isotope - digestive enzyme activities - mRNA level

1. Introduction

Biofloc Technology (BFT) is a rearing system with zero or minimal water exchange which provides two critical services: recycling nutrients and maintaining the water quality and excretion, and providing supplementary food particles from biofloc (Burford *et al.*, 2004; Avnimelech, 2009). It is assumed that shrimp can consume the biofloc particles which are considered an important and complementary natural food source, leading to an improvement of shrimp growth rate (Moss and Pruder 1995; Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004), and reach better feed efficiency (Browdy *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2005; Wasielesky *et al.*, 2006; Hargreaves *et al.*, 2006). Moreover, a few authors have reported that natural productivity stimulates the activity of digestive enzymes (Xu and Pan, 2012, Xu *et al.*, 2013). However, despite evidence for the role of enhanced natural productivity in the nutrition of shrimps, very few studies have been carried out to quantify this role for shrimp reared in BFT (Ray, 2012).

In aquaculture, stable isotope, considered a non-hazardous and non-invasive tool, and can be used to estimate the relative contribution of different food sources (Phillips and Gregg, 2001; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008). This method has already been used to evaluate the contribution of natural productivity within extensively or semi-intensively reared shrimp in earthen ponds (Anderson *et al.*, 1987, Parker *et al.*, 1989, Cam *et al.*, 1991) and also within net cages (Abreu *et al.*, 2007). However, in a biofloc breeding system, there is a limitation of the stable isotope method because the isotopic value of food sources should be precisely known and the difference between the isotopic signatures of different food sources must be sufficiently marked (Epp *et al.*, 2002). To overcome this limitation, the use of specific diets, especially live feeds, enriched or labelled with very high levels of ^{13}C or ^{15}N , have been applied as an alternative to radiolabels (Epp *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004; Avnimelech, 2007; Avnimelech and Kochba, 2009). Cam *et al.* (1991) used natural stable isotopes to investigate the relative contribution of different food sources in an earthen pond system, although this method has the advantage, compared to the enriched isotopes method, of integrating measures of ingestion, assimilation and growth over longer time periods under normal feeding and environmental conditions (Le Vay and Gamboa-Delgado, 2011).

The aim of our study, achieved through two complementary experiments, is to assess the relative shares of the natural food from BFT and the compound diet of the juvenile blue shrimp *L. stylirostris*; this assessment was performed by crossing the isotope method by using C and N natural stable isotope analysis with a comparative method of two rearing systems: BFT and clear water. Under these conditions, we also

compared α -amylase and trypsin enzyme activities in the digestive gland of the reared shrimp in both rearing systems using biochemical and molecular methods.

2. Material and methods

2.1 Experiment 1: Relative dietary contribution of compound feed and natural productivity of juvenile shrimp *Litopenaeus stylirostris* reared in biofloc system.

2.1.1 Shrimp and acclimatisation tanks

The 30 day-old shrimp post-larvae (*Litopenaeus stylirostris*) were obtained from the Ifremer hatchery (Saint-Vincent station, New Caledonia). Prior to experimentation, shrimps underwent an acclimatisation period of two weeks; for this purpose, they were stocked in 4m³ tanks and reared in clear water (100% renewal water rate per day). The shrimp were fed with commercial feed three times a day *ad libitum*.

2.1.2 Biofloc preparation

The biofloc culture was established 30 days before the experiment with adult shrimps (mean weight: 20 g; biomass: 500g.m⁻²). Shrimp were fed *ad libitum* twice a day with commercial shrimp feed (SICA[®] grower40), and were removed before the beginning of the experiment. Each tank was continuously aerated with blown air delivered through a stone diffuser and were covered with shade nets to control the sunlight (70% inhibition of light).

2.1.3 Experimental Feed

Shrimps were fed an experimental diet formulated with a high level of soy concentrate protein (SCP) as the main source of protein. The diets were produced in the laboratory using the following procedure: the dry ingredients were ground in a grinder (Retsch[®]) with a 1mm screen. The meal obtained was mixed with oil and water (30%) in a horizontal mixer (Mainca[®]) until the consistency was suitable for pelleting. The mixture was then extruded through a 3 mm die in a meat grinder to form spaghetti. The spaghetti obtained was then dried in oven (Venticell[®] 222) at 60°C until the moisture content was reduced to 10%. After drying, the spaghetti was broken into 2 to 3 mm long pellets. The ingredient compositions of the experimental diet are shown in Table II-1.

2.1.4 Experimental design and sampling

Three treatments were tested for a period of 30 days: 1) clear water + experimental pellet diet (CW); 2) biofloc + experimental pellet diet (BF) and 3) biofloc - unfed (BU). Each of the 12 outdoor circular polyester tanks (capacity: 536 litres) under a shade net (70% inhibition of light) were randomly assigned to a particular

treatment (CW, BF or BU), such that each treatment contained 4 replicate tanks. In our study, the experimental unit is therefore represented by the tank.

Table II-1: Composition of experimental diet.

(1)Vitamin Premix for shrimp from BEC feed solutions PTY, LTD - ingredients: vitamin AD3 1000/200, vitamin B1 98% Thiamine, Mononitrate, vitamin B2 Riboflavin 80%, vitamin B3 99% Niacin, vitamin B5 98% D-Calpan, vitamine B6 98% Pyridoxine, Vitamin B9 97% Folic acid, vitamine D3 500, vitamin E 50 ADD, vitamin K3 43.7%;(2) Vitamin C: Rovimix Stay-C 35 from DSM Cie; (3) Trace elements from SICA Cie (SAEML NORD AVENIR).

Diet ingredients (g.kg ⁻¹ diet)	
Soy protein concentrate	453
Crab meal	151
Wheat flour	337
Soy oil	20.5
Fish oil	10
Shrimp vitamin premix (1)	2.5
Vitamin C (2)	3
Shrimp trace mineral premix (3)	2.5
Dicalcium phosphate	20.5

Shrimp were caught in acclimatisation tanks (§ 2.1.1) using a cast net, and were then transferred and randomly distributed into the 12 experimental tanks. One hundred individuals (0.24 ± 0.04 g) were placed in each tank (200 shrimps.m⁻²). Each tank was continuously aerated with blown air delivered through a stone diffuser. The water renewal rate was of 300% per day in the CW treatment and 0% in the BF and BU treatments.

In order to obtain different isotopic signatures of two potential dietary sources: biofloc vs. experimental diet, we enriched biofloc with ground feed rich in fish meal with a high isotopic signature and fed the shrimp with the pelleted diet with soybeans as the main source of protein with a low isotopic signature. The feed used to enrich the natural productivity of biofloc treatments (BF and BU) was commercial shrimp feed (SICA® grower40) which was finely ground, sifted (<50 µm) and aerated in sea water for 24 hours, to prevent its direct consumption by the shrimps, which had been previously distributed in the biofloc tanks. The daily amount of food (dry matter basis) to enrich biofloc represented 2% of the estimated shrimp biomass. In parallel, and with the exception of the unfed treatment (BU), shrimps were fed *ad libitum* with the experimental diet (§ 2.1.2). Experimental feed was supplied to shrimps three times a day (07:00 am, 01:00 pm and 05:00 pm) using feeding trays which were checked 2 hours after feeding; any unconsumed feed was removed.

Sampling for isotope analysis by mass spectrometry - Shrimps and biofloc were sampled on day 0 and then once a week for the entire duration of the trial (4 times). For each sample, ten shrimps were randomly

taken from each of the 12 experimental tanks: the shrimps from each tank were pooled for analysis. Biofloc was filtered through a 100µm mesh from each biofloc tank, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis. Furthermore, three samples of experimental diet were collected for isotope analysis.

2.1.5 Stable isotope analysis and calculation

Analysis - - All samples, centrifuged biofloc, shrimps and experimental diet, were freeze-dried and ground to a fine homogenous powder using a ball mill (Retsch MM400; Haan, Germany). Samples (0.3mg DW) packed in tin-capsules., were analysed with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta V Advantage IRMS; Thermo Scientific, Bremen, Germany), coupled with an elemental analyser (Flash EA 1112 Thermo Scientific, Milan, Italy). Stable isotope results are presented as differences from universal reference standards (Vienna Pee Dee Belemnite for carbon, and Air N2 for nitrogen) using the following equation:

$$\delta(\text{‰}) = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} \times 1000$$

where R is the ratio of heavier to light isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) of the sample and standard, respectively. Analytical precision based on an internal standard (acetanilide) interspersed among samples is <0.1‰ for C and N. C and N contents of samples were also measured and presented as % by weight.

Calculation – When the consuming organism reaches isotopic equilibrium with its diet (at the end of experimentation in our study), a difference in isotope values between the consumer and its diet is usually observed. Indeed, when an animal consumes a food item, that animal typically retains a greater portion of heavy C and N isotopes compared to the food item; this is a result of isotopic fractionation (Fry, 2006), thus producing an isotope discrimination factor, $\delta^{13}\text{C}$ (or $\delta^{15}\text{N}$) _{body-diet}.

To calculate this factor, the equation following was used: $\Delta (\text{‰}) = \delta_{\text{tissue}} - \delta_{\text{diet}}$.

Thus, the relative contribution of the two nutritional sources (biofloc vs experimental diet) can be determined using a two-source, one-isotope mixing model from Phillips and Gregg, (2001). One of the model assumptions is that the consuming organism is in isotopic equilibrium with its diets. After a constant isotopic difference between the diet and shrimp was reached, isotope values were corrected for discrimination factors before introduction into the mixing model. This was done by introducing the isotopic profiles of both shrimps fed only natural productivity and formulated feed into the model in order to calculate the relative contribution of the two nutritional sources in the co-feeding treatment. Carbon and nitrogen content in the natural productivity and formulated feed were significantly different: therefore, according to Fry (2006) and Gamboa-Delgado *et al.* (2008), in order to calculate the total amount of carbon and nitrogen contributed by each feeding source, the following equation was used:

$$f_{\text{total1}} = (f_1 \cdot W_2) / (f_1 \cdot W_2 + f_2 \cdot W_1) \text{ and } f_{\text{total2}} = 1 - f_{\text{total1}}$$

where f_{total1} = is the total percent contribution of source 1 in a two source mixing model,

$$f_1 = (\delta^{13}\text{C}_{\text{shrimp sample}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{source2}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{source1}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{source2}}) \text{ and } f_2 = 1 - f_1$$

W_1 and W_2 represent the percent carbon content in each of the two sources.

The calculation procedures for N were the same as those for C.

2.2 Experiment 2: comparing the activity of digestive enzymes of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* grown in clear water and biofloc

The objective of this experiment was to compare shrimp grown in biofloc or in clear water systems for their α -amylase and trypsin activities and their corresponding transcripts abundance.

2.2.1 Shrimps and acclimatization

The 12 day-old shrimp post-larvae (*Litopenaeus stylirostris*) were obtained from the hatchery of the Aquaculture Technical Centre of Tahiti (Vairao, French Polynesia). Prior to experimentation, shrimps underwent an acclimatisation period of two weeks; for this purpose, they were stocked in 25 m³ tanks and reared in clear water (100% of renewal water rate a day). These shrimps were fed with commercial feed three times a day (SICA Grower 40).

2.2.2 Experimental design and sampling

The experimental protocol was similar to that of the first experiment. The difference here was that the animals grown in clear water or in biofloc were fed with commercial feed (SICA® grower40), while biofloc received no specific enrichment. The protocol of the second experiment was as follows: three treatments were tested for a period of 30 days: 1) clear water + commercial pellet (CW); 2) biofloc + commercial pellet (BF) and 3) biofloc - unfed (BU). Each of the 12 indoor circular polyester tanks (capacity: 250 litres) were randomly assigned to a particular treatment (CW, BF or BU), such that each treatment contained 4 replicate tanks. In our study, the experimental unit is therefore represented by a tank.

Shrimps were caught in acclimatisation tanks (§ 2.2.1) using a cast net, transferred and randomly distributed into the 12 experimental tanks. One hundred individuals ($0.06 \pm 0.02\text{g}$) were placed in each tank ($400 \text{ shrimps} \cdot \text{m}^{-2}$). Each tank was continuously aerated with blown air delivered through a stone diffuser. The water renewal rate was of 300% per day in CW treatment and 0% in BF and BU treatments. The biofloc culture was established in the same manner as in experiment 1 (see § 2.1.2). Shrimps were fed *ad libitum*,

with the exception of the unfed treatment (BU), with the commercial feed (SICA® grower40). Feed was supplied to shrimp three times a day (07:00 am, 01:00 pm and 05:00 pm).

Shrimp sampling was carried out on the last day (day 30) of the experiment. Digestive glands of shrimps were collected at different times of the day: before feeding (06:00 am), and one and three hours after feeding (08:00 am and 10:00 am, respectively). During the sampling day, feeding was carried out using a feeding tray which was collected 30min after the meal and the unconsumed food was discarded. At each of the sampling times, three shrimps per tank were caught and directly put in iced sea water (0°C) to stop the enzyme activity. Only shrimps in intermoult were used. Moulting stages were determined by microscopic examination of antennal scales according to the method of Drach and Tchernigovtzeff (1967). Then, the digestive glands (DGs) were removed and each one was separated into two longitudinal parts which were pooled for the 3 shrimps. For molecular analysis, DGs were immediately pooled in RNA later (Sigma®), refrigerated at 4°C for 12 hours and kept at -80°C until analysis. For biochemical analysis, DGs were immediately pooled and frozen in liquid nitrogen. A sample of biofloc was obtained by filtering through a 100µm mesh from each biofloc tank; concentrated biofloc was frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis.

2.2.3 Molecular analysis

Total RNA of digestive glands sampled during the second experiment was extracted using Trizol method (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of each RNA sample were assessed by measuring their absorbance at 260 and 280 nm using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) associated with the ND-1000 V3 7.0 software. A DNase treatment to remove residual DNA was carried out using the Ambion DNA free kit, following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesised with 500ng total RNA in each reaction system using the Roche transcriptor first strand cDNA synthesis, according to the manufacturer's protocol. All cDNA samples were diluted to 1/100 with nuclease-free water and stored at -20°C until they were used as templates in real-time quantitative PCR (qRT-PCR).

Primers for the amylase (Amy) and trypsin (Try) genes of *L. stylirostris* were designed by alignment of highly conserved regions from sequences registered for other shrimp species in GenBank (Table 2). Real-time qRT-PCR was carried out in an Stratagene Mx3000P machine (Agilent Technologies) using Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (CAT#600828 - Agilent Technologies) following the manufacturer's recommendations. The reaction mixtures were in a volume of 25µL containing, 12.5µL SYBR Premix, 10µL cDNA (diluted of 1/100), and 1.25µL each of the 4µM forward and reverse primers. After initial denaturation

at 95°C for 10 min, 40 cycles of amplification were carried out starting at 95°C for 30s, followed by 45s at 57°C, and 45s at 72°C, with a final extension at 95°C for 1 min, 30sec at 55°C and 95°C for 30s.

To determine the RT-PCR efficiencies of each primer pair used, standard curves were generated using five serial dilutions of a pool of one hundred cDNA samples from hepatopancreas. Primer ability was been validated when amplification efficiency varied between 90 and 110%. All analyses were run in duplicate. Relative gene expression levels were normalised to two specific house-keeping genes: Elongation factor (EF) and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GADPH) (Table II-2); each value was calculated with reference to CW shrimps before the first meal (relative expression = 1) according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Table II-2: Primers used for quantitative RT-PCR assay of *Litopenaeus stylirostris* trypsin, α -amylase, elongation factor 1- α and Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.

Gene name	Sequence 5' - 3'	Size	Primer size	Tm (°C)	Genbank ascension
Trypsin - F	GTGTCGCGATGCTTATGGC	95pb	19	60	
Trypsin - R	CAGAGTCACCCTGGCACG		18	60	
Amylase - F	TGGAAGTGGTCGGACATCG	70pb	19	59	
Amylase - R	CCTGAACGCCGGCGAAT		17	60	
Elongation factor 1α - R	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG	382pb	35	60	AY117542
Elongation factor 1α - F	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC		31	60	
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase - F	CGTTGGACACCACCTTCA	146pb	18	59	AI770197
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase - R	GTGTGCGGTGTCAACATGGA		20	55	

2.2.4 Biochemical analysis

All of the parameters were determined by biochemical assays with the microplate reader (Bioteck®). Prior to analysis, tissue and biofloc particles sampled during the second experiment were homogenised in Tris buffer 10 mM, 1 mM DTPA, pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants kept at -80°C until they were analysed.

Proteins were estimated according to Bradford (1976), with bovine serum albumin as the standard. Trypsin was assayed by amidase activity using benzoyl-Arginine-p-nitroanilide (BAPNA) as a substrate following the methods of Erlanger *et al.* (1961) and García-Carreño *et al.* (1994). Assays were initiated by the addition of sample supernatant, and the release of p-nitroanilide was measured at 410 nm over 15 min. A positive control of 3 mg.ml⁻¹ trypsin (Sigma) was used. One activity unit was expressed as 1 μ mol of p-nitroanilide released min⁻¹. The α -amylase activity was assayed by Bernfeld's (1955) method, using 1% soluble starch (Sigma) as a substrate in phosphate buffer 20 mM, pH 7, and reacting with 3,5-dinitrosalicylic

acid. One unit of enzymatic activity was defined as 1 mg of maltose liberated in 15 min at 37°C. Units of specific enzyme activities were expressed in U.mg of protein⁻¹.

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using XLSTAT software 2012. Percent data (survival rate) were normalised using an arcsine transformation before analysis. Normality of data distribution and homogeneity of variance were tested for zootechnical, isotopic, gene expression and activities data using the Shapiro-Wilk test and F-test. Zootechnical, gene expression and activities data were normally distributed and variances were homogenous. Hence, the effects of rearing treatments were tested using a one-way analysis of variance. Pairwise comparisons within the three rearing treatments were carried out using Tukey tests. Differences were considered significant at the level $p < 0.05$. Isotopic data were not normally distributed; the effects of rearing treatments were tested using the Kruskal Wallis test. Pairwise comparisons within the three rearing treatments were carried out using Dunn tests. Differences were considered significant at the level $p < 0.05$. Correlations between gene expression and activities data were tested using the critical value table for Spearman's rank correlation coefficient rho at the 5% alpha level.

3. Results

3.1 Zootechnical results (Table II-3).

Experiment 1: Survival rates were significantly different between the 3 treatments with the lowest rate for CW treatment and the highest rates for the biofloc treatments. Compared to CW treatment, the survival rates were 30% and 45% higher in BU and BF treatments, respectively; the BU treatment exhibits an intermediate survival rate. Growth rate, Final weight and weight gain follow the same trend as the treatments: we observed an increase from CW to BF treatment, with BU treatment being in an intermediate position.

Experiment 2: As for the first experiment, survival rates were significantly different between the 3 treatments with the lowest rate for CW treatment and the highest rates for the biofloc treatments. Compared to CW treatment, the survival rates were 100% and 136% higher in BU and BF treatments, respectively. Growth rate, final weight and weight gain followed the same trend as that observed in the previous experiment with an increase from CW to BF treatment; BU treatment was in an intermediate position. However, the difference between the CW and BF treatments was much more pronounced in experiment 2.

3.2 $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and estimated biofloc contribution in the diet of shrimps

The results presented here are from Experiment 1, in which juvenile shrimps increased their body weight, according the treatment, by between 250% and 492% (Table II-3).

Table II-3: Final survival rate, Growth rate, final weight and weight gain at the end of the grow-out period in the both experiments.

S= significance. Values are means $\pm$ s.d (n=4). Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). n.s. non-significant. Different superscripts indicate significant differences.

Zootechnical parameters	Experiment 1 - Treatments			S	Experiment 2 -Treatments			S
	CW	BU	BF		CW	BU	BF	
Survival rate (%)	^a 64.20 $\pm$ 13.10	^{ab} 83.10 $\pm$ 15.00	^b 93.50 $\pm$ 13.00	*	^a 42.17 $\pm$ 15.35	^{ab} 88.40 $\pm$ 14.20	^b 99.30 $\pm$ 1.30	*
Growth rate (g.wk ⁻¹)	^a 0.06 $\pm$ 0.01	^{ab} 0.16 $\pm$ 0.09	^b 0.22 $\pm$ 0.06	**	^a 0.04 $\pm$ 0.01	^a 0.05 $\pm$ 0.01	^b 0.21 $\pm$ 0.03	***
Final weight (g)	^a 0.60 $\pm$ 0.06	^{ab} 0.93 $\pm$ 0.29	^b 1.18 $\pm$ 0.34	**	^a 0.21 $\pm$ 0.04	^a 0.25 $\pm$ 0.02	^b 0.88 $\pm$ 0.19	***
Weight gain (%)	^a 250	^{ab} 388	^b 492	**	^a 350	^a 417	^b 1467	***

The carbon (C) and nitrogen (N) concentration and both the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the two dietary sources, biofloc and experimental diet, are shown in Table II-4. The mean C and N concentration and values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ obtained for biofloc were similar between the two treatments, BU and BF, but a significant difference was observed between biofloc and experimental diet ($p < 0.0001$).

Table II-4: Isotopic value ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and Carbon and nitrogen percentage in the two nutritional sources.

S= significance. Values are means $\pm$ s.d (n=4). Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p < 0.05$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). n.s. non-significant.

	Treatments	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C (%)	N (%)	C/N
Biofloc	BU	^a -19.5 $\pm$ 0.3	^a 10.0 $\pm$ 1.3	^a 20.4 $\pm$ 2.4	^a 3.0 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.8
	BF	^a -19.7 $\pm$ 0.3	^a 10.2 $\pm$ 0.6	^a 20.6 $\pm$ 2.2	^a 3.2 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 0.5
Compound diet	BF and CW	^b -24.5 $\pm$ 0.0	^b 1.4 $\pm$ 0.1	^b 41.1 $\pm$ 6.0	^b 6.0 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.1
S		***	***	***	***	n.s

The evolution of both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in muscle during the experiment are shown in Figure III-1. The linearisation of the curves for the both isotopic ratios studied $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ is obtained from the 21st day of the experiment. Indeed, no significant differences were found for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between the day 21 and day 28 for the three treatments ($p > 0.05$ for C and N according to the three treatments). This result suggests that the isotopic equilibrium was reached from that point.

The isotopic discrimination factor ($\Delta = \delta_{\text{muscle}} - \delta_{\text{diet}}$) calculated for both food sources, experimental diet and biofloc, shows that the dietary source affected the $\Delta^{13}\text{C}$ with values of 3.69 ± 0.12 and 2.48 ± 0.43

($p=0.009$) and $\Delta^{15}\text{N}$ with values of 5.59 ± 0.19 and 2.77 ± 0.08 ($p=0.05$), for experimental diet and natural productivity, respectively.

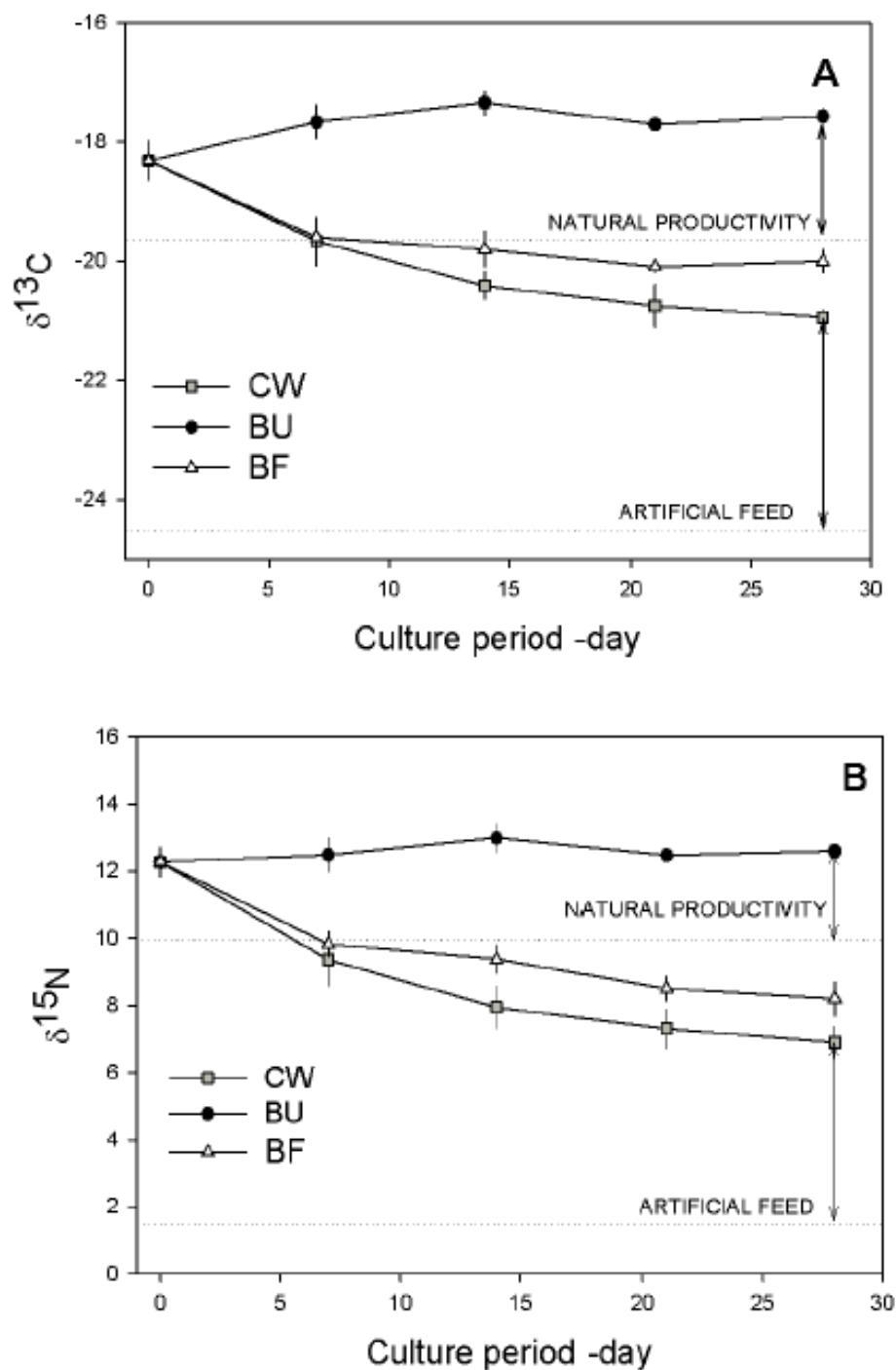


Figure II-1: Carbon (A) and Nitrogen (B) isotopic changes in muscle of shrimp according to treatments: CW, BU or BF.

Arrows represent isotopic discrimination factors between both dietary sources and between shrimps fed natural productivity and experimental diet only.

The isotopic mixing model estimates the relative contribution of C and N from natural productivity and formulated feed to tissue growth (see 2.1.5). According to the model, 39.8% of the carbon and 36.9% of the nitrogen may have originated from the biofloc. Conversely, carbon and nitrogen from the experimental feed contributed to muscle growth by 60.2% and 63.1%, respectively.

3.3 Comparison of digestive enzyme activities and their gene expression in digestive gland of shrimps from treatments BFT and CW

The results presented here are from Experiment 2. Relative gene expression level and specific enzymatic activity means are shown in Table II-5. The relative expression in the digestive gland of shrimps from BF treatment exhibited a significantly higher level for α -amylase ($p<0.0001$) and for trypsin ($p=0.03$) compared to both of the other treatments, BU and CW. The same trend was observed for enzymatic activities, where α -amylase and trypsin activities in the digestive gland of shrimps from both biofloc treatments were two-fold higher than for shrimps from CW treatment ($p<0.0001$ for the both enzymes).

Table II-5: Means values of α -amylase and trypsin relative expression levels and specific enzymatic activities for the three treatments (experiment 2).

S= significance. Values are means $\pm$ s.d (n=4). Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p<0.05$. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). n.s. non-significant.

	Enzyme	CW	BU	BF	S
Relative expression level	α -amylase	^a 1.59 $\pm$ 0.60	^a 1.71 $\pm$ 0.63	^b 2.64 $\pm$ 0.77	***
	trypsin	^a 0.85 $\pm$ 0.45	^a 0.90 $\pm$ 0.73	^b 1.46 $\pm$ 0.84	*
Specific enzymatic activities (U.mg of protein ⁻¹)	α -amylase	^a 10.09 $\pm$ 4.92	^b 19.27 $\pm$ 9.38	^b 19.32 $\pm$ 4.08	***
	trypsin	^a 2.78 $\pm$ 1.55	^b 7.99 $\pm$ 2.85	^b 7.32 $\pm$ 1.65	***

The evolution of digestive activities' enzyme levels and their relative expression over the course of the feeding trial is shown in Fig II-2 and 3, respectively. Both trypsin (Fig II-2A) and α -amylase (Fig II-2B) activities presented the same trend; they did not change over time for BU and BF treatment ($p>0.05$), while they increased significantly for CW treatment ($p=0.006$ for α -amylase; $p=0.015$ for trypsin) one hour after feeding, and then returned to the base level 3 hours after the meal. Furthermore, a treatment effect was observed: trypsin gene expression level (Fig II-3A) was higher 1 hour ($p=0.002$) and 3 hours ($p=0.04$) after the meal for BF treatment compared to BU and CW treatment.

The α -amylase expression level (Fig II-3B) was higher before the meal ($p=0.03$) and 3 h after the meal ($p=0.03$) for BF treatment compared to the other two treatments. However, no correlation was found between mRNA transcript abundance and digestive enzyme activities (for α -amylase $p=0.525$; for trypsin $p=0.101$). Finally, in the biofloc fraction we measured significant trypsin and α -amylase activities of $6.62 \pm 2.16 \text{ U.g}^{-1}$ (dry matter basis) and $54.01 \pm 27.67 \text{ U.g}^{-1}$ (dry matter basis), respectively.

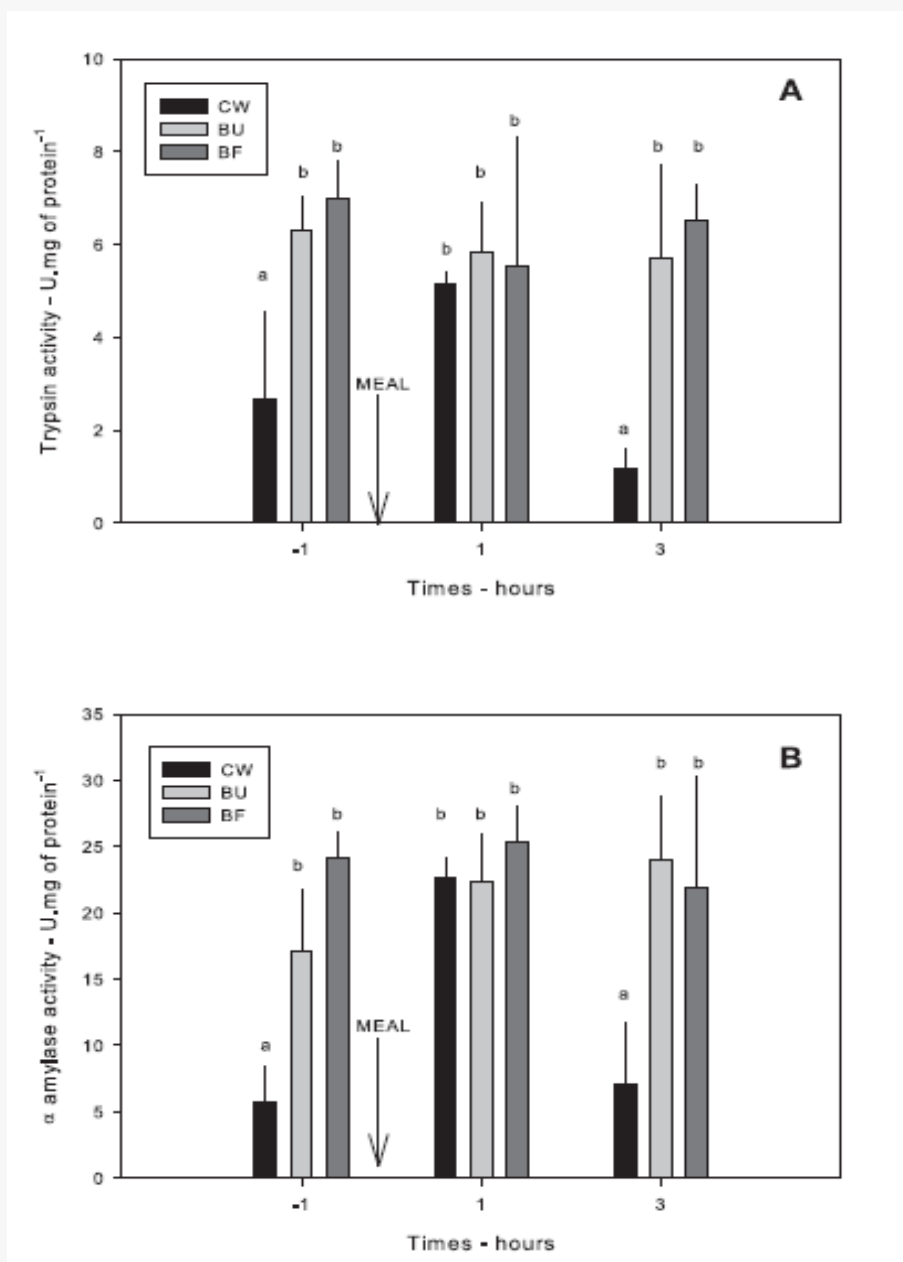


Figure II-2: Evolution of trypsin (A) and α-amylase (B) activities over the course of the feeding trial.

4. Discussion

The present study with *Litopenaeus stylirostris* confirmed the beneficial role of BFT in promoting the growth and survival of reared shrimp, as has been shown by several authors for *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* (Moss and Pruder 1995; Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004). Although the underlying mechanisms of BFT in promoting shrimp growth are largely unknown, it is expected that the beneficial effect of BFT has several interrelated causes.

In this context, we studied the role of biofloc in the nutrition of shrimp by using natural C and N stable isotope analysis to quantify the biofloc (natural productivity) contribution to the carbon and nitrogen pool used for the growth of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. The role of biofloc in shrimp nutrition was also assessed by comparing the α -amylase and trypsin enzymes activities at the biochemical and molecular levels, in the digestive gland of shrimp reared in clear water and in biofloc.

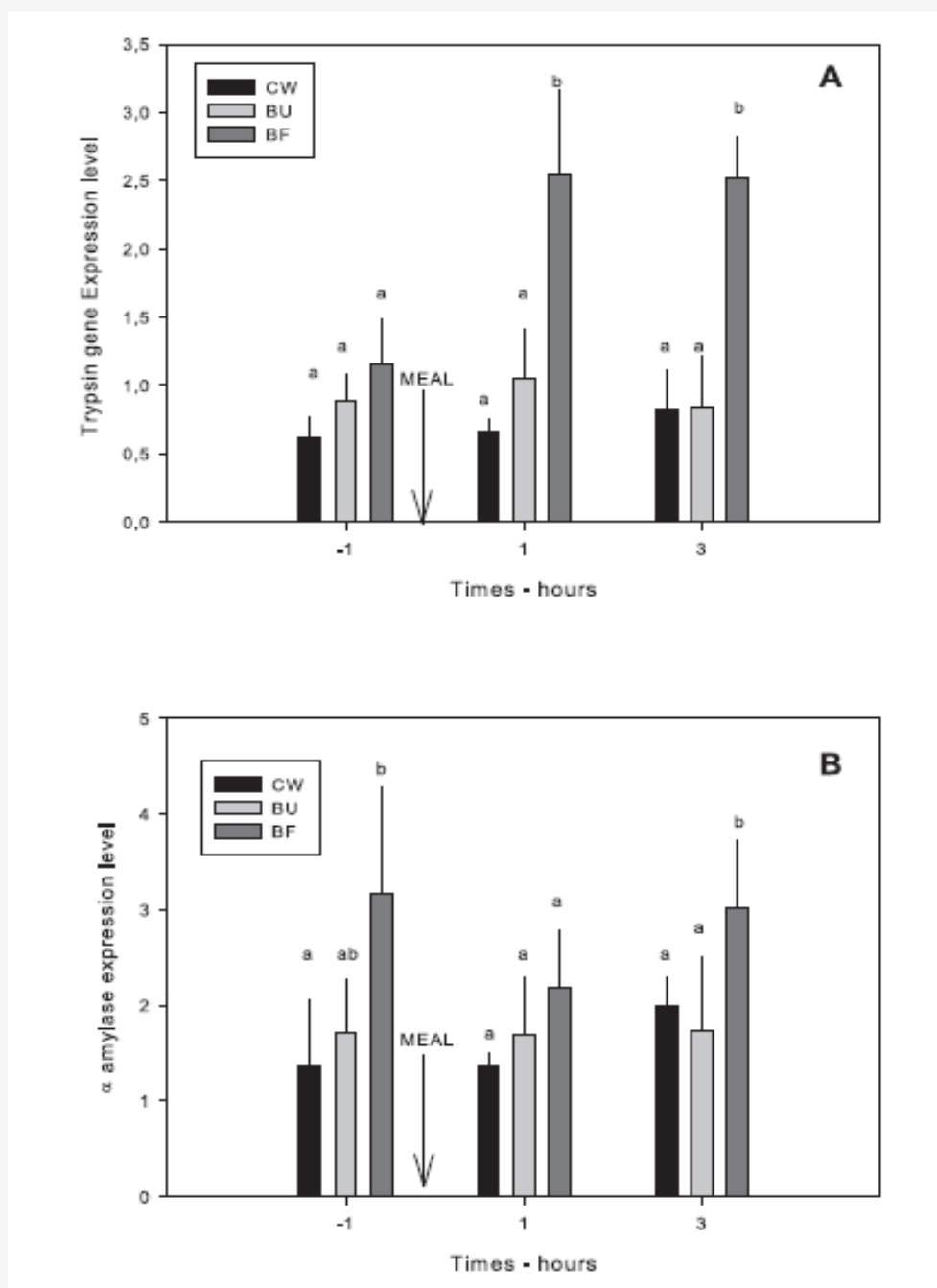


Figure II-3: Evolution of trypsin (A) and α -amylase (B) relative expression levels over the course of the feeding trial.

The trophic fractionation of isotopes is assumed to be relatively constant: about 3.4‰ per trophic level for nitrogen and 1‰ for carbon (De Niro and Epstein 1978; Schroeder, 1983; Fry and Sherr 1984). However, this discrimination factor depends on animal species, development stage, tissues considered, and diet composition (Lochmann and Phillips, 1996). Gamboa-Delgado and Le Vay (2009) showed that discriminating factors for N range from 0.8 to 6.6, and for C range from 2.3 to 4.1, according to the inclusion rate of fish meal and soy protein concentrate in the diet for the shrimp. In our study, distinct discriminating factor was found between formulated feed and biofloc. The different dietary assimilation, excretion rate and protein quality of the two dietary sources could explain this difference (Olive *et al.*, 2003; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Roth and Hobson, 2000; Waddington and MacArthur, 2008). In terms of experimentation, the existing isotopic fractionation between the animal and its food makes difficult the distinction between food sources in closed culture conditions where animals have simultaneous access to different sources of food that may have different discrimination factors. To circumvent this problem, in our study, we separated the treatments with one side using shrimps consuming only biofloc (BU) and the other with shrimps consuming only experimental diet (CW). Moreover, in order to clearly discriminate the isotopic signatures between the two food sources, we based our experimental protocol on the fact that different ingredients in shrimp feeds not only had diverse $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ values but also resulted in different apparent fractionation values (Anderson *et al.*, 1987; Gamboa-Delgado and Le Vay, 2009). Thus, in our protocol, we used fish meal and soy protein concentrate as the main ingredients to feed biofloc and shrimp, respectively; in doing so, we clearly distinguished between the two sources of food for shrimp, allowing us to estimate the discrimination factors for each food source. In these conditions, and based on estimates from a simple two source mixing model, the biofloc or natural productivity contributed to shrimp growth at levels of 39.8% and 36.9% for the C and N, respectively.

Few studies in shrimp culture, and only those concerning extensive or semi-intensive farming, have used natural abundance of carbon and nitrogen isotopes to estimate C and N contribution from natural productivity to growth of reared animals. Anderson *et al.* (1987) and Cam *et al.* (1991) applied the method in shrimp cultured in earthen ponds and showed that pond biota contributed between 53 and 77% and between 13% and 86% to the growth of *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus japonicas*, respectively. Nunes *et al.* (1997) carried out investigations focusing on the analysis of stomach contents and stable carbon isotope ratios and attributed 75% of *Penaeus subtilis* shrimp growth to naturally occurring food under semi-intensive culture. The studies on the subject conducted in shrimp farmed in biofloc used labelled isotope tracers. Thus, Epp *et al.* (2002) stated that 31% of N and 50% of C assimilated for the growth of *L. vannamei* (average weight of 3.5g) came from the biofloc productivity. Meanwhile, using the same method, by adding ^{15}N -ammonium to the culture medium, Burford *et al.* (2004) estimated that N derived from the biofloc was retained at a level of up to 18-29% for 1-9g shrimp on total N ingested. Interestingly, Epp *et al.* (2002) and

Burford *et al.* (2004) produced similar results to ours through a different methodology; differences between results are very likely due to the variability of the nutritional quality of biofloc obtained in different studies. Our results and those of the literature show that the share of natural productivity in the diet of shrimp is higher in extensive/semi-intensive earthen ponds than in biofloc intensive culture. This may be explained by the higher stocking densities used in BFT which were 50 to 120 shrimps.m⁻² in the studies of Epp *et al.* (2002) and Burford *et al.* (2004) and 200 shrimps.m⁻² in our study, and between 10 and 20 shrimps.m⁻² in extensive/semi-intensive earthen pond (Anderson *et al.*, 1987; Cam *et al.*, 1991; Nunes *et al.*, 1997). Furthermore, natural productivity could also be enhanced in earthen ponds where the bottom consists of loose sediment that promotes benthic development (Burford *et al.*, 2004). With limited areas without earthen floors and high densities, the shrimp are forced to rely upon formulated feeds (Epp *et al.*, 2002).

Biochemical studies on digestive enzymes' activities have mainly focused on the influence of the size of the shrimp (Van Wormhoudt *et al.*, 1980, Lovett and Felder, 1990), its moulting stage (Van Wormhoudt and Favrel, 1988) or the composition of diet (Le Moullac *et al.*, 1997). The few studies focused on the direct influence of feeding on enzyme secretion in crustacean have shown that food intake in crustaceans induced digestive enzyme excretion (Barker and Gibson, 1977; Al-Mohanna *et al.*, 1985; Simon, 2009). Our present study follows that of Xu *et al.* (2013), who investigated the effects of biofloc on digestive enzyme activities of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. In our case, we compared the specific digestive enzyme activities and corresponding transcripts abundance between shrimps from both biofloc treatments (BU and BF) and clear water (CW). As for Xu *et al.* (2013), we observed higher amylase (carbohydrase) and trypsin (endoprotease) activities in both biofloc treatments compared to CW treatment. In their study, Moss *et al.* (2001) showed higher specific activity of most digestive enzymes in *L. vannamei* shrimps reared in a eutrophic pond compared to those reared in well water and hypothesised that this increased activity was due to natural productivity that served as a source of organic substrates. All of these studies converge and show that the natural productivity, regardless of the rearing method (semi-intensive in earthen pond or intensive in biofloc), represents a source of food that is constantly available and its consumption by shrimps at any time stimulates the enzyme activities associated with digestion. Conversely, artificial feed is only available at mealtimes and we have actually shown a significant post-prandial increase in enzyme activities in shrimp from the CW treatment (Fig III-3A and B). Another hypothesis involving a contribution of exogenous enzymes from the biofloc consumed by shrimp may also explain the higher enzyme activities observed in animals reared in biofloc. Indeed, we showed that the biofloc particles exhibited significant trypsin and α -amylase activities, which may help the digestive function of the shrimp. Our results confirm several previous investigations which have shown relevant extracellular enzymes produced by the microorganisms (bacteria, phytoplankton or zooplankton) from the biofloc, leading to the hypothesis that these exogenous enzymes may provide the shrimp with additional digestible capacity (Harris, 1993; Moss *et*

al., 2001; Moss *et al.*, 2001; Xu and Pan, 2012). In addition, exogenous bacteria in shrimp gut might either stimulate endogenous enzymes produced by the host in some way, as has been shown with specific probiotic strains (Wang, 2007; Castex *et al.*, 2009).

At the level of gene expression of enzymes that were studied here, it appears that shrimp with access to two food sources in the BF treatment presented a higher level of mRNA compared to animals fed with a single dietary source (BU and CW). This result can be explained by the assumption that shrimp from the BF treatment, with access to two dietary sources, ingested more protein and more carbohydrate than shrimps from other treatments. Indeed, several authors have shown that the amount and the nature of dietary protein modulated the transcription and translation of trypsin mRNA (Péres *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006). For their part, Huvet *et al.* (2003) showed in *Crassoteras gigas* higher amylase expression in oyster with "high food condition" compared to animals with "low food condition". In order to explain our results, we therefore hypothesise that a higher amount of nutritive substrate available for the shrimp in treatment BF could modulate the gene expression of α -amylase and trypsin enzymes.

5. Conclusion

Our study shows that juvenile shrimp *L. stylirostris* reared in biofloc get 37-40% of their food from the natural productivity, which in turn stimulates digestive enzyme activities; this increased activity may contribute to promote the growth of shrimps reared in biofloc. Concomitantly, we showed that survival rates of the shrimps reared in biofloc were greatly improved; however, the relationship which may exist between the effects of biofloc on nutrition and on survival rate is still unclear and needs further investigation.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Government and Southern, Northern and Island Provinces of New-Caledonia and the management of marine resources and mining of Tahiti. We would like to thank the Technical Centre for Aquaculture of Tahiti for their help during the running of the experiment, Jacques Patrois and Marie Madeleine Le Gall for help during the sampling and biochemical analysis, respectively.

References

- Abreu, P.C., Ballester, E.L., Odebrecht, C., Wasielesky Jr, W., Cavalli, R.O., Granéli, W., Anesio, A.M., 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347(1), 88-96.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J. A., Lane, D.J.W., 1985. Mitotic E-and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65(04), 901-910.
- Anderson, R.K., Parker, P.L., Lawrence, A., 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercially important shrimp *Penaeus vannamei* in a pond growout system1. *Journal of the World Aquaculture Society*, 18(3), 148-155.

- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264(1), 140-147.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc Technology - A practical guide Book. Baton Rouge, Louisiana, United States, The World Aquaculture Society.
- Avnimelech, Y., Kochba, M., 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using ^{15}N tracing. *Aquaculture*, 287(1), 163-168.
- Barker, P.L., Gibson, R., 1977. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the european lobster *Homarus gammarus* L. (Decapoda: Nephropidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26(3), 297-324.
- Bernfeld, P. (1955). [17] Amylases, α and β . *Methods in enzymology*, 1, 149-158.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Browdy, C.L., Bratvold, D., Stokes, A.D., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp 20–34.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, P.R., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525–537.
- Cam. D., Rollet. P.-E., Mariotti. A., Guillaume. J., 1991. The relative contribution of natural productivity and formulated food in the nutrition of *Penaeus japonicus* reared in semi-intensive conditions. *Aquat. Living Resour.* 4. 175–180.
- Castex, M., 2009. Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie In l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, pp. 386. Agro Paris Tech, Paris.
- De Niro, M.J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197, pp. 261–263.
- De Niro, M.J., Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 42 (1978), pp. 495–506.
- Drach, P., Tchernifovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., Schell, D.M., 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research*, 33(11), 839-846.
- Fry, B., Sherr, E. B., 1984. $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contributions in Marine Science*, 27, 13-47.
- Fry, B., 2006. Stable isotope ecology. Springer, Heidelberg, 308 pp.
- Gamboa-Delgado, J., Cañavate, J. P., Zerolo, R., Le Vay, L., 2008. Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 280(1), 190-197.
- Gamboa-Delgado, J., Le Vay, L., 2009. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*, 291(1), 115-123.
- García-Carreño, F. L., Hernandez-Cortes, M. P., Haard, N. F., 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1456-1461.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering* 34, pp 344-63.
- Harris, J.M., 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial ecology*, 25(3), 195-231.

- Huvet, A., Daniel, J.Y., Quere, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.F., Moal, J., 2003. Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture*, 228(1), 321-333.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1), 107-125.
- Le Vay, L., Gamboa-Delgado, J., 2011. Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*, 315(1), 95-103.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lochman, R., Phillips, H., 1996. Stable isotopic evaluation of the relative assimilation of natural and artificial foods by golden shiners *Notemigonus crysoleucas* in ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(2), 168-177.
- Lovett, D. L., Felder, D. L., 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological Bulletin*, 178(2), 144-159.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187(2), 175-191.
- Moss, S. M., Divakaran, S., Kim, B. G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 32(2), 125-131.
- Nunes, A. J. P., Gesteira, T. C. V., Goddard, S., 1997. Food ingestion and assimilation by the southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*, 149(1), 121-136.
- Olive, P.J., Pinnegar, J. K., Polunin, N.V., Richards, G., Welch, R., 2003. Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology*, 72(4), 608-617.
- Parker, P. L., Anderson, R. K., & Lawrence, A., 1989. A $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In *Stable isotopes in ecological research* (pp. 288-303). Springer New York.
- Péres, A., Infante, J. Z., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19(2), 145-152.
- Phillips, D. L., Gregg, J. W., 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127(2), 171-179.
- Ray, A.J., 2012. Management of biological and chemical constituents for the advancement of intensive, minimal-exchange, biofloc-based shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture. Dissertations. Paper 713. http://aquila.usm.edu/theses_dissertations/713
- Roth, J. D., Hobson, K. A., 2000. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology*, 78(5), 848-852.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural engineering*, 32(3), 379-401.
- Schroeder, G.L., 1983. Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by δC analysis. *Aquaculture*, 35, 29-42.
- Simon, C.J., 2009. Digestive enzyme response to natural and formulated diets in cultured juvenile spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 294(3), 271-281.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8(2), 121-137.
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., 1980. Aspects biochimiques de la croissance: acides nucléiques et enzymes digestives chez *Palaemon serratus* (Crustacea Natantia). *Oceanologica Acta*, 3(1), 97-105.
- Van Wormhoudt, A., Favrel, P., 1988. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (crustacea, decapoda) α amylase system: Study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 89(2), 201-207.
- Waddington, K., MacArthur, L., 2008. Diet quality and muscle tissue location influence consumer-diet discrimination in captive-reared rock lobsters (*Panulirus cygnus*). *Marine Biology*, 154(3), 569-576.

Partie II - Influence de l'élevage en biofloc sur la nutrition, les défenses immunitaires et anti-radicalaires
de la crevette *Litopenaeus stylirostris*

- Wang, C., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y., Liu, J., 2006. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 254(1), 554-562.
- Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259-264.
- Wasieliesky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1), 396-403.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture*, 356, 147-152.
- Xu, W. J., Pan, L. Q., Sun, X. H., Huang, J., 2013. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 44(7), 1093-1102.

Article 2: Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress

Emilie Cardona^{1,2}, Denis Saulnier¹, Bénédicte Lorgeoux¹, Liet Chim², Yannick Gueguen^{1#}.

¹IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, Unité de recherche Ressources Marines, B.P 7004, 98719 Taravao, French Polynesia.

²IFREMER, Unité de recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle Calédonie B.P. 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia.

Present address: Ifremer, UMR 5244 IHPE, UPVD, CNRS, Université Montpellier, F-34095 Montpellier, France.

Article accepté dans le journal *Fish and shellfish immunology*

Highlights

- Contrasted rearing conditions, biofloc and clear water, did not affect the expression of genes encoding antioxidant enzymes and antimicrobial peptides.
- Biofloc shrimps maintained antioxidant and antimicrobial peptide responses after H₂O₂ stress while the immune competence of clear water shrimp seemed to decrease after stress.
- Biofloc seems to improve the immune resistance of shrimps against stress.

Abstract

This study compares the antioxidant and antimicrobial transcriptional expression of blue shrimps reared according to two different systems, BioFloc Technology (BFT) and Clear sea Water (CW) and their differential responses when facing an experimental sublethal hydrogen peroxide stress. After 30 days of rearing, juvenile shrimps were exposed to H₂O₂ stress at a concentration of 30 ppm during 6 hours. The oxidative stress caused by H₂O₂ was examined in the digestive glands of the shrimp, in which antioxidant enzyme (AOE) and antimicrobial peptide (AMP) gene expression were analysed by quantitative real-time PCR. Results showed that rearing conditions did not affect the expression of genes encoding for AOE or AMPs. However, H₂O₂ stress induced a differential response in expression between shrimps from the two rearing treatments (BFT and CW). Comparative analysis of the expression profiles indicates that catalase transcripts were significantly upregulated by H₂O₂ stress for BFT shrimps while no change was observed for CW shrimps. In contrast, H₂O₂ caused down-regulation of superoxide dismutase and glutathione transferase transcripts and of the three AMP transcripts studied (penaeidin 2 and 3, and crustin) for CW shrimps, while no effect was observed on BFT shrimp transcript levels. These results suggested that BFT shrimps maintained antioxidant and AMP responses after stress and therefore can effectively protect their cells against oxidative stress, while CW shrimp immune competence seems to decrease after stress.

Key words: biofloc – shrimps – antimicrobial peptides – antioxidant enzymes

1. Introduction

In shrimp aquaculture, intense interest has focused on biofloc technology (BFT). BFT is a rearing system with zero or minimal water exchange. Conglomerates of microbes, algae, protozoa and other organisms, together with detritus and dead organic particles, develop in the water column (Avnimelech, 2009). The intensive microbial community present in this system can be used as a water quality treatment system for the pond and microbial protein can serve as a feed additive. At the present time, when shrimp production faces many losses due to disease outbreaks, the use of BFT can restrain the development of shrimp diseases. One explanation is that, with zero or minimal water exchange, BFT improves biosecurity because the exclusion of pathogens is enhanced by limiting contact with water from external aquatic ecosystems (Taw, 2013). Another explanation is that the microbial proteins assimilated by shrimp are believed to confer beneficial effects on well-being and shrimp immune status (Avnimelech, 2009). Nevertheless, the influence of biofloc on shrimp immune status has been poorly documented (Xu and Pan, 2013, 2014; Kim *et al.*, 2013; Ekasari *et al.*, 2014).

Because of their lack of acquired immunity, marine invertebrates' defence against invading pathogens relies solely on innate immune mechanisms (Mitta *et al.*, 2000). In shrimp these include: 1) pattern recognition receptors (PRR) (Wang and Wang, 2013); 2) humoral responses characterized by the expression of antimicrobial peptides (AMPs), (Destoumieux *et al.*, 1997) but also coagulation and melanisation by so-called clotting (Omori *et al.*, 1989; Yeh *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005) and prophenoloxidase activating systems (Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000; Lee *et al.*, 2002; Charoensapsri *et al.*, 2011); 3) cellular responses, mainly performed by haemocytes, such as phagocytosis (Song *et al.*, 1994), chemotaxis with haemocyte migration into inflammatory foci (Munoz *et al.*, 2002), release of humoral defence components (agglutinins, coagulation and phenoloxidase enzymes, antimicrobial peptides), encapsulation and nodule formation (Holmblad and Söderhäll, 1999).

Animal stress induced by sub-lethal H₂O₂ concentration is a method rarely used to induce stress. It seemed interesting to study the response of animals to H₂O₂ stress because, although oxygen radical stress and antioxidant protection are coming increasingly into focus in physiological research on marine invertebrates, only a few studies have considered the effects of elevated concentrations of reactive oxygen species (ROS) on invertebrate physiology (Abele-Oeschger *et al.*, 1997). Among commonly used biomarkers of immunity, antioxidant enzymes (AOEs) are directly involved in scavenging ROS and play pivotal roles in preventing damage generated by oxidative stress. ROS have been identified as major initiators of tissue damage and can upregulate enzyme activity, signal transcription, and gene expression (Massafra *et al.*, 2000). The antioxidant defence and immune systems are closely linked to responses to pathogens and other stress-related issues that might lead to respiratory burst (Holmblad and Söderhäll, 1999). Measuring AOE

expression after environmental stressors such as pH (Wang *et al.*, 2009), temperature, salinity, hypoxia (De Zoysa *et al.*, 2009) and H₂O₂ stress (De Zoysa *et al.*, 2008) has proven to be a very good tool to study the responses of aquatic invertebrates. In contrast, very few studies have used antimicrobial peptide (AMP) analysis to investigate the impact of environmental stress on invertebrate immunology (Mitta *et al.*, 2000, Cellura *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). The major studies on AMPs have focused on their identification, characterization, and regulation following pathogen infection (Bachère *et al.*, 2004). However, investigating AMPs can provide a unique opportunity to greatly advance current understanding in the field of ecological immunology and especially the impact of environmental stressors (Ellis *et al.*, 2011).

In our study, we explore the transcriptional responses of genes coding either for AOE or AMPs in shrimp during contrasted rearing conditions, biofloc *versus* clear seawater, and experimentally induced stress produced by a sub-lethal dose of hydrogen peroxide.

2. Materials and method

2.1 Shrimps

The post larvae 12 shrimps *Litopenaeus stylirostris* used in this experiment were supplied by the hatchery of the Aquaculture Technical Centre of Tahiti (French Polynesia). Shrimps acclimated during 15 days in a 25 m³ clear seawater tank (300% water renewal per day) and were fed three times per day with commercial feed at 20% of the shrimp biomass (SICA grower 40).

2.2 Biofloc production

The biofloc culture was established before the experiment in 4 tanks (250 L) with sub-adult shrimps (mean weight: 20 g, biomass: 500 g.m⁻²) and fed twice per day with commercial shrimp feed (SICA grower 40) during 30 days. The shrimps were removed the day before the beginning of the experiment. Aeration was delivered continuously via an air stone in each tank. No water exchange was performed. Tanks were covered with a shade net to control the sunlight (70% inhibition of light).

2.3 Experimental design

Shrimps were caught in clear water tanks using a cast net and randomly distributed into 8 tanks (250 L). One hundred individuals (0.07±0.02g) were put into each tank (400 shrimps.m⁻²). Each tank was continuously aerated with an air stone. No water was exchanged during the experimental period in the biofloc rearing system and a water renewal rate of 300% per day was applied in the clear seawater rearing system. Two treatments with four replicate tanks for a period of 30 days were tested: clear seawater (CW) and biofloc

(BFT). Shrimps were fed *ad libitum* 3 times per day (07:00 am, 01:00 pm and 05:00 pm) with commercial shrimp feed (SICA® grower 40).

2.4 H₂O₂ stress, sampling and conservation

To achieve H₂O₂ stress, water renewal was operated in the biofloc tank during 12 hours to place the shrimp in sea clear water. During stress, all shrimps were maintained under the same conditions (clear seawater, temperature = 26.3°C, salinity = 34.5‰, pH = 8.20). Then, all shrimps remaining in the tanks were stressed by immersion for 6 hours with a sub-lethal concentration of H₂O₂ (30 ppm) added directly to the rearing tank.

Only shrimps in the inter-molt phase were sampled for molecular analysis. Molting stages were determined by microscopic examination of antennal scales according to the method of Drach and Tchernigovtzeff (1967). This was to minimize variations, because changes in physiological parameters are generally observed during the molting cycle in crustaceans. The sampling was performed before and after 6 hours of stress; ten shrimps per tank were caught and put directly in iced seawater (0°C). Because of their small size, only digestive gland tissues were sampled. The digestive glands of 10 intermolt shrimps per tank (before and after H₂O₂ stress) were removed. The tissues were immediately pooled in RNA Later (Sigma®), refrigerated at 4°C for 12 hours and kept at -80 °C until analysis.

2.5 Antioxidant and AMP gene expression analysis by relative quantitative real-time PCR (q-PCR)

Total RNA from the digestive glands was extracted using the Trizol method (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of each RNA were assessed by measuring their absorbance at 260 and 280 nm using a Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) associated with ND-1000 V3 7.0 software. A DNase treatment to remove residual DNA was carried out using the Ambion DNase free kit, following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized with 500 ng of total RNA in each reaction system using the Roche® transcriptor first strand cDNA synthesis system according to the manufacturer's protocol. All cDNAs were diluted 1/100 with nuclease-free water and stored at -20 °C until used as templates in real-time quantitative PCR (qRT-PCR).

Specific primers for Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Super oxide dismutase (SOD), and glutathione transferase (GSHT) were obtained by alignment of the most conserved regions from those sequences registered in Genbank. Primers for AMP genes, lysozyme (Lyso), Peneaidin 2 and 3 (Pen 2, Pen 3) and Crustin (Cru) were obtained from De Lorgeril *et al.* (2008). The primer sequences are shown in Table II-6. Real-time qRT-PCR was carried out in a Stratagene Mx3000P machine (Agilent Technologies) using Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix following the manufacturer's recommendations. The reactions were mixed

in a volume of 25 µL containing 12.5µL SYBR Premix, 10 µL cDNA (diluted 1/100), and 1.25 µL each of the 4 µM forward and reverse primers. After initial denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles of amplification were carried out starting at 95 °C for 30 s, followed by 45s at 57 °C and 45s at 72 °C, with a final extension at 95°C for 1 min, 30s at 55°C and at 95°C for 30s followed by a final cycle for differentiation curve analysis.

Table II-6: PCR primers (F: Forward, R: Reverse) used to amplify antimicrobial peptides (Pen3, Pen2, Lyso, Cru), antioxidant enzymes (GPX, SOD, GSHT and CAT) and house-keeping genes (EF and GADPH) of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a real-time PCR procedure.

Name	Gene name	Sequence 5' - 3'	Size	Primer size	Tm	GeneBank
Pen 2 - F	Peneaidin 2	GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	178pb	19	60	AY351655
Pen 2 - R	Peneaidin 2	CGAACCTGCTGCAGCAATTG		20	62	
Pen 3 - F	Peneaidin 3	CCATGCGCCTCGTGGTCTG	211pb	19	64	AY351656
Pen 3 - R	Peneaidin 3	GAACGCGCTTGTAAAGGTGGTAA		22	64	
Lyso - F	Lysozyme	GGCTTGGCACCAGGGTTACC		20	59	CV699332
Lyso - R	Lysozyme	CGTCTGCACGTCAGCTGTG		20	59	
Cru - R	Crustin	GTGATTCTGTGCGGCCTCTT	395pb	30	63	
Cru - F	Crustin	TCTTGACCAATACCTGCAG		30	60	
GPX - F	Glutathione peroxidase	TCAACAGCTGATCCCGTCT	157pb	19	59	
GPX - R	Glutathione peroxidase	CCTTGCCGATGAGGAATTT		19	60	
SOD - F	Super oxide dismutase	GCAATGAATGCCCTTCTACC	247pb	20	60	
SOD - R	Super oxide dismutase	CAGAGCCTTCACTCCAACG		21	60	
GSHT - F	Glutathione transferase	CTGGAGAAGCTGCACGAAG	198pb	19	60	
GSHT - R	Glutathione transferase	GTCACGTTCTGTGCTTGC		19	60	
CAT - F	Catalase	TACTGCAAGTTCCATTACAAGACG	285pb	24	61	
CAT - R	Catalase	GTAATTCTTTGGATTGCGGTCA		22	61	
EF - F	Elongation factor 1α	CGTTCCGGTGATCATGTTCTTGATG	382pb	35	60	AY117542
EF - R	Elongation factor 1α	GGTGCTGGACAAGCTGAAGGC		31	60	
GADPH - F	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	CGTTGGACACCACCTTCA	146pb	18	59	AI770197
GADPH - R	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	GTGTGCGGTGTCAACATGGA		30	55	

To determine the RT-PCR efficiencies of each primer pair used, standard curves were generated using five serial dilutions (one log of dilution) of a pool of one hundred cDNA samples from the hepatopancreas. The primers' ability was validated when the amplification efficiency varied between 90 and 110%.

Then, all samples collected during the experiment were run in duplicate. Relative gene expression levels were normalized against two specific house-keeping genes, Elongation factor (EF) and glyceraldehyde-3-

phosphate-dehydrogenase (GADPH), and each value was calculated in reference to CW shrimps before stress (relative expression = 1) according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using XLSTAT software 2012. Percent data (survival rate) were normalized using an arcsine transformation before analysis. The normality of the data distribution and homogeneity of variance were tested for all zootechnical and molecular analysis data using the Shapiro-Wilk test and F-test, respectively. The zootechnical data were normally distributed and variances were homogenous. Hence, the effects of the rearing treatments were tested using a one-way analysis of variance. The molecular results were not normally distributed; the effects of the rearing treatments were tested using the Kruskal-Wallis test.

3. Results

3.1 Survival and growth

After 30 days of rearing, BFT shrimp presented a significantly higher survival rate compared to CW shrimp ($99.30 \pm 1.30\%$ vs. $42.17 \pm 15.35\%$, $p < 0.01$). The mean body weight of the BFT shrimp at the end of rearing (0.88 ± 0.19 g) was significantly higher than in the CW treatment (0.21 ± 0.04 g) ($p = 0.001$).

3.2 Expression profiling of antioxidant enzyme genes

For all genes studied, the rearing period did not induce a difference of expression between the two conditions. However, H_2O_2 stress did cause different patterns of expression between the two conditions (Figure II-4). As a reminder, relative gene expression levels were normalized with two specific housekeeping genes, Elongation factor (EF) and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GADPH), and each value was calculated in reference to CW shrimps before stress. SOD and GSHT for CW shrimps showed a significantly decreased relative transcript abundance 6 hours after stress, 0.39 ± 0.03 and 0.31 ± 0.12 , respectively ($p = 0.03$ for both genes), while no significant change was observed for BFT shrimps (0.84 ± 0.26 and 0.97 ± 0.65 , $p > 0.05$). The difference between BFT and CW shrimps after stress was significantly different for SOD and GSHT ($p < 0.01$ and $p = 0.04$, respectively). Nevertheless, no effect of stress was observed on GPX expression for animals under either condition. CAT showed a distinct pattern compared to other antioxidant enzymes. BFT shrimps displayed a significant increase in relative RNA abundance after stress ($p = 0.04$) compared to CW shrimps, in which the relative abundance of CAT RNA did not change (2.39 ± 1.49 vs. 0.76 ± 0.28 , $p = 0.02$).

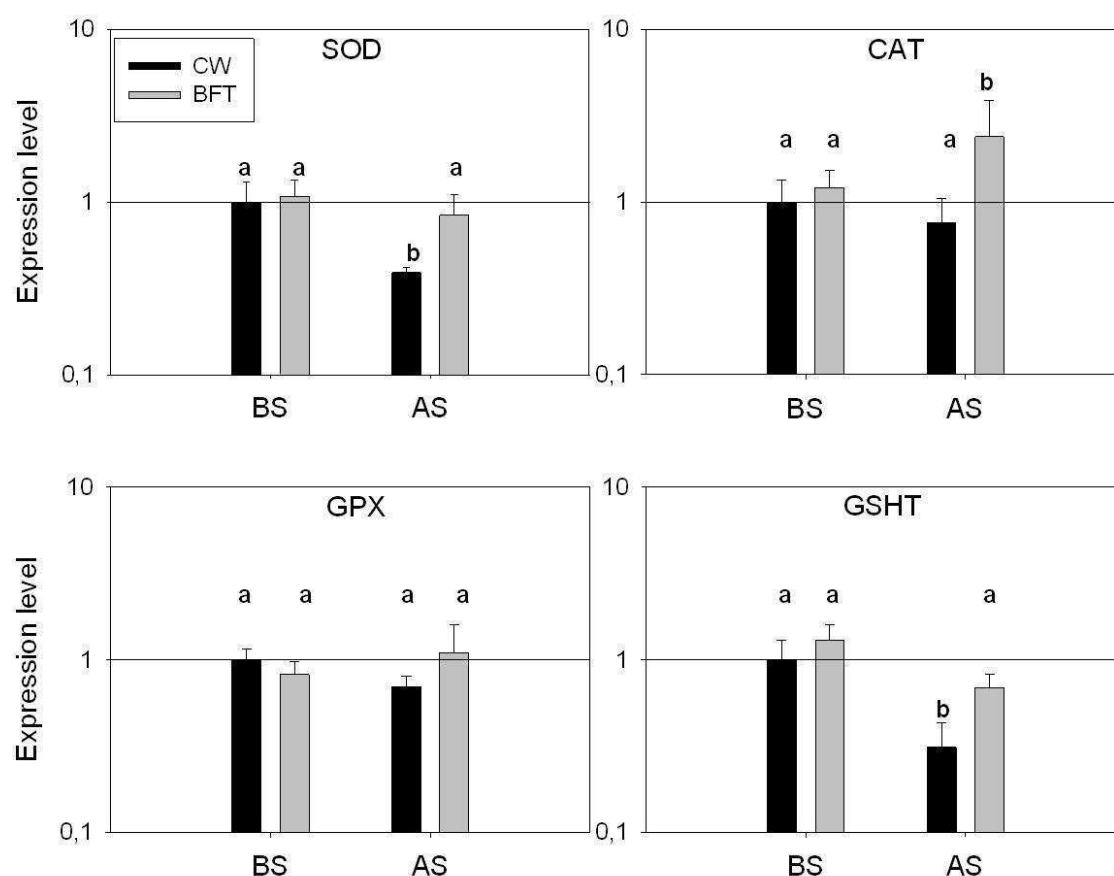


Figure II-4: Expression profiles of genes coding for the antioxidant enzymes Super oxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX) and Glutathione transferase (GSHT) in animals under both conditions before (BS) and after stress (AS).

3.3 Expression profiling of antimicrobial peptide genes

As for antioxidant enzyme genes, for all AMPs genes studied, the rearing period did not induce differences in expression between the two conditions. However, H_2O_2 stress caused different patterns of expression under both conditions (Figure II-5). For the penaeidin family, the relative transcript abundance of Pen 2 and Pen 3 decreased significantly after stress in CW shrimps ($p=0.03$ for both genes). On the contrary, in the BFT shrimps, no change in Pen 2 and Pen 3 transcript abundance was detected after stress compared to before stress ($p>0.05$). However, significant differences were observed between rearing conditions after stress; respectively, for CW and BFT, 0.15 ± 0.08 vs. 0.94 ± 0.40 ($p=0.03$) for Pen 2 and 0.14 ± 0.06 vs. 0.88 ± 0.53 ($p=0.02$) for Pen 3. Similar to the penaeidin family, another AMP (Cru) transcript showed a significant decrease in RNA abundance 6 hours after stress in CW shrimps, (0.12 ± 0.04 , $p=0.03$), but not in BFT shrimps (0.41 ± 0.23 , $p>0.05$). The difference between BFT and CW shrimps was significant ($p=0.03$). No effect of induced stress was observed on lysozyme expression in animals from the two conditions.

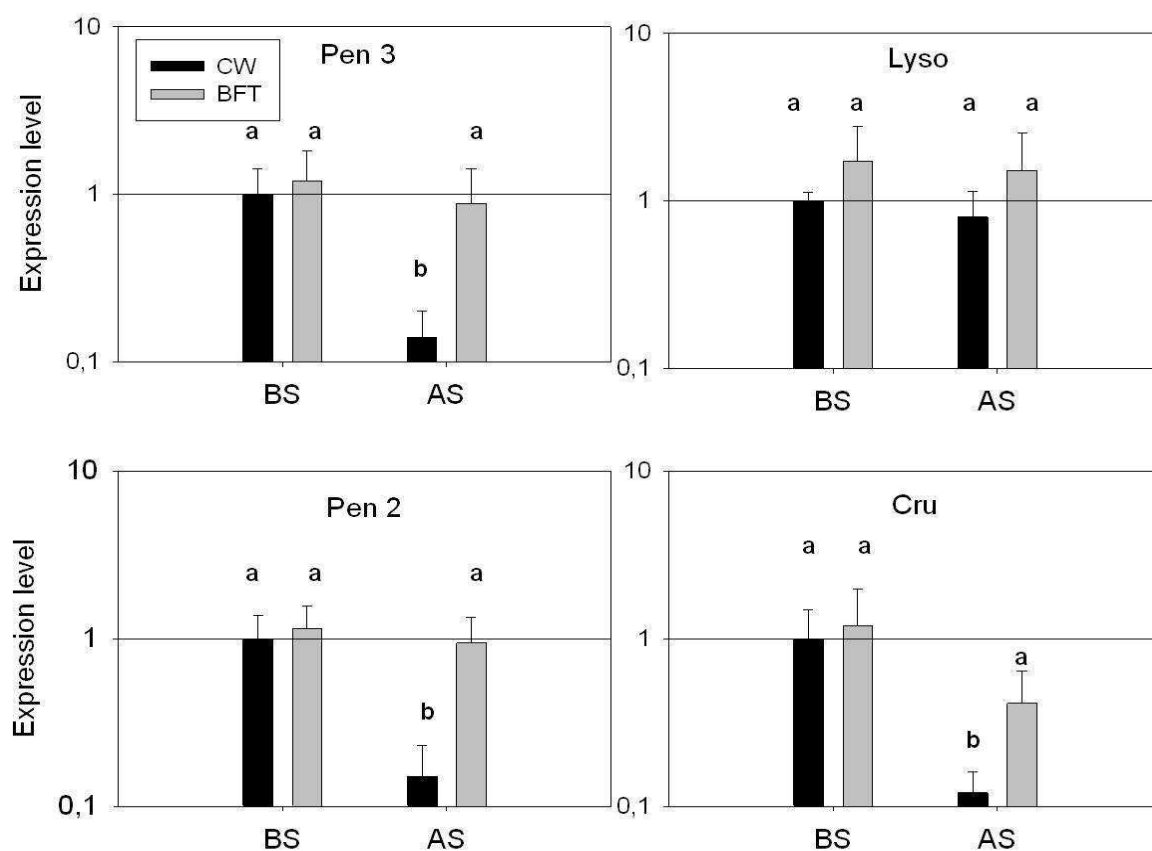


Figure II-5: Expression profiles of genes coding for AMPs, Lysozyme (Lyso), Peneaidin 2 and 3 (Pen 2 and Pen 3) and Crustin (Cru) in animals from both conditions before (BS) and after stress (AS).

4. Discussion

At the present time, when shrimp production faces many losses due to disease outbreaks, the use of BFT can restrain the development of shrimp diseases. It has been hypothesized that the biofloc allowed the shrimp to better withstand environmental stress or infection by pathogenic bacteria or viruses by stimulating non-specific immunity. Recently, several authors determined that BFT stimulated the non-specific immunity of shrimp (Kim *et al.*, 2013; Xu and Pan, 2013, 2014; Ekasari *et al.*, 2014) and one recent work showed that BFT improved shrimp resistance to infectious myonecrosis virus infection (Ekasari *et al.*, 2014). In this research, the antioxidant and antimicrobial transcriptional responses before and after experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress in blue shrimps reared according to two different systems, BFT and CW, were compared in order to improve our understanding of BFT's action on antioxidant defences and the humoral immune system of shrimps at the transcriptional level. We undertook, for the first time, to monitor AOE and AMP gene expression in shrimps under different rearing conditions, BFT and CW, and after induced stress.

4.1 Biofloc rearing conditions improves shrimp growth and survival

Our results showed that the BFT system promotes better growth (x 4.2) and survival (x 0.4) of *Litopenaeus stylirostris* juvenile shrimps compared to the CW system. Such results have already been described (Moss and Pruder, 1995; Cohen *et al.*, 2005; Azim and Little, 2008; Mishra *et al.*, 2008). According to these authors, the improved performances can be related to the consumption of biofloc by the shrimp, as a source of bacteria, microalgae and zooplankton, which could enhance shrimp nutrition and immunity. In the biofloc system, its natural productivity plays an important and complementary nutritional role for the shrimp in addition to the artificial feed (Moss and Pruder 1995; Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004). Biofloc is known to be an important source of proteins (Wasielesky *et al.*, 2006) and also of lipids (Crab *et al.*, 2010). Moreover, biofloc can contain microbially bioactive components such as carotenoids, vitamins (Ju *et al.*, 2008) and glutathione (Cardona *et al.*, in prep.). Major nutrients like proteins, lipids, antioxidant and vitamins, carotenoids and minerals are known to participate, in different ways, in nutritional modulation of immune responses (Trichet, 2010).

4.2 Shrimp AOE and AMP gene expression are not modified by rearing conditions

However, in the absence of any particular stressful conditions, we showed that the transcriptional responses of AOE and AMP genes of shrimp were not different between the different rearing conditions. With the significantly different growth and survival results obtained, we could expect a differential response between animals from the two conditions, as shown by others authors. Indeed, Kim *et al.* (2013) showed that biofloc rearing improved immune-related gene expression in *L.vannamei* post-larvae. Nevertheless, these authors used different biomarkers of shrimp immunity than those used in this study. Indeed, the genes targeted were involved in prophenoloxidase (ProPo) cascade activation (6 studied genes: prophenoloxidase 1, prophenoloxidase 2, prophenoloxidase activating enzyme, serine protease, and masquerade-like serine protease). The ProPo cascade can be activated by components of the cell wall like β -1,3-glucan, lipopolysaccharide, and peptidoglycan, elicitors found abundantly on biofloc particles (Johansson & Söderhäll, 1985; Van de Braak *et al.*, 2002; Amparyup *et al.*, 2013). Indeed, bacteria were one of the principal constituents identified in biofloc particles, with a high concentration ranging from 10^6 to 10^9 cell.mL⁻¹ (Otoshi *et al.*, 2006; Burford *et al.*, 2003; Avnimelech, 2009; Kim *et al.*, 2013).

Moreover, in addition to activating the ProPo cascade, earlier studies have revealed that biofloc led to an increase in both total haemocyte count and the phagocytic response in shrimp hemolymph, whereas respiratory burst, antibacterial and bacteriolytic activities were not affected (Xu and Pan, 2013; Ekasari *et al.*, 2014). The presence and digestion of the biofloc ingested by the shrimp may release substances in the gastrointestinal tract that could potentially stimulate cellular defences (phagocytosis and the proPo cascade) and the release of more haemocytes into the circulation without a noticeable effect on humoral defence

factor (such as AMPs and lysozyme) production (Xu and Pan, 2013). Our results are in accordance with these assertions and confirm that at the gene expression level there is no effect of the BFT condition by comparison to CW.

4.3 Differential AOE and AMP responses induced by H₂O₂ stress between shrimps from BFT and CW

After a H₂O₂ stress treatment, a strong effect of the rearing condition was noticed in AOE and AMP gene expression levels. The antioxidant defence system is inducible at a moderately high concentration of H₂O₂, which is hypothesized to also act as a messenger of signal transduction by regulating the mRNA level through activation of signal pathways (Ji, 1995; Sen and Packer, 1996). In this study, the expression of CAT was significantly increased in the digestive gland after 6 hours under H₂O₂ exposure for animals reared in BFT, while no change in RNA transcript abundance was recorded for CW shrimps. This result suggested that H₂O₂ stimulated the expression of CAT in BFT animals. AOE's function is to catalyse the conversion of H₂O₂ into water and molecular O₂ to protect the organism from peroxidation (Zhang *et al.*, 2008). This result seems to show that excess H₂O₂ that penetrates cells and tissues would be more easily detoxified and neutralized in the cytosol by catalase in BFT shrimp than in CW shrimp. The increase in CAT RNA expression in BFT shrimp could correspond to an adaptive antioxidant stress response (Bigot *et al.*, 2010). In contrast, the absence of a response in the CW shrimps could reflect an inappropriate response of the organism to neutralize peroxides and their potential involvement in oxidative cellular damage (Meng *et al.*, 2014). GPX also catalyses the conversion of H₂O₂ into H₂O and O₂. The absence of significant differential expression before and after 6 hours under stress could be explained by it being too short a time for the animals to react or to the paucity of biological replicates (n=4) to draw out significant differences. Indeed, Fu *et al.* (2012) showed that GPX mRNA transcription increased significantly between 8 h and 12 h after H₂O₂ injection. Stress induced significant down-regulation of SOD and GSHT in CW animals only. Similar to our findings on CAT genes, this could be explained by a diminished capacity for the CW organism to protect itself against oxidative stress (Bigot *et al.*, 2010) and the degradation of cells by H₂O₂. Taken together, the difference in response between animals from the two rearing conditions suggests that CW shrimp did not seem able to abolish cytotoxic effects due to H₂O₂-induced oxidative stress, while BFT shrimp seemed to present an adaptive antioxidant stress response.

In addition to AOE production, haemocytes are able to synthesize soluble antimicrobial peptides (AMPs). Measuring humoral immunity offers a further insight into the impact of stressors on haemocyte functionality, associated with an organism's immunocompetence (Ellis *et al.*, 2011). This study shows differences in AMP gene expression levels according to the rearing conditions of *L. stylirostris* facing a H₂O₂ stress. The transcript levels of three out of four AMP genes studied (Pen 2 and 3, Crustin) appeared to be

significantly modified after stress in CW shrimps only. The reported modulations in mRNA quantities were distributed in circulating haemocytes present in the digestive gland, since in invertebrates AMPs are produced mostly by haemocytes (Bachère *et al.*, 2004). In our experiment, no cell counts were performed before RNA extraction. Total RNA quantities were adjusted before reverse transcription and cDNA concentrations were adjusted another time in order to use identical template quantities in qPCR. Meanwhile, we have no data on the quantitative and qualitative composition of the various haemocytes sampled. The decreases in the AMP transcripts of CW shrimps could be explained by two phenomena: (i) a decrease in the relative number of haemocytes expressing the considered mRNA (Cellura *et al.*, 2007) induced by H₂O₂ cytotoxicity and (ii) a migration of haemocytes from the digestive gland towards exposed tissue to H₂O₂ as is often observed after infection by a pathogen or by injury (Bachère *et al.*, 2004). However, the observed differences in AMP transcript level could be compared to the data observed for shrimp survival under the BFT and CW conditions. We can suppose that the differential AMP transcriptional response after stress could be related to an improved immune ability of BFT animals facing a H₂O₂ stress. Nevertheless, further study is needed to confirm this assumption.

5. Conclusion

The rearing condition, BFT or CW, did not affect gene expression encoding antioxidant enzymes and antimicrobial peptides, although BFT significantly improved the growth and survival of animals. However, H₂O₂ stress induced a differential response in AOE and AMPs between shrimp from BFT and CW. Biofloc shrimps seem to maintain their antioxidant and antimicrobial peptide responses after H₂O₂ stress, while clear water shrimp immune competence seemed to decrease after stress.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Government and Southern, Northern and Island Provinces of New-Caledonia and the management of marine resources and mining of Tahiti. We would like to thank the Technical Centre for Aquaculture of Tahiti for their help during the running of the experiment, Julie Fievet for help during the sampling and Julien De Lorgeril for the discussions on shrimp antimicrobial peptides.

References

- Abele-Oeschger, D., Tüg, H., Roettgers, R., 1997. Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnology and oceanography*, 42(6), 1406-1415.
- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Pörtner, H.O., 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(2), 425-435.
- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138(4), 405-415.

- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A., 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 34(4), 990-1001.
- Avnimelech, Y., 2009. *Biofloc Technology - A practical guide Book*. Baton Rouge, Louisiana, United States, The World Aquaculture Society.
- Azim M.E., Little D.C., Bron J.E., 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*, 99 (2008), pp 3590–3599.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews*, 198(1), 149-168.
- Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., Warr, G.W., 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Journal of Marine Biotechnology* (NY) 4 (3): 278-293.
- Becerra-Dorame, J.M., Martinez-Cordova, L. R., Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., López-Elías, J. A., & Mendoza-Cano, F., 2012. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*.
- Bigot, A., Vasseur, P., Rodius, F., 2010. SOD and CAT cDNA cloning, and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. *Ecotoxicology*, 19(2), 369-376.
- Burford M.A., Thompson P.J., Bauman H., Pearson D.C., 2003. Microbial communities affect water quality, shrimp performance at Belize Aquaculture. *Global Aquaculture Advocate* 6, 64–65.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, P.R., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525–537.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and *HSP70* genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish & shellfish immunology*, 22(4), 340-350.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 323-333.
- Charoensapsri, W., Amparyup, P., Hirono, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A., 2011. Pm PPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 35, No. 1, pp. 115-124.
- Chen, M.Y., Hu, K.Y., Huang, C.C., Song, Y.L., 2005. More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 29, No. 12, pp. 1003-1016.
- Cohen, J.M., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural engineering*, 32(3), 425-442.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4), 559-567.
- De la Vega, E., O'Leary, N. A., Shockey, J. E., Robalino, J., Payne, C., Browdy, C. L., ... & Gross, P. S., 2008. Antilipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Molecular immunology*, 45(7), 1916-1925.
- De Lorgeril, J., Saulnier, D., Janech, M. G., Gueguen, Y., & Bachere, E. (2005). Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiological genomics*, 21(2), 174-183.
- De Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., ... & Bachère, E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular immunology*, 45(12), 3438-3445.

- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., & Bachère, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28398-28406.
- De Zoysa, M., Pushpamali, W.A., Oh, C., Whang, I., Kim, S. J., Lee, J., 2008. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H₂O₂ oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 446-457.
- De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J. S., Lee, J., 2009. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(4), 387-395.
- Drach, P., Tchernifovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. *Fish & shellfish immunology*, 30(6), 1209-1222.
- Ekasari, J., Azhar, M. H., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P., 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., Schell, D.M., 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research*, 33(11), 839-846.
- Fu, M., Zou, Z., Liu, S., Lin, P., Wang, Y., Zhang, Z., 2012. Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H₂O₂ challenge in *Scylla paramamosain*. *Fish & shellfish immunology*, 33(3), 532-542.
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, 10(1), 5-23.
- Hikima, S., Hikima, J. I., Rojtinakorn, J., Hirono, I., Aoki, T., 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 316, 187-195.
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1), 111-123.
- Ji, L.L., 1995. Exercise and free radical generation. Role of cellular antioxidant systems. Holoszy J. Exercise and Sports Science Review, Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland, pp. 135–166.
- Johansson, M. W., Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(2), 175-181.
- Ju Z., Forster I., Conquest L., Dominy W. 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition* 14.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., Jang, I. K., 2013. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362-371.
- Lee, K. Y., Zhang, R., Kim, M. S., Park, J. W., Park, H. Y., Kawabata, S.-i. and Lee, B. L., 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca²⁺ in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4375–4383. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03155.x
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191(1), 121-131.
- Li, H., Parisi, M.G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish & shellfish immunology*, 25(1), 143-152.
- Li, H., Toubiana, M., Monfort, P., Roch, P., 2009. Influence of temperature, salinity and *E. coli* tissue content on immune gene expression in mussel: Results from a 2005–2008 survey. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(9), 974-979.
- Liu, K. F., Chiu, C. H., Shiu, Y. L., Cheng, W., Liu, C. H., 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & shellfish immunology*, 28(5), 837-844.

- Livak, K.J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Picciolini, E., De Leo, V., Bonifazi, M., Bernabei, A., 2000. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *Journal of endocrinology*, 167(3), 447-452.
- Meng, X.L., Liu, P., Li, J., Gao, B.Q., Chen, P., 2014. Physiological responses of swimming crab *Portunus trituberculatus* under cold acclimation: antioxidant defense and heat shock proteins. *Aquaculture*.
- Mishra J.K., Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Gandy, R.L., Ali, A., 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering* 38, 2–15.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E.A., Boudry, P., Roch, P., 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(4), 381-393.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187(2), 175-191.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van Der Knaap, W. P., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1), 89-107.
- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 269(11), 2678-2689.
- Omori, S.A., Martin, G.G., Hose, J.E., 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. *Cell and Tissue Research*, Vol. 255, No. 1, pp. 117-123.
- Otoshi, C. A., Holl, C. M., Moss, D. R., Arce, S. M., Moss, S. M., 2006. Super-intensive RAS trial yields encouraging shrimp harvest at Oceanic Institute. *Global Aquaculture Advocate*, 9(4), 64-65.
- Patil, P.K., Bhuvaneshwari, T., Ezhil Praveena, P., Otta, S.K., 2014. Probiotics and immunostimulants in shrimp aquaculture. *Pins Aquaculture- .training Manual on*, 81.
- Pallavi, P. N., Babu, K. N., Reddy, D. C., Kalarani, V., 2012. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of *Penaeus monodon* acclimated to different salinities. *World*, 4(5), 539-549.
- Qiu, J., Wang, W.N., Wang, L.J., Liu Y.F., Wang A.L., 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 154, Issue 1, June 2011, Pages 36-41, ISSN 1532-0456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.007>.
- Rauen, U., Petrat, F., Li, T., De Groot, H., 2000. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂–/H₂O₂ formation. *The FASEB Journal*, 14(13), 1953-1964.
- Sen, C. K., Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB journal*, 10(7), 709-720.
- Song, Y.L., Hsieh, Y.T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology*, 18(3), 201-209.
- Song, Y.L., Li, C.Y., 2014. Shrimp immune system-special focus on penaeidin. *Journal of Marine Science and Technology*, 22(1), 1-8.
- Sotelo-Mundo, R. R., Islas-Osuna, M. A., de-la-Re-Vega, E., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 15(4), 325-331.

- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1), 53-69.
- Trichet, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research*, 41(3), 356-372.
- Van de Braak, C. B. T., Botterblom, M. H. A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W. B., Rombout, J. H. W. M., Van der Knaap, W. P. W., 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish & shellfish immunology*, 13(4), 293-309.
- Victor, B., Narayanan, M., Jones Nelson, D., 1990. Gill pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* (Heller). *Journal of Environmental Biology*, 11(1), 61-65.
- Tacon, A.G.J., Cody, J., Conquest, L., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121-137.
- Taw, 2013. Shrimp farming : biofloc as biosecurity?. Book of abstract of Biofloc technology and shrimp disease workshop. World Aquaculture society HoChiMinh.
- Wang, Y. C., Chang, P. S., Chen, H. Y., 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 23(6), 1161-1177.
- Wang, W.N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T.T., Zheng, Y., Liu, Y., Wei, Jun, M., Wang, A.L., 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(4), 428-435.
- Wang, D., Li, F., Chi, Y., Xiang, J., 2012. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress and Chaperones*, 17(4), 423-433.
- Wang, X. W., & Wang, J. X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish & shellfish immunology*, 34(4), 981-989.
- Wasielisky, W., Atwood, H., Stokes, A. Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396-403.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412, 117-124.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2014. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*, 426, 181-188.
- Yeh, M. S., Chen, Y. L., Tsai, I. H., 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 121, No. 2, pp. 169-176.
- Zhang, Q., Li, F., Zhang, X., Dong, B., Zhang, J., Xie, Y., Xiang, J., 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 24(5), 584-591.

Conclusion

Les travaux présentés dans cette partie confirment le rôle clé du biofloc sur la nutrition, la croissance et la « santé » (survie, défenses antioxydantes et immunitaires) de la crevette *Litopenaeus stylirostris*.

Dans un premier temps (Article 1), nous nous sommes intéressés à l'apport de la productivité naturelle dans l'alimentation de la crevette élevée en biofloc. Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole expérimental basé d'une part sur l'analyse des isotopes stables du carbone et de l'azote et d'autre part sur la comparaison d'animaux élevés en biofloc et en eau claire. Afin de bien discriminer les signatures isotopiques des deux sources alimentaires, biofloc et aliment granulé, nous les avons « nourris » respectivement avec un mélange à dominance animale (farine de poisson) et un mélange à dominance végétale (farine de soja). Dans ces conditions, nous avons pu quantifier les parts respectives de la productivité naturelle (biofloc) et de l'aliment artificiel dans l'alimentation des animaux. Nous montrons ainsi que le biofloc entre pour 36,9% à 39,8% dans l'alimentation de la crevette juvénile. Les particules de biofloc, contrairement aux granulés distribués uniquement aux heures du repas, sont constamment disponibles à la consommation par les crevettes. Cela semble confirmé par la stimulation des deux enzymes digestives (trypsine et α -amylase) qui présentaient une activité et une expression des gènes en moyenne plus élevées, sur toute la durée de l'expérience, chez les crevettes élevées en biofloc comparées à celles élevées en eau claire. Ce résultat peut également s'expliquer par l'action de bactéries du bol alimentaire qui peuvent, comme certains auteurs l'ont suggéré (Xu et Pan, 2012), stimuler la production endogène des enzymes digestives de l'animal. Une autre cause putative pour expliquer les niveaux supérieurs de l'activité des enzymes digestives mesurés chez les animaux élevés en biofloc est l'apport d'enzymes exogènes ingérées avec l'aliment naturel qui est composé de nombreux microorganismes (bactéries, micro-algues, zooplancton). Ce fait semble confirmé par nos résultats qui montrent un niveau relativement élevé de l'activité de la trypsine et de l' α -amylase dans la biomasse concentrée de biofloc.

Ainsi ce travail nous a permis de confirmer le rôle trophique du biofloc et sa part dans l'alimentation de la crevette. La consommation de la productivité naturelle est, comme nous l'avons vu, très significative et se traduit également par une élévation de l'activité enzymatique liée à la digestion. Ce complément significatif d'aliment naturel représente un apport d'énergie et de molécules bioactives (Ju *et al.*, 2008b) qui explique les meilleures croissances des animaux élevés en biofloc comparés à ceux élevés en eau claire.

Dans un second temps (Article 2), notre intérêt s'est porté sur la relation entre l'élevage en biofloc et la santé de l'animal. En effet, aux cours de nos expérimentations, nous avons observé de meilleures survies des animaux élevés en biofloc comparés à ceux élevés en eau claire. Ces observations vont dans le même sens

de celles, nombreuses, des équipes qui travaillent sur l'élevage en biofloc de la crevette (Tacon *et al.*, 2002 ; Burford *et al.*, 2004 ; Arnold *et al.*, 2009 ; Vinatea *et al.*, 2010 ; Xu et Pan, 2012, 2013). Au cours de cette étude, nous avons comparé la réponse immunitaire et des défenses antioxydantes, au niveau de l'expression des gènes correspondants, des crevettes soumises à un « stress oxydant standardisé » (stress à l'H₂O₂) et provenant soit d'élevage en eau claire soit d'élevage en biofloc. En fin d'élevage et juste avant d'appliquer le stress H₂O₂, aucune différence d'expression des gènes codant pour les peptides antimicrobiens et les enzymes antioxydantes n'a été enregistrée entre les animaux issus des deux traitements. Par contre notre étude montre clairement, chez les animaux soumis au stress H₂O₂, des réponses immunitaire et anti-radicalaire significativement différentes selon leur élevage d'origine. En effet, l'expression des gènes codant pour les peptides antimicrobiens et les enzymes antioxydantes était sous régulée pour la plupart des indicateurs étudiés chez les animaux du traitement eau claire, contrairement aux animaux du traitement biofloc. Nos résultats semblent donc indiquer que les animaux élevés en biofloc soumis à un stress oxydant possèdent une meilleure santé se traduisant ici par une régulation positive des gènes étudiés impliqués dans l'immunité et les défenses anti-radicalaires. Il semble logique de relier ces résultats aux meilleures survies obtenues dans les élevages en biofloc comparés à ceux en eau claire. Cependant, les causes à l'origine de cette régulation positive des gènes impliqués dans l'immunité et les défenses antioxydantes des animaux provenant des élevages en biofloc ne sont pas révélées par notre étude et sur ce point nous nous limiterons à proposer deux hypothèses :

- (i) La première fait appel au complément alimentaire apporté par la productivité naturelle. Ce complément d'aliment procure un meilleur statut nutritionnel aux animaux. Cet apport d'énergie supplémentaire doit amener à une meilleure répartition pour la croissance et les défenses immunitaires. Le biofloc peut également être source d'acides gras essentiels qui interviendrait sur l'immunité (Chim *et al.*, 2001) ou encore une source de molécules bioactives comme le glutathion qui interviendrait sur les équilibres des enzymes antioxydantes (Nicolini, 2011). Ces questions seront considérées dans la partie III.
- (ii) La seconde concerne le rôle probiotique des bactéries du biofloc consommées par la crevette (Avnimelech, 2013 ; Castex *et al.*, 2014).

De ces résultats, nous arrivons à la troisième partie où il sera question de l'influence de l'élevage en biofloc, plus particulièrement de sa contribution trophique, sur la qualité des géniteurs et de sa descendance.

**Partie III - Contribution trophique du biofloc
aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves
lipidiques des œufs : influence sur la
reproduction et la survie des larves produites**

Introduction

L'élevage extensif des géniteurs de *L. stylirostris* pratiqué en Nouvelle-Calédonie pose des problèmes à deux niveaux. Le premier concerne la qualité extrêmement variable des animaux produits et le second touche au domaine de la biosécurité. La principale raison à ces problèmes réside dans l'utilisation de bassins ouverts de grandes dimensions où l'éleveur dispose de peu de moyens de contrôle de la qualité de l'eau (renouvellement d'eau et fertilisation) en vue de conformer les paramètres d'élevage (température, salinité, oxygène dissous...) aux besoins physiologiques des animaux. Cela est d'autant plus important que nous connaissons l'extrême sensibilité de la crevette *L. stylirostris* aux conditions de son habitat qui peuvent compromettre sa survie et sa reproduction (Wabete, 2005 ; Chim *et al.*, 2008). Dans ce système traditionnel, la biosécurité est également mise à mal du fait que l'élevage se déroule dans des bassins ouverts, nécessitant des renouvellements de grands volumes d'eau (jusqu'à 30% par jour), construits sur le même site que la ferme où sont produits en masse les animaux pour la consommation. Dans ces conditions, il existe des risques de contamination entre les élevages de finalité différente. Le modèle calédonien de production en extensif des géniteurs est donc, pour toutes les raisons évoquées précédemment, de plus en plus remis en question.

Au centre océanologique de Tahiti (COP), des essais sont menés depuis 2004 en vue de développer l'élevage des géniteurs en biofloc (Goguenheim et Chim, 2009). Le système biofloc, comparé au système extensif en bassin de terre, présente de nombreux avantages en termes techniques, économiques et de biosécurité (Huber *et al.*, 2010). Nous avons vu précédemment que l'élevage en biofloc, hautement intensifié génère dans le volume d'élevage une abondante population de microorganismes (Avnimelech, 2009). Ces communautés microscopiques très diversifiées participent à la santé de l'élevage d'une part en éliminant les formes toxiques de l'azote tout en apportant des compléments nutritionnels qui peuvent stimuler l'immunité de la crevette (Avnimelech, 2009 ; Kim *et al.*, 2013). Nos propres études présentées supra ont confirmé le rôle significatif de l'élevage en biofloc sur la nutrition, les défenses immunitaires et anti-radicalaires de la crevette juvénile *L. stylirostris*.

Sur cette base, dans la suite de ce travail de thèse, nous chercherons à évaluer l'élevage en biofloc de géniteurs de la crevette *L. stylirostris* et les conséquences sur leur nutrition, leurs défenses anti-radicalaires, leur reproduction et la qualité de leur descendance. Il doit être noté que les études scientifiques sur l'élevage en biofloc de géniteurs des crevettes Pénéides sont très récentes et encore peu nombreuses (Huber *et al.*, 2010, Goguenheim, 2010 ; Chim *et al.*, 2010 ; Emerenciano *et al.*, 2012). Ces études se sont limitées très généralement à des résultats zootechniques de l'élevage du géniteur (croissance, survie) et de sa reproduction (nombre et fréquence des pontes, nombres d'œufs pondus, taux d'éclosion...). Par ailleurs, à

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'influence des conditions d'élevage du géniteur, le biofloc en l'occurrence, sur les réserves vitellines des œufs et la qualité des larves produites.

Nos travaux sur le sujet ont été réalisés en deux temps. Nous avons tout d'abord comparé les géniteurs issus des deux systèmes d'élevage (extensif en bassin de terre et biofloc en bac), en termes de leur croissance, survie, défenses anti-radicalaires et reproduction (Article 3). Dans un second temps, nous avons comparé la reproduction des femelles élevées en biofloc avec celles témoins élevées dans les mêmes conditions (bacs, paramètres d'élevage, aliment...) mais en eau claire. Ainsi, le protocole mis en place dans cette seconde étude devait nous permettre d'évaluer l'influence du biofloc sur la nutrition lipidique, le statut des défenses antioxydantes des géniteurs et les conséquences sur les réserves vitellines des œufs et la survie des larves au cours de leur développement (Article 4).

Article 3: The biofloc rearing technology improves the reproductive performance and the antiradical status of the shrimp *L. stylirostris* broodstock and eggs

Emilie Cardona^{a,b*}, Liet Chim^a, Mathias Huber^a, Pierrette Lemaire^a, Pierre Brun^a

^a IFREMER, Unité de recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle-Calédonie B.P. 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia.

^b IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, Unité de recherche Ressources Marines, B.P 7004, 98719 Taravao, French Polynesia.

Article soumis dans le journal Aquaculture Engineering

Highlights

- The reproductive performance of shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, was compared for broodstock reared intensively in a biofloc tank and extensively in an earthen pond.
- Spawning rate and the number of eggs and nauplii produced were higher in shrimp broodstock from the biofloc culture.
- Shrimps reared extensively in the earthen pond showed signs of oxidative stress, resulting from deleterious farming conditions.
- Beneficial effects were seen for the biofloc as there were potential additional natural nutrient sources as dietary antioxidants for the shrimp broodstock, embryo and pre-feeding larvae.

Abstract

In New Caledonia (NC), there is a strong will to change the broodstock culture strategy in order to achieve an easier water quality management and maximal biosecurity. In this perspective, biofloc technology (BFT), which offers easier water-quality management, higher natural productivity and a higher level of biosecurity, might be a good alternative. The aim of this study was to compare the reproductive performance, antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp broodstock *Litopenaeus stylirostris* from two rearing systems: extensive outdoor earthen pond (EEP) *versus* intensive BFT. The final shrimp biomass and survival rate were lower in EEP (13.6 g m⁻², 64 ± 11%) than in the BFT (600 g m⁻², 74 ± 8%) system. Furthermore, shrimps from EEP exhibited higher antioxidant enzymes activities [super oxide dismutase (SOD) glutathione peroxidase (GPX) catalase (CAT)] in their digestive gland, which may reflect a higher level of reactive oxygen species (ROS). Reproductive success (spawning rate and frequency as well as egg, ω , and nauplii, nii, number) was greatly improved in the shrimp broodstock from BFT, with 63 and 87% more ω and nii produced, respectively compared to those from EEP. Furthermore, the antioxidant defence status of the ω from a BFT broodstock exhibited a significantly higher level of total glutathione (GSH) (19.15 ± 1.57 nmol.mg protein⁻¹) compared to those from EEP breeders (12.64 ± 2.25 nmol.mg protein⁻¹). The

dietary origin of GSH is suspected, as we found high levels of this antioxidant molecule in biofloc flocculates (126 mg L^{-1}). Two hypotheses, not mutually exclusive to one another, are proposed to explain these results. The first relates to a more stable rearing environment in the biofloc system, which provides shrimps with physiological comfort. The second hypothesis concerns the contribution of natural food (organic material and microorganisms) from the biofloc system to the nutrition and health of the shrimp breeders. These results demonstrate that the biofloc system, compared to the traditional EEP system used in NC, is an effective culture method for enhancing broodstock yields and the reproductive performance of the blue shrimp *L. stylirostris*.

Key words: Biofloc technology; Shrimp broodstock culture; *Litopenaeus stylirostris*; Reproductive performance; Antioxidant defences; Antiradical status; Oxidative stress status.

1. Introduction

The Caledonian shrimp farming is based on a single species, *Litopenaeus stylirostris*, which is endemic to the Pacific coasts of Central and South America, from Mexico to northern Peru (Pérez Farfante and Kensley, 1997). The control of the complete life cycle (AQUACOP, 1979) and the development of specific rearing techniques (AQUACOP, 1984; Galinié, 1989) have allowed the commercial farming of this introduced species since 1980. In 2004, New Caledonia (NC) produced 2200 tons of top-quality farmed shrimps; however, since 2005, production has declined to reach 1500 tons in 2012. Different causes have been proposed to explain this decline, among which is the fluctuating quality of the broodstock, which does not allow a sustainable production of larvae by hatcheries. In NC, broodstock are reared extensively in earthen ponds. After an 8 month of grow-out period, broodstock are harvested and transferred to the hatchery where the reproduction occurs (Galinié, 1989). Handling during transfer and eyestalk ablation (EA) of the females cause stress that leads to a high mortality rate and low reproductive performance, which is observed in all hatcheries (Wabete *et al.*, 2006). Thus, the traditional Caledonian rearing method for broodstock raises several issues. Firstly, the poor water-quality control of the grow-out earthen ponds is an issue, especially the temperature, which leads, in the cool season, to slow growth and possibly to Winter Syndrome (Le Groumellec *et al.*, 1996; Chim *et al.*, 2003), and in the hot season to Summer Syndrome (Goarant *et al.*, 2003). Furthermore, when the temperature increases to over 30°C , male breeders become infertile (Perez-Velazquez *et al.*, 2001). Secondly, in NC, the ponds dedicated to broodstock are located in the farm next to the grow-out ponds for commercial shrimp production, which are a potential source of bacterial disease contamination (Herbland and Harache, 2008). Therefore, it is of prime importance to move the broodstock culture strategy in order to achieve easier water-quality management and maximal biosecurity. In this perspective, biofloc technology (BFT), which offers easier water-quality management, higher natural productivity and a higher level of biosecurity (Avnimelech, 2009), might be a good alternative. This

technology has been used to intensively rear shrimp in Tahiti since the 1980s (Aquacop, 1984), but its application to broodstock rearing started more recently in 2006 in Tahiti and NC (Chim *et al.*, 2010). Later, Emerenciano *et al.* (2013) carried out similar studies on the shrimp *Farfantepenaeus duorarum*.

Since 2000, many studies have been carried out on biofloc cultures of penaeid shrimps (Avnimelech, 2009). Most authors agree that biofloc particulates contribute as natural food for the shrimps and lead to lower apparent protein requirements and feed pellet conversion ratios (Browdy *et al.*, 2001; Wasielesky *et al.*, 2006; Avnimelech, 2009; Burford *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2005; Hargreaves, 2006). Furthermore, the growth and survival rates are greatly improved when the shrimps are reared with BFT (Moss *et al.*, 2001; Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004). Indeed, infectious or non-infectious diseases that affect cultured shrimp (Bachère, 2000) are rarely observed in BFT, possibly because biofloc acts as a probiotic (Avnimelech, 2009). However, the role of the rearing system on the health of the shrimps is poorly documented, owing to the difficulty to evaluate the physiological status of the animals *in situ*.

In recent years, several studies have evaluated, with success, the physiological status of aquatic animals by measuring bio-indicators of oxidative stress and antioxidant defence systems (Lushchak, 2011). Indeed, all living organisms are under constant attack from free radicals or, more broadly, from reactive oxygen species (ROS), which can lead to serious cellular damage if they are present in excess. ROS are naturally produced in animals during normal aerobic metabolism (Livingstone, 2001). Their production also comes as part of the immune defence system against foreign microorganisms (Muñoz *et al.*, 2000). Most of the studies in shrimps are restricted to describe only the oxidative stress during exposure to xenobiotics or environmental perturbations (Livingstone, 2001; Li *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2011; Pallavi *et al.*, 2012). Experimental investigations into oxidative stress caused by infectious disease are more rare; in this frame, several studies have shown changes in the activity of some antioxidant enzymes or gene expression following bacterial or viral challenges (Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Rameshthangam and Ramasamy, 2006; Mathew *et al.*, 2007; Sarathi *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Castex *et al.*, 2009, 2010; Parrilla-Taylor *et al.*, 2013). Recently, Xu and Pan (2013) showed a promoting effect of biofloc on the immune cellular response and antioxidant status of cultured shrimp.

In this context, our present study aims to evaluate the influence of rearing culture system extensive outdoor earthen pond (EEP) *versus* BFT on the antioxidant defences, oxidative stress status and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* shrimp broodstock.

2. Materials and methods

2.1 Rearing systems and broodstock husbandry

2.1.1 First growth phase

The *Litopenaeus stylirostris* shrimps used in this experiment were supplied by the Ifremer hatchery of New Caledonia and were reared in earthen pond (1000m², water depth: 1m) for four months, starting at 20-day post larvae (PL20) at a density of 2 postlarvae.m⁻². Shrimp used in this study originated from a single population of post-larvae shrimps. Shrimps were reared according to standard broodstock farming practices in NC as described in detail by Ottogalli *et al.* (1988) and Galinié (1989) until they reached the desired size (25.6 ± 0.64g): shrimp were fed twice a day with a commercial formulated feed (SICA® Grower, 40% of protein). The feeding rate was adjusted weekly according to estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding. A water renewal rate of 50% per day was applied. No aeration system was used.

2.1.2 Second growth phase: Broodstock husbandry

In this study, we compare two systems for rearing shrimp broodstock, that is, the one used traditionally in New Caledonia (NC) in extensive earthen ponds (EEPs) and the one recently developed in intensive biofloc technology (BFT). The sub-adult shrimps (25.6 ± 0.64g) were caught from the pond using a cast net and transferred to four earthen ponds (1000 m², water depth=1m) and four tanks (4 m³) according Wabete *et al.* (2006), where they were grown during 4.5 months to their breeder size, according to EEP and BFT rearing methods, respectively. In our study, the experimental unit is, therefore, represented by the earthen pond or the tank.

2.1.2.1 Extensive earthen pond

The EEP culture system used to rear broodstock in NC is described in detail by Ottogalli *et al.* (1988) and Galinié (1989). Pre-grown sub-adult shrimps (25.6 ± 0.64g) are stocked in 4 ponds at a low density (1 shrimp.m⁻²). A water renewal rate of 50% per day was applied. No aeration system was used. Shrimps were fed twice a day (8:00 am and 3:00 pm) on commercial feed pellets (SICA® Grower, 40% of protein) at 3% of shrimp estimated biomass. The feeding rate was adjusted weekly according to estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding.

2.1.2.2 Biofloc technology

The BFT used for this study was developed in Tahiti by AQUACOP (1984). Four outdoor circular polyethylene tanks, of 4 m³ capacity each, were used to grow the broodstock using BFT. Each tank was equipped with a central aeration system and four peripheral air lifts for uniform aeration in order to

maintain normoxia and floc particulates in the water column. Outdoor tanks were covered with shade nets to control the sun light (60% inhibition of light). Pre-grown sub-adult shrimps ($25.6 \pm 0.64\text{g}$) are stored in 4 tanks at a density of $17 \text{ animals.m}^{-2}$. The shrimps were fed on commercial feed pellets (SICA® Grower, 40% of protein) at 3% of shrimp biomass using feeding trays. The feeding rate is adjusted weekly according to estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding. To balance the C/N ratio and to promote the development of heterotrophic bacteria, molasses from sugarcane (SICA®) was added to obtain a C:N ratio of 12:1 calculated according Avnimelech (2009). A water renewal of 3% of the tank volume was performed daily, mainly to remove deposits of excess organic matter (ecdysis, dead animals, non-consumed pellets etc.).

2.1.2.3 Water-quality management

Temperature and dissolved oxygen levels were recorded twice a day (8:00 am and 3:00 pm) with OxyGard Handy Gamma equipment. The pH value was recorded once a day (8:00 am) with a pH meter (WTW pH197i). Furthermore, the total ammonia nitrogen (TAN) and nitrite nitrogen (NO_2^--N) contents were analysed three times a week using a fluorescence method according to Holmes *et al.* (1999) and a spectrophotometric method according to Bendschneider and Robinson (1952), respectively. The total suspended solids (TSS) were also measured twice weekly. A water sample (50 mL) was collected from each tank and filtered under vacuum pressure through a pre-dried and pre-weighed GF/F filter paper (FW1). The filter paper, containing the suspended materials, was dried in an oven until constant weight (at 60°C for 48 h). The dried samples (FW2) were weighed to 0.01 mg accuracy using a Mettler AC 100 balance. The TSS is the difference between FW1 and FW2.

2.1.2.4 Shrimp biomass estimate in BFT tanks

One feeding tray was set up in each BFT tank. The feed was delivered exclusively on the feeding tray in order to be able to estimate consumption. Food scraps were estimated visually 2 h after each meal and by the same person in order to avoid any skew. Knowing the daily feed consumption, which represents about 2% of the shrimp weight, we estimated the shrimp biomass (SBMe) by the following equation:

$\text{SBMe} = \text{FC} \times 100 / 2$ where FC is the feed consumed and SBMe the shrimp biomass estimated.

2.1.3 Hatchery

The shrimp breeders were caught from grow-out pond (EEP) or grow-out tank (BFT) using a cast net or a dip and were then transferred to the hatchery, according to technology defined by Wabete *et al.* (2006). Shrimps are stocked in circular polyethylene maturation tanks of 3.24 m^3 capacity.

Seven days after the animals were transferred to the hatchery, the females were fished out individually with a landing net for unilateral eyestalk ablation (EA) (Ottogalli *et al.*, 1988). To prevent haemorrhage, a wire ligature was used below the section. The animals were put back in their tank. The water temperature was then increased from around 20°C (cool season) to 29°C at a rate of 1–2°C a day with a heater (2000 W). This temperature was maintained throughout the production period (2 weeks). EA triggers ovarian maturation and leads the shrimps to spawn. Depending on the season, the first females ready to spawn were observed 2–4 days after EA. Their developed ovaries, orange/brown in colour, are easily visible through the carapace, along the dorsal part of the abdomen from the cephalothorax to the base of the last abdominal segment. The gonad development was assessed every day by directing a light towards the animal in its tank. The mature females spawned at between 11:00 am and 2:00 pm. In *L. stylirostris*, as with other open thelycum penaeid species, mating occurs a few hours before spawning. The females that were ready to spawn were inseminated manually 1–2 h before spawning occurred. The spermatophores were extracted by applying simple pressure on the fifth pair of pereopods on the male. The sperm was then extracted, collected and spread, using dissection clips, on the thelycum between the last two pairs of pereopods). The inseminated females were then placed, individually, in calm (without aeration) and dark spawning tanks. A few hours after spawning, the females were transferred back to their original tanks. The feeding regime of the broodstock in the hatchery was fresh food (mussels and squid at 9% of the shrimp biomass) twice a day (8:00 am and 4:00 pm) and commercial feed pellets once a day (1:00 pm) at 3% of the shrimp biomass. Shrimps were fed *ad libitum*. The photoperiod (day/night: 14 h/10 h) was set from the first day. The spotlights above the tanks were turned on at 7:00 pm and turned off at 9:00 am.

2.2 Experimental design

In the first stage, the post-larvae were reared extensively (2 PL.m⁻²) in an earthen pond to pre-adult stage (25.6 ± 0.64 g). Then, the pre-adult animals were transferred to four earthen ponds (1000 m²) and four tanks (4 m³), where they were grown to their breeder size, according to EEP and BFT rearing methods, respectively. In our study, the experimental unit is, therefore, represented by the earthen pond or the tank. Adult shrimps were then transferred from both rearing system, EEP and BFT, to the hatchery. Once in the hatchery, the male and female breeders were separated. Among the males, only those from the EEP were kept in this study; they were stocked in four maturation tanks at a density of 50 individuals per tank, totalling 200 animals. Female breeders were separated according their treatment, that is, EEP or BFT. Each treatment was replicated in four maturation tanks ($n=4$), and each tank was stocked with 25 females from the respective pond (EEP) or tank (BFT). From this stage, all females underwent the same rearing and breeding protocol. In such way that we studied in this experiment only the effect of rearing treatments, EEP

and BFT, that were applied before transferring the broodstock into the hatchery. The experimental design is summarized in Figure III-1.

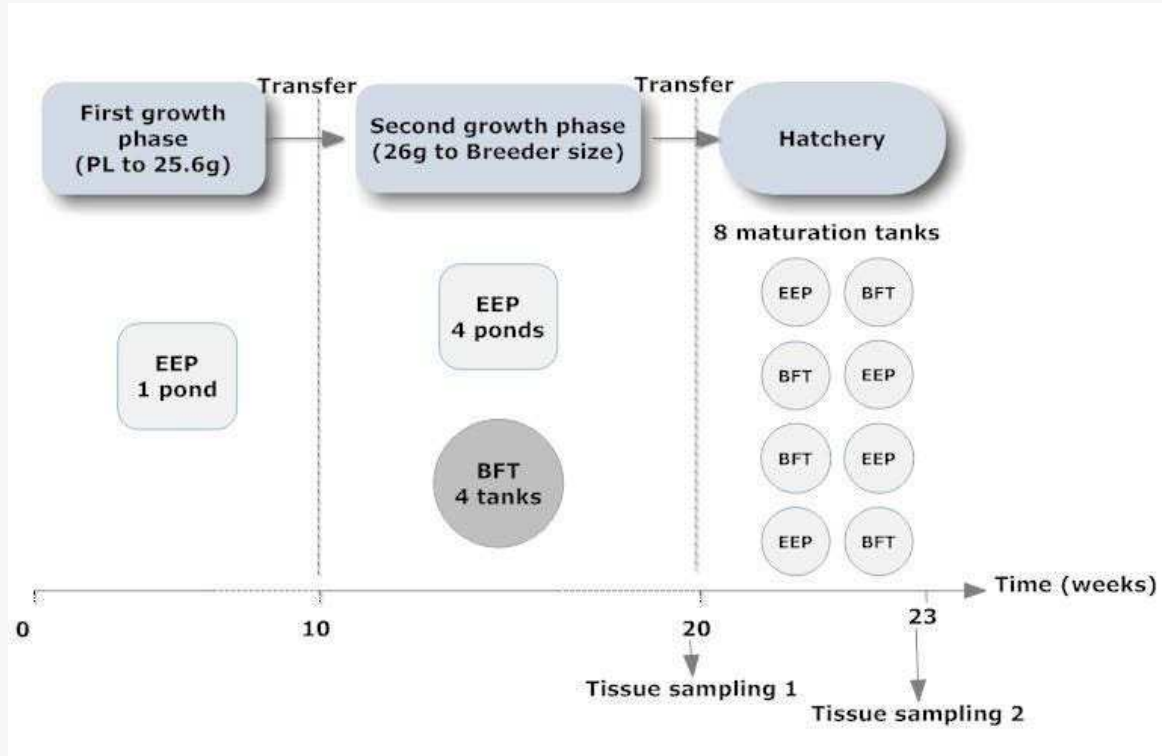


Figure III-1: Summary of experimental design.

2.3 Analysis

2.3.1 Zootechnical data

2.3.1.1 Monitoring the spawning

After EA, and until the end of the experiment (over 15 days), the females that were ready to spawn were monitored and systematically inseminated before being placed individually into the spawning tanks. Cumulative relative spawning (CS in %) can be calculated using the following formula:

$$CS = \left(\sum_{i=0}^n \frac{n P_i}{F_i} \right) \times 100$$
 where i = day i , F_i = the number of females on day i ; P_i = the number of spawns on day i .

2.3.1.2 Determination of spawning rank

After spawning, the females were individually tagged and returned to their maturation tank. Tagging was carried out by coloured eye rings, and the rank of spawns and the spawning frequency for each female could thus be determined.

2.3.1.3 Number of eggs and nauplii per spawn

One hour after spawning and the day after, the number of eggs (ω) and nauplii (nii) were determined for each spawn. Each spawn was concentrated in 3 L by draining the spawning tank over a 100 μ m filter, which was then poured into a 10 L bucket. After manual mixing, a volumetric count of the ω and nii was performed from five samples of 1 mL each.

2.3.2 Biochemical analysis

Only shrimps in intermolt were sampled for oxidative stress analysis. The molting stages were determined by microscopic examination of the antennal scales, according to the method of Drach and Tchernigovtzeff (1967). This was to minimise any variation, and because changes in physiological parameters are generally observed during the molting cycle in crustaceans.

2.3.2.1 Sampling and preservation

Shrimp and egg sampling - The females were sampled at two stages: the day before transferring the breeder to the hatchery (digestive gland) and at the end of the reproduction period (digestive gland and ripe ovaries at stage 4). Samples of three pooled shrimps were collected from each replicate tank or pond at two sampling time. Eggs from first spawning of each treatment were also sampled during the course of the experiment. Three samples of eggs from one spawn were collected from each replicate tank or pond. Individual shrimps were caught and directly put in iced sea water (0°C) to slow down and stop enzyme activity. Individual body weights were recorded. The digestive glands and the ovaries were removed from sampled shrimps and immediately frozen in liquid nitrogen. The eggs were sampled just 1 h after spawning and were processed in the same way.

Biofloc particulate sampling - At the end of the grow-out period, the biofloc was filtered through a 100 μ m mesh and kept at -80°C until required for analysis.

Preservation - The tissue, or biofloc, particulates were homogenised in 10 mM Tris buffer, 1 mM diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) at pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants were kept at -80°C until required for analysis. For the GSH assays, the supernatants were neutralised with 6% metaphosphoric acid before storage.

2.3.2.2 Determination of antioxidant enzyme activity

Prior to SOD, CAT and GPX activity and soluble protein determination, all samples were heat-shocked to enable cell disruption. This was achieved by submitting the samples, three successive times, to 1 min in

liquid nitrogen and then defrosting at 37°C. Total SOD activity was assayed following the method of Marklund and Marklund (1974), which is based on the auto-oxidation of pyrogallol. CAT activity was measured following the reduction of H₂O₂ at 240 nm, according to Clairbone (1985). GPX activity was assayed by following the rate of NADPH oxidation by the coupled reaction with glutathione reductase at 340 nm, using an extinction coefficient of 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹, according to Günzler and Flohé (1985). The soluble protein content was determined by the Folin phenol method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumen (Sigma Chemical Company, Inc., USA) as a standard. All of these methods have been adapted for the microplate reader Synergy HT (Bioteck®). Enzymatic activities were all expressed as specific activities (IU or nmol mg protein⁻¹).

2.3.2.3 Glutathione assays

The total amount of GSH was determined spectrophotometrically using 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid, according to the method of Akerboom and Sies (1981).

2.3.2.4 Malondialdehyde and carbonyl protein assays

As an index of lipid peroxidation, we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is a widely adopted method previously described by Draper and Hadley (1990). Results were expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol mg protein⁻¹). For protein carbonylation, the supernatants were incubated at room temperature for 1 h with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNTP) dissolved in 2 M HCl in order to allow the DNTP to bind to the carbonyl groups (Levine *et al.*, 1994). Blanks were run with HCl only. Afterwards, the proteins were precipitated with 6% trichloroacetic acid (TCA) and subsequently centrifuged for 10 min at 11000 g. The protein pellets were washed three times with ethanol/ethylacetate (1:1), re-suspended in 6 M guanidine hydrochloride and 50% formic acid, and finally incubated at 37°C until complete re-suspension. The carbonyl content was measured spectrophotometrically (Synergy HT, Bioteck) in the resulting suspensions at 370 nm (molar extinction coefficient 22,000 M⁻¹ cm⁻¹). The results were expressed as nanomoles of DNPH incorporated per milligram of protein. The total protein content was determined for each sample, according to the method of Lowry *et al.* (1951).

2.3.3 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using XLSTAT software 2012. Percent data (survival rate) were normalised using an arcsine transformation before the analysis. Shapiro-Wilk and Bartlett's test were used respectively to check the normality and homogeneity of the variances. The one-way analysis of variance (ANOVA) fixed model was used to test the effect of the rearing treatment on the biochemical parameters and reproduction performance indexes. The biomarker panels of the oxidative status and

antioxydative defences were summarised with a star plot, according to that described by Beliaeff and Burgeot (2002).

3. Results

3.1 Grow-out period

3.1.1 Zootechnical performance of the two rearing systems

The performances of the two rearing systems are shown in Table III-1. The growth rate of the shrimps was similar in both treatments ($p>0.05$). Whenever, the average final body weight of the females from EEP was significantly higher compared to those from BFT ($p<0.01$); however, no significant difference in body weight was shown when comparing the males from the two treatments ($p=0.21$). The final biomass was 59 times higher in BFT compared to EEP. The final survival rate was similar in both treatments ($p=0.99$).

Table III-1: Zootechnical results at the end of the grow-out period for the two rearing systems (EEP vs BFT).

S= significance. Values are means $\pm$ s.d (n=4). Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; n.s. non significant).

Parameters	EEP	BFT	S
Initial biomass (g.m ⁻²)	25.60 $\pm$ 0.64	435.20 $\pm$ 10.88	**
Survival rate (%)	64.00 $\pm$ 11.5	74.70 $\pm$ 8.20	n.s
Growth rate (g.day ⁻¹)	0.19 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	n.s
Males final weight (g)	43.64 $\pm$ 0.49	42.54 $\pm$ 0.73	n.s
Females final weight (g)	55.82 $\pm$ 0.69	52.81 $\pm$ 0.53	**
Finale biomass (g.m ⁻²)	23.60 $\pm$ 1.51	798.00 $\pm$ 109.48	**

3.1.2 Water quality parameters

Descriptive statistics of water quality parameters are given in Table III-2. No difference was observed at different pH values, temperature or dissolved oxygen concentrations. Furthermore, all of the parameters measured were within acceptable ranges for the *Litopenaeus stylirostris* shrimp (Della Patrona and Brun, 2008). However, high standard deviations of temperature or dissolved oxygen concentrations in earthen ponds reflect important variations of those parameters over the course of grow-out period.

In BFT tanks, the TSS was in average of 0.07g.L⁻¹(Equivalent to suspended biofloc particulates in dry matter basis). The TSS level increased with time, reaching the highest values during the last 60 days of culture development. At the end of experiment, TSS, represented around 15% of the shrimp biomass (live weight). The concentration of TAN and NO₂⁻-N were maintained at a low level in the BFT system during the 130-day rearing period. The TAN concentration was <0.1 mg.L⁻¹ over the course of the experiment. The

highest NO₂⁻-N concentration (1.52 mg.L⁻¹) was observed after 30 days of rearing and then the concentration gradually decreased until the end of the rearing period.

Table III-2: The overall means ± s.d of measured water quality parameters for the both grow-out systems.

Parameters	EEP	BFT
Temperature (°C)	26.01 ± 3.11	25.9 ± 0.10
Dissolved Oxygen (mg.L ⁻¹)	6.22 ± 2.21	7.0 ± 0.7
pH	8.20 ± 0.21	7.9 ± 0.2
TSS (g.L ⁻¹)	-	0.07 ± 0.03
TAN (mg.L ⁻¹)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0.01 ± 0.02	0.66 ± 0.55

3.1.3 Biofloc GSH content

The average GSH concentration in TSS was 2.37 ± 1.45 mM g⁻¹ protein. The TSS value, the day of sampling, was 0.126 g L⁻¹ rearing water. Subsequently, the concentration of GSH in the rearing water was 0.30 ± 0.18 mM L⁻¹ and we estimate, according to the shrimp biomass in the culture, its potential dietary availability to be 0.21 ± 0.13mM of GSH per gram of shrimp.

3.2 Reproductive performance

3.2.1 Spawning rates

After EA, the evolution of the relative cumulative spawning or spawning rate for the broodstock, from EEP and BFT, is shown in Figure III-2.

Table III-3: Total spawning number, eggs and nauplii produced based on one hundred females per treatment (EEP vs BFT).

S= significance. Values are tank means ±s.d. Stars indicate “significant” differences between treatment (*p<0.05; **p<0.01; n.s. non significant)

Parameters	EEP	BFT	S
Initial number of female	100	100	-
Total spawning number	84.00 ± 25.40	122.00 ± 16.20	*
Total eggs number x10 ⁷	12.73 ± 3.85	21.11 ± 2.82	*
Total nauplii number x10 ⁷	7.79 ± 2.35	14.79 ± 1.98	**

The spawning rate is similar for the two groups during the first 4 days, irrespective of the origin of the female. However, from the fifth day after EA, the cumulative spawning rate is significantly higher for the BFT treatment. The final cumulative spawning rate was significantly higher (p=0.04) in females from BFT

compared to those from EEP (Table III-3). Indeed, females have spawned 122 ± 16.2 times and 84 ± 25.4 times for BFT and EEP treatments, respectively.

Figure III-2 (A, B, C and D) represents the evolution of the relative cumulative spawning rates, including all spawns or according to spawning rank. Figure III-2A shows a higher spawning rate for the treatment of BFT with a finale of 65 and 71% of spawn for the EEP and BFT treatment, respectively. Considering the first spawning rank (Fig. III-2B), the final spawning rate was not significantly different for the EEP and BFT treatments. However, for the second (Fig. III-2C) and third (Fig. III-2D) spawning rank, the females from EEP exhibited a significantly lower cumulative spawning rate compared to females from the BFT treatment. The final cumulative spawning was (i) 17 and 38% for the second spawning rank (Fig. III-2C) of EEP and BFT treatment, respectively ($p=0.04$), and (ii) 1 and 16% for the EEP and BFT treatment, respectively ($p<0.001$), for the third spawning rank (Fig. III-2D).

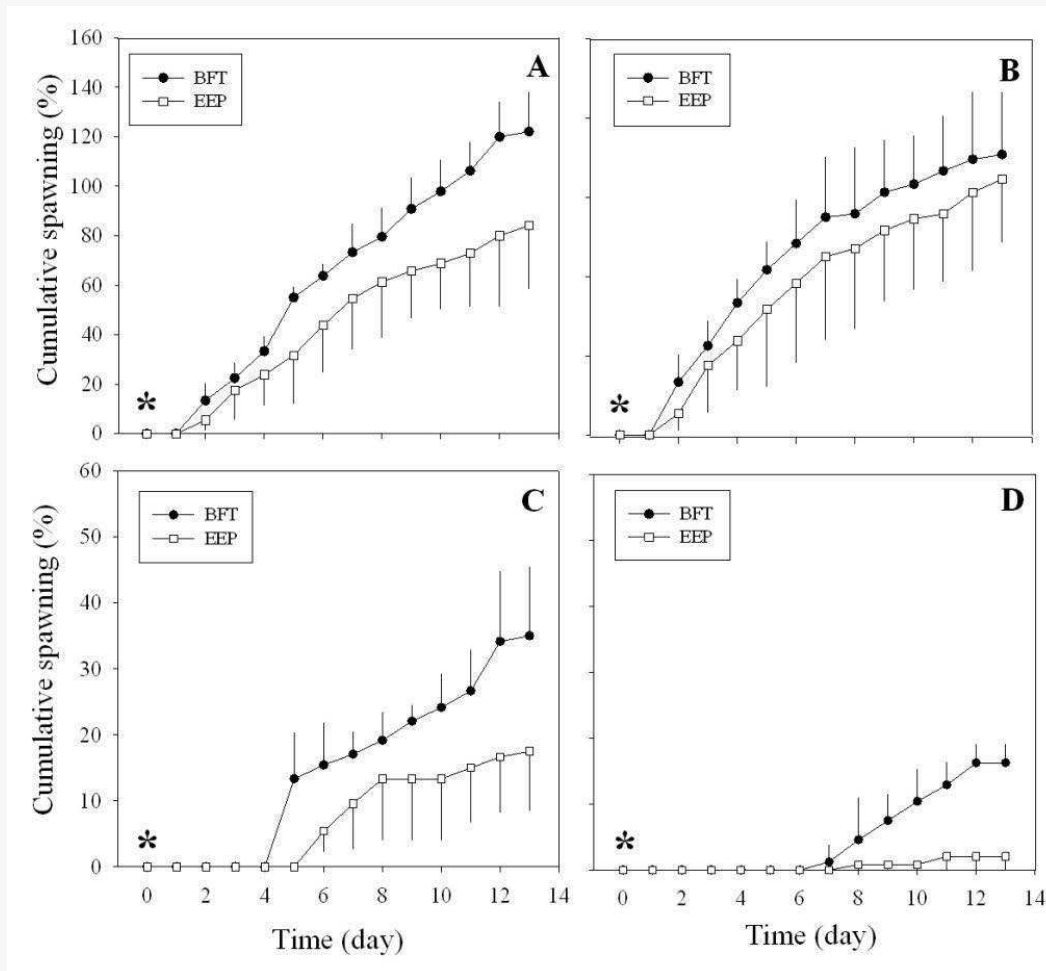


Figure III-2: Evolution of cumulative relative spawning rates from eyes talk ablation (*) for 100 females per treatment (EEP and BFT) including all spawns (A) and according spawning rank 1 (B), spawning rank 2 (C) and spawning rank 3 (D).

Vertical bars represent standard deviation.

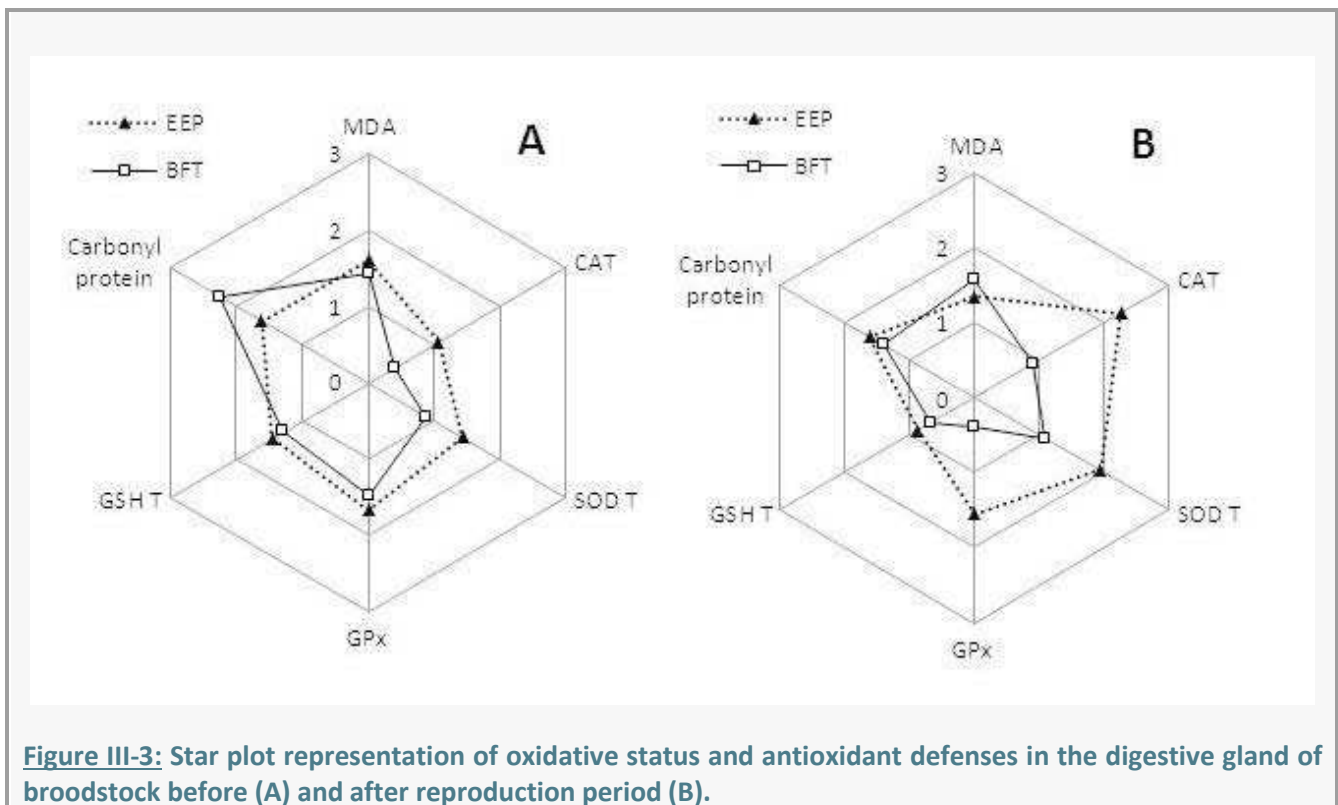
3.2.2 Egg and nii

Females reared using BFT achieved a higher number of ω and nii per spawn ($173099 \pm 80315 \omega$; 121215 ± 62457 nii) compared with the broodstock from EEP treatment ($151639 \pm 60492 \omega$ and 92765 ± 40770 nii). Finally, the broodstock from the BFT treatment achieved a higher total number of ω and nii compared to the EEP treatment. The total numbers of ω and nii produced over the trial period and calculated for 100 females from each treatment are presented in Table III-3. The number of ω and nii were 63 and 87% higher, respectively, for females from BFT compared to those from EEP treatment.

3.3 Antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp broodstock and ω

3.3.1 Broodstock digestive gland

At the end of the grow-out period, antioxidant enzyme activities in the digestible gland of BFT shrimps were lower compared to EEP shrimps by 49.3, 42.3 and 30.3% for CAT ($p=0.007$), GPX ($p=0.01$) and SOD ($p>0.05$), respectively (Table III-4 and Figure III-3A).



However, there were no significant differences with regards to oxidative damage, MDA and carbonyl protein contents or in terms of the level of GSH (Fig. III-3A).

Table III-4: Mean values of antioxidant enzyme activities in the digestive gland of broodstock before and after reproduction for the both treatments.

S= significance. Values are tank means $\pm$ s.d. Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s. non significant).

Parameters	Before reproduction			After reproduction		
	EEP	BFT	S	EEP	BFT	S
Catalase ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)	2.80 ± 0.27	0.99 ± 0.20	**	1.73 ± 1.86	0.66 ± 0.31	n.s
GPX ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)	28.86 ± 4.19	16.66 ± 1.24	**	25.48 ± 6.03	24.99 ± 4.70	n.s
SOD (U.mg protein^{-1})	1.09 ± 0.30	0.76 ± 0.20	n.s	0.69 ± 0.44	0.33 ± 0.31	n.s
GSH T ($\text{mmol.mg protein}^{-1}$)	1.31 ± 5.73	1.05 ± 1.11	n.s	5.73 ± 4.51	5.09 ± 3.40	n.s
MDA ($\text{nmol.mg protein}^{-1}$)	0.94 ± 0.22	1.42 ± 0.80	n.s	0.71 ± 0.27	0.72 ± 0.22	n.s
Carbonyl protein ($\text{nmol.mg protein}^{-1}$)	1.26 ± 0.29	1.21 ± 0.29	n.s	1.55 ± 0.53	1.93 ± 0.63	n.s

At the end of the reproduction period in the hatchery, where the animals were subjected to the same conditions for 15 days, no further effects of the treatments of EEP or BFT were observed in terms of the antioxidant defences and oxidative stress status (Table III- 4 and Figure III-3B).

3.3.2 Ovary and eggs

In the ovary in stage 4, just before spawning, concentration of GSH was higher in BFT ($14.41 \pm 1.85 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) compared to EEP shrimps ($5.17 \pm 1.66 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) ($p=0.04$). In contrast, the level of MDA was lower in BFT ($0.18 \pm 0.01 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) compared to EEP treatment ($0.26 \pm 0.13 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) ($p=0.001$). No difference was observed for the other parameters (Table III- 5).

Table III-5: Oxidative status and antioxidative defenses in ripe ovaries at stage 4 of female broodstock from the both treatments (EEP and BFT).

S= significance. Values are tank means $\pm$ s.d. Stars indicate "significant" differences between treatment (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s. non significant).

Parameters	EEP	BFT	S
Catalase ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)	2.00 ± 0.41	2.34 ± 1.28	n.s
GPX ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)	3.21 ± 2.26	3.04 ± 2.35	n.s
SOD (U.mg protein^{-1})	0.88 ± 0.22	0.84 ± 0.32	n.s
GSH T ($\text{mmol.mg protein}^{-1}$)	5.17 ± 1.66	14.42 ± 1.85	*
MDA ($\text{nmol.mg protein}^{-1}$)	0.26 ± 0.13	0.18 ± 0.01	**
Carbonyl protein($\text{nmol.mg protein}^{-1}$)	1.18 ± 0.10	1.04 ± 0.08	n.s

As for the ovary, the antioxidant defence status of the ω exhibited a significantly higher level of GSH in BFT ($19.15 \pm 1.57 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) compared to EEP treatment ($12.64 \pm 2.25 \text{ nmol.mg protein}^{-1}$) ($p=0.04$). No difference was observed for the other parameters.

4. Discussion

To ensure the reliability of post-larval production in the hatcheries, it is important to understand the origin of the variations in the reproduction of penaeid shrimps in captivity. Most studies in this area have focused on the influence of nutrition (Wouters *et al.*, 2001), size and age (Peixoto *et al.*, 2004) or season (Crocós and Coman, 1997) on the spawning performances and larvae quality. Nevertheless, the consequences of the rearing conditions on broodstock shrimp are poorly documented. Our study was aimed at investigating the influence of shrimp broodstock grow-out systems, extensively in earthen ponds or intensively in BFT, by comparing their reproductive performances.

4.1 Grow-out results

Our study showed a much higher stocking density or “carrying capacity” for the BFT system compared to the traditional EEP system. The carrying capacity refers to the maximum number of shrimps that an environment can support through the oxygen supply and the removal of metabolic waste, and is determined by, amongst other things, the oxygen consumption rate of the fish and their response to metabolic waste products such as CO₂ and ammonia (Ellis *et al.*, 2002). Indeed, during our experimentation, the biomass obtained at the end of the grow-out period was 59 times higher in BFT compared to the EEP system. Nevertheless, this higher “carrying capacity” of the BFT system had little effect on the growth rate, contrary to what was expected. Therefore, we questioned how the BFT, despite its strong breeding load, allows shrimps to sustain their growth. To answer this question, we put forward two hypotheses, which are related and not mutually exclusive. The first relates to animal nutrition and the second to animal welfare.

With respect to the nutritional hypothesis, several studies have shown that bioflocs, which are formed from aggregates of microorganisms and organic particles, are consumed and provide growth-enhancing factors as well as a significant fraction of the protein demand (Ballester *et al.*, 2010; Burford *et al.*, 2004; Crab *et al.*, 2010; Wasielesky *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012; Glencross *et al.*, 2014). Recently, based on a study with C- and N-stable isotopes, our team showed that 39.8% of carbon and 36.9% of nitrogen in juvenile shrimp *L. stylirostris* came from biofloc feeding (Cardona *et al.*, 2013; Cardona *et al.*, unpublished results). Furthermore, the potential feed gain of the application of BFT is estimated to be on the order of 10–20% (De Schryver *et al.*, 2008). Among the dietary microorganisms in the biofloc, the bacteria could act as a probiotic that has a beneficial effect on the health of a host by improving its intestinal equilibrium through improving the feed value, enzymatic contribution to digestion, inhibition of pathogenic microorganisms, antimutagenic and anticarcinogenic actions, growth-promoting factors and increased immune response (Verschuere *et al.*, 2000; Castex *et al.*, 2009, 2010). Indeed, several studies have shown that dietary biofloc could enhance the immune cellular response and antioxidant status of cultured shrimp, probably because it is rich in natural

microorganisms and bioactive compounds (Ju *et al.*, 2008; Xu and Pan, 2013). In the same way, numerous researches have noted that shrimp are healthiest and grow best in aquaculture systems that have high levels of algae, bacteria and other natural biota (Kuhn *et al.*, 2009). Dietary supplements made by the biofloc, and its role in the health of animals, most likely contribute to the welfare of the shrimp. In our study, the welfare of the shrimp broodstock was described by assessing the antioxidant defence status and oxidative stress (Chim *et al.*, 2009).

Several strategies have been proposed to evaluate the oxidative stress status in organisms (Kooter, 2004). It is generally recommended to measure (i) the levels of ROS, (ii) the macromolecules damaged by ROS and (iii) the primary defence against ROS such as antioxidant enzymes or low-molecular-weight ROS scavengers. Monitoring the oxidative stress process is complicated, as ROS are very reactive and, therefore, difficult to measure. The association of several biomarkers is, therefore, regarded as the best way to suitably evaluate the oxidative stress status, which was chosen in this study. Therefore, we measured enzymatic and non-enzymatic antioxidants (CAT, GPX, SOD and GSH) as well as the products or macromolecules damaged by ROS (carbonyl protein, MDA). In our study, we observed, at the end of growing period, higher activities of the antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX) in EEP compared to BFT treatment. These observations lead us to hypothesise that shrimps reared in an earthen pond undergo chronic environmental stress, which is characterised by fluctuations in temperature and oxygen concentration (Lushchak, 2011; Chim *et al.*, 2003), as well as UV exposure that can lead to the photochemical production of diverse reactive transients, such as hydrogen peroxide in sea water (Mopper and Kieber, 2000), which may lead to ROS accumulation in the tissues of the shrimps (Pallavi *et al.*, 2012). The ROS accumulation could explain the higher antioxidative enzyme activity observed in the digestive gland of shrimps reared in earthen ponds. In the biofloc rearing system, the environmental parameters such as temperature, oxygen and light intensity, as we showed in our study, are relatively stable and the shrimps exhibited no stimulation of their antioxidant defences or any sign of oxidative stress (Fig. III-3). Moreover, once animals of both treatments were transferred to the hatchery and put in the same culture conditions, antioxidant enzyme activities of shrimps became similar after 3 weeks whatever the initial grow-out method, EEP or BFT. These results allow us to assume that poor health status and conditions in earthen pond caused stimulated antioxidant enzymes activities measured in the shrimp from EEP treatment.

In summary, despite the much higher carrying capacity of BFT compared to the EEP culture, the supplemental natural of the food intake and better animal welfare in BFT could explain our results, which showed similar production performance, in terms of survival and growth, in both rearing methods.

4.2 Reproduction results

Our results showed a significantly higher cumulative spawning rate (+43% of increase relative to EEP) and higher number of ω (+15%) and nii (+31%) per spawn of female from the BFT treatment. In the meantime, during the course of the experiment, the females from BFT spawned three times compared to only twice for EEP females. In our study, the amount of energy allocated to reproduction may have been higher for the female from BFT, which exhibited higher reproductive performance, compared to those from the EEP treatment. However, the question remains as to how the females from BFT provide the extra energy that is necessary for the higher reproduction performance. Our results do not allow us to answer these questions, and we can only propose some assumptions. There are two possibilities that can coexist. The surplus energy allocated to reproduction can come from the extra reserves built up by the animal during the growing phase. Indeed, shrimp reared in BFT found, aside the commercial pellet diet, further dietary nutrients as lipids or bioactive compounds derived from the natural productivity (biofloc aggregates). Or the surplus energy can come from changing the energy partitioning by allocating more energy to reproduction without endangering the self-maintenance of the shrimp. We can suggest the hypothesis that animals that grow out in BFT are subjected to less environmental stress, as shown above, and the energy saved can be invested into reproduction.

The embryos and pre-feeding larvae of crustaceans are lecithotrophic, as their nutrition is solely supplied by egg-yolk reserves (Harrisson, 1990). The quality and quantity of nutrients in egg yolks are dependent on the maternal body reserves, capacity for biosynthesis and dietary intake during maturation (Racotta *et al.*, 2003). As the vitellus lipids contain high proportions of highly unsaturated fatty acids, or *n*-HUFA (Wouters *et al.*, 2001), which are particularly susceptible to peroxidation (Lokesh *et al.*, 1981), we assessed the antioxidant defences by measuring the GSH levels in the ripe ovaries (at the end of the secondary vitellogenesis) and in the eggs (1 h after spawning). GSH is considered to be one of the most important components of the antioxidant defences of living cells as it neutralises hydroxyl radicals, against which there is no enzymatic neutralisation (Surai, 2002; Monaghan *et al.*, 2008). Therefore, the maintenance of GSH levels is crucial to organisms that periodically undergo oxidative stress (Storey, 1996). Our results showed that the GSH levels were significantly higher in ripe ovaries and eggs of females from BFT; consequently, the levels of lipid peroxidation, revealed by MDA content, in ripe ovaries was lower in this last treatment. GSH that accumulated in the ovaries and eggs could be endogenously produced or obtained through the diet. In our study, the high concentration of GSH in the biofloc flocculates, which represented around 15% of the shrimp biomass (dry weight basis), suggested a dietary origin of the GSH concentrated in both the ovary and the egg. GSH, once synthesised or ingested, can undergo transport across biological membranes (Sies, 1999); we can therefore assume that GSH in biofloc flocculates consumed by the shrimp goes into the bloodstream

in order to supply the ovaries and the ovocytes. Similarly, Xu and Pan (2013) have shown the beneficial effects of biofloc as a potential dietary source of antioxidants for the shrimp *L. vannamei*. Higher GSH concentrations in ovaries and eggs from BFT females should provide a better ability of the embryos and pre-feeding larvae to manage excess ROS and, especially at these developmental stages, shrimps are particularly susceptible to oxidative stress (small size, high metabolism, tissue rich in PUFA).

5. Conclusion

Finally, we have shown the possibility to grow, in an intensive way through BFT, breeders of the shrimp *L. stylirostris*. Despite stocking densities being much higher in BFT, the reproductive performance of broodstock is much higher than shrimp breeders from an extensive growing method in earthen pond. Reproduction is accompanied by a significant energy demand, which in turn leads to increasing oxygen consumption by the animal and, therefore, higher ROS production. We hypothesise that the extra energy required to produce more eggs by the shrimps from BFT may come from feeding biofloc aggregates. To this end, the next steps of our study will be to assess the contribution of the biofloc to lipid nutrition and the growth of the shrimps in order to confirm or assess the putative role of dietary GSH from biofloc in the reproductive performance of the broodstock and the health of the embryo and pre-feeding larvae of *L. stylirostris*.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Government and Southern, North and Island Provinces of New-Caledonia and the management of marine resources and mining of Tahiti. We would like to thank all the IFREMER staff at the Aquaculture Department of New Caledonia for their help during the running of the experiment.

References

- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulphides in biological samples, *Methods Enzymol* 77, 373-382.
- Aquacop, 1979. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P.monodon*, *P.stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of the World Mariculture Society* 10, 445-452.
- Aquacop, 1984. Review of ten year of experimental penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). *Journal of the World Mariculture Society* 15, 73-91.
- Avnimelech, Y., 2009. *Biofloc Technology - A practical guide Book*. Baton Rouge, Louisiana, United States, The World Aquaculture Society.
- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., De Abreu, L., Wasielesky Jr, W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 163-172.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*, Vol 21, No 6, pp. 1316-1322.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Bendschneider, K., and Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. mar. Res.*, 11, pp. 87–96.
- Browdy, C.L., Bratford, D., Stokes, A.d., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. Worldaqua. Soc., Baton Rouge. LA, pp. 20–34.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, P.R., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525–537.
- Cardona, E., Chim, L., Richard, P., Geffroy, C., 2013. Respective contribution of the artificial feed and natural productivity determined by C and N natural stable isotope in biofloc experimental rearing system of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Book of abstract, World Aquaculture Society, Ho Chi Minh, December 2013.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, Volume 294, Issues 3–4, Pages 306–313
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 28, Issue 4, Pages 622–631, ISSN 1050-4648, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.024>.
- Chim, L., Galois, R., Martin, J.L.M., Lemaire, P., Wabete, N., Massabuau, J.C., Cuzon, G., 2003. Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution des aliments en fonction des saisons d'élevage. In book styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie ; Ifremer. Actes Colloq (Vol. 38, pp. 99–105).
- Chim, L., Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., 2009. Oxidative Stress Studies applied to the Farmed Shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia Proceedings of the 11th Pacific science inter-congress. 2nd symposium on French research in the Pacific. 02–06 March 2009. Tahiti.
- Chim, L., Huber, M., Lemaire, P., Brun, P., Goguenheim, J., 2010. Floc culture system applied for intensive broodstock farming of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*: First trial carried out in New Caledonia. EAS Aquaculture Europe 2010. In book of abstract.
- Clairborne, A., 1985. Catalase. In: R. Greenwald, Editor, *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, New York, 283–284.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4), 559–567.
- Crococ, P.J., Coman, G.J., 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimising broodstock selection. *Aquaculture*, 155(1), 55–67.
- Della Patrona, L., Brun, P., 2008. L'élevage de la crevette bleue en Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus stylirostris*. Ifremer, Département LEAD (Laboratoire Ecosystème et Aquaculture Durable) en Nouvelle-Calédonie
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3), 125–137.
- Drach, P., Tchernifovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596–609.
- Draper, H.H., Hadley M., 1990. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186, 421–431.
- Ellis, T., North, B.A., Scott, P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* Volume 61, Issue 3, pages 493–531
- Emerenciano, M., Cuzon, G., C., Arevalo, M., Gaxiola, G., 2013. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., Schell, D.M., 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquac. Res.* 33, 839–846.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Galinié, C., 1989. Shrimp aquaculture in New Caledonia. Advances in tropical aquaculture Tahiti, Feb 20–March 4 AQUACOP IFREMER Actes de Colloque, vol. 9 (1989), pp. 45–50.
- Glencross B., Irvin, S., Arnold S., Blyth D., Bourne N., Preston, N., 2014. Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.033>.
- Goarant, C., Herlin, J., Ansquer, D., Imbert, F., Domalain, D., Marteau, A.L., 2003. Epidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du syndrome d'été : résultats préliminaires du programme Désans. In book styli 2003, Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie ; Ifremer. Actes Colloq (Vol. 38, pp. 210-215).
- Gómez-Anduro, G., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G., 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Developmental and Comparative Immunology 30, 893-900.
- Günzler, A., Flohé, L., 1985. Glutathione peroxidase. In: R.A. Greenwald, Editor, CRC handbook of methods for oxygen radical research (Vol. 1), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA (1985), 285–290.
- Hargreaves J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquacultural Engineering 34, 344–363.
- 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.
- Herbland, A., Harache, Y., 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, 15-31.
- Hsieh, S.H., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H., Kuo, C.M., 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture 275, 335-341.
- Holmes, R.M., Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56(10): 1801-1808.
- Ju Z., Forster I., Conquest L., Dominy W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquaculture Nutrition 14.
- Kooter, I. M., 2004. Inventory of biomarkers for oxidative stress. RIVM report 630111001.
- Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Lawrence, A.L., Marsh, L., Flick Jr, G.J., 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. Aquaculture, 296(1), 51-57.
- Le Groumellec, M., Goarant, C., Haffner, P., Berthe, F., Costa, R., Mermoud, I., 1996. Syndrome 93 in New Caledonia: investigation of the bacterial hypothesis by experimental infections, with reference to stress-induced mortality. SICPPS Book of Abstracts. SEAFDEC, Iloilo City, Philippines. p. 46.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology, 233, Academic Press, New York, pp. 346-357.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., Qin, J.G., 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. Aquaculture 274, 80-86.
- Liu, C. H., Tseng, M. C., Cheng, W., 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. Fish & shellfish immunology, 23(1), 34-45.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42, 656-666.
- Lokesh, B. R., Mathur, S. N., Spector, A. A., 1981. Effect of fatty acid saturation on NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. Journal of lipid research, 22(6), 905-915.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, Volume 101, Issue 1, 17 January 2011, Pages 13-30, ISSN 0166-445X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Marklund, S., and Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, European Journal of Biochemistry 47, 469- 474.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Mathew, S., Kumar, K.A., Anandan, R., Nair, P.G.V., Devadasan, K., 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology, C 145, 315-320.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H., Ricklefs, R.E., 2008. The evolutionary ecology of senescence. Funct. Ecol., 22, 371-378.
- Mopper, K., Kieber, D. J., 2000. Marine photochemistry and its impact on carbon cycling. The effects of UV radiation in the marine environment, 10, 101-129.
- Moss, S.M., Divakaran, S. & Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research 32, 125-132.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191, 89-107.
- Ottogalli, L., Galinie, C., Goxe, D., 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia J. Aquac. Trop., 3 (1988), pp. 111-125.
- Pallavi, P. N., Babu, K. N., Reddy, D. C., Kalarani, V., 2012. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of *Penaeus monodon* acclimated to different salinities. World, 4(5), 539-549.
- Parrilla-Taylor, D. P., Zenteno-Savín, T., Magallón-Barajas, F. J., 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. Aquaculture, 380, 41-46.
- Peixoto, S., Cavalli, R. O., Wasielesky, W., D'Incao, F., Krummenauer, D., Milach, Â. M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. Aquaculture, 238(1), 173-182.
- Pérez Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world (keys and diagnoses for the families and genera), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Perez-Velazquez, M., Bray, W.A., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M., L. Gonzalez-Felixa, M., 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 198, Issues 3-4, pp 209-218.
- Qiu, J., Wang, W.N., Wang, L.J., Liu Y.F., Wang A.L., 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 154(1), 36-41.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture, 227(1), 107-130.
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSVinfected *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture 254, 32-39.
- Sarathi, M., Ahmed, V.P.I., Venkatesan, C., Balasubramanian, G., Prabavathy, J., Hameed, A.S.S., 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Aquaculture 27, 8-20.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquacultural engineering, 32(3), 379-401.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radical Biology and Medicine, 27(9), 916-921.
- Storey, K. B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 29, 1715-1733.
- Surai, P. F., 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.
- Tacon, A.G.J., Cody, J., Conquest, L., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition 8, 121-137.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biocontrol agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(4), 655-671.
- Wabete, N., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Massabuau, J. C., 2006. A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress. Aquaculture, 260: 181-193.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Wasielensky, W., Atwood, H., Stokes, A. & Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403.
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202(1), 1-21.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., Sun, X.H., Huang, J., 2012. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03115.x>
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412, 117-124.
- Zhang, O., Li, F., Zhang, X., Dong, B., Zhang, J., Xie, Y., Xiang, J., 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 584-591.

Article 4: Biofloc contributions to antioxidant defence status, lipid nutrition and reproductive performance of broodstock of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: consequences for the quality of eggs and larvae

Emilie Cardona^{1,2}, Bénédicte Lorgeoux¹, Liet Chim², Jean Goguenheim¹, Hervé Le Delliou³, Chantal Cahu³.

¹IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, Unité de recherche Ressources Marines, B.P 7004, 98719 Taravao, French Polynesia (emilie.cardona@ifremer.fr).

²IFREMER, Unité de recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle Calédonie B.P. 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia.

³IFREMER, Centre de Brest, Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, UMR 6539 LEMAR, 29280 Plouzane, France.

Article soumis dans le journal Aquaculture

Highlights

- Biofloc technology (BFT) compared to Clear water (CW) breeding improved the antioxidant status of shrimps.
- BFT enhanced the reproductive performance of broodstock and shrimp larvae survival.
- Biofloc particulates represent a potential source of dietary glutathione and a significant source of lipids, particularly phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids necessary to sustain reproduction, embryonic and larval development.

Abstract

The aim of this study was to determine biofloc contributions to the antioxidant status and lipid nutrition of broodstock of *Litopenaeus stylirostris* in relationship with their reproductive performance and the health of larvae produced. Shrimp broodstock reared with Biofloc technology (BFT) compared to Clear water (CW) exhibited a higher health status with (i) a better final survival rate during the reproduction period (52.6% in CW against 79.8% in BFT); (ii) higher glutathione level (GSH) and total antioxidant status (TAS), reduced oxidized/reduced glutathione ratio and a higher spawning rate and frequency as well as higher gonadosomatic index and number of spawned eggs. Finally, larvae from broodstock from BFT exhibited higher survival rates at the Zoe 2 (+37%) and Post Larvae 1 (+51%) stages when compared with those from females from CW treatment. The improved reproductive performance of the broodstock and higher larvae survival rate resulting from BFT treatment may be linked to the dietary supplement obtained by the shrimp from natural productivity during BFT rearing. Indeed, our study confirms that biofloc particulates represent a potential source of dietary glutathione and a significant source of lipids, particularly essential phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) for shrimps. Thus, broodstock from BFT treatment

accumulated phospholipids, n-3 HUFA and arachidonic acid, which are necessary for vitellogenesis, embryogenesis and pre-feeding larval development.

Key words: Biofloc technology – Shrimp broodstock culture – *Litopenaeus stylirostris* – reproductive performance – antioxidant defences – fatty acids – larval survival

1. Introduction

Biofloc Technology (BFT) is a breeding system with zero or minimal water exchange. In this system, the development of aggregates of microbes such as bacteria, microalgae, protozoa and others, along with detritus including organic particles, takes place in the water column (Avnimelech, 2009). The resulting aggregates or biofloc of the microbial community present in this system contribute to maintaining the rearing water's quality and can be used as a nutrient source for the shrimp (Burford *et al.*, 2004; Avnimelech, 2009).

Since the turn of the century, many studies have been carried out on biofloc culture of penaeid shrimps (Avnimelech, 2009). Most authors agree that biofloc particulates contribute as a natural food for the shrimps and lead to lower apparent protein requirements and feed pellet conversion ratios (Browdy *et al.*, 2001; Wasielesky *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2005; Hargreaves, 2006). In addition, growth and the survival rates are improved when the shrimps are reared with BFT (Epp *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2002; Burford *et al.*, 2004). Biofloc technology has been used to rear shrimp intensively in Tahiti since the 1980s (Aquacop, 1984) but its application to broodstock rearing started more recently in 2006 in Tahiti and New Caledonia (Chim *et al.*, 2010). These authors showed that reproductive performances of *L. stylirostris* broodstock from BFT were dramatically improved compared to those reared extensively in an earthen pond. This improvement in reproduction could be explained by the extra dietary energy from biofloc aggregates allowing the shrimps to produce more eggs and spawn more frequently. In addition, several studies have shown that biofloc is consumed by the shrimp and provides growth-enhancing factors as well as a significant fraction of the overall protein demand (Burford *et al.*, 2004; Crab *et al.*, 2010; Wasielesky *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012). Other studies have shown that dietary biofloc could enhance the cellular immune response and antioxidant status of cultured shrimp, probably because it is rich in natural microorganisms and bioactive compounds (Ju *et al.*, 2008; Xu and Pan, 2013). Many authors determined that biofloc particles are a potential source of lipids and fatty acids that could contribute to juvenile shrimp nutrition (Crab *et al.*, 2010; Shyne Anand *et al.*, 2014). Moreover, several studies have shown that dietary biofloc could enhance the immune cellular response and antioxidant status of cultured shrimp, probably because it is rich in natural microorganisms and bioactive compounds (Ju *et al.*, 2008; Xu and Pan, 2013). In the same way, numerous researches have noted that shrimp are healthiest and grow best in aquaculture systems that have high levels of algae,

bacteria and other natural biota (Avnimelech, 2009; Kuhn *et al.*, 2009). Dietary supplements made by the biofloc, and its role in the health of animals, most likely contribute to the welfare of the shrimp.

However, the nutritional contribution of biofloc to the reproductive performance, quality of eggs and early larval stage of penaeid shrimps is poorly documented. The prime factors that could cause differences in reproductive performance and the success of embryonic development are the physiological and nutritional status of the female (Palacios *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2008). Moreover, the relationship between broodstock and offspring quality is often suspected insofar as the vitellus of penaeid shrimp eggs must entirely support the development of the embryo and the first larval stages (nauplius) until molting into a “first-feeding” larvae (Zoe1) (Harrison, 1990). Indeed, the embryo and pre-feeding larvae of penaeid shrimps are lecithotrophic, as their nutrition is solely supplied by egg yolk reserves. The quality and quantity of nutrients in the egg yolk is dependent on maternal body reserves, the capacity for biosynthesis, and dietary intake during maturation (Harrison, 1990). Lipids that provide energy as well as essential nutrients, such as phospholipids (PLs) and essential fatty acids, are believed to be key nutritional factors influencing the reproductive process, egg hatching rate and larval survival of penaeid shrimps (Teshima *et al.*, 1989; Cahu *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994).

In this context, the aim of the present study is to assess the biofloc contribution to the antioxidant status and lipid nutrition of *L. stylirostris* broodstock in relationship to their reproductive performance, egg lipids composition and the health of *their* larvae.

2. Material and methods

2.1 Experimental shrimps

The *L. stylirostris* shrimps used in our experiments came from a single population of post-larvae produced in the hatchery that were reared semi-intensively (without aeration) in earthen ponds (8 PL. m⁻²) at the Aquaculture Technical Centre of Tahiti (French Polynesia).

2.2 Broodstock grow-out systems and experimental design

At the end of the growth period in earthen ponds, 1800 adult *L. stylirostris* (mean weight 40.6 ± 0.67 g) were fished out and transferred into six 25 m³ circular polyethylene tanks where they were reared under the same conditions for one week (acclimatization period) prior to beginning the experiment. Each tank was equipped with central aeration to uniform aeration to maintain normoxia in the water column. The water exchange rate was 200% daily. Each tank was stocked with 12 animals.m⁻². Shrimps were fed using an automatic feeder, 3% of their estimated biomass daily, with commercial feed (Grower 40, SICA).

After this week of acclimation, tanks were assigned to two different treatments during 10 weeks: Clear Water (CW) and BioFloc Technology (BFT); each treatment was carried out in triplicate ($n=3$ tanks). In our study, the experimental unit is therefore represented by the tank.

CW management - the broodstock culture in clear water management was carried out in the same way as during the acclimation period of the animals (see above). The turnover rate of the water was kept high (200% daily) in order to eliminate organic matter from the rearing volume.

BFT management - the BFT used for this study was developed by Aquacop team in Tahiti (Aquacop, 1984). In this experiment, all rearing parameters were kept identical to those in the CW treatment except the renewal rate of the water and the provision of molasses (SICA ©) as a carbon source from cane sugar to increase the C:N ratio. Thus, the daily water renewal was only 3% of the tank volume, mainly for removing deposits of excess organic matter (ecdysis, dead animals, unconsumed pellets...). Molasses was added daily to maintain a C:N ratio of 20:1 in order to promote the development of heterotrophic bacteria (Avnimelech, 2009).

2.3 Water quality monitoring

Temperature and dissolved oxygen were recorded twice per day (08:00 am and 03:00 pm) with an OxyGard Handy Gamma. The pH was recorded once per day (08:00 am) with a pH meter (Hach Lange HQ 40D). Furthermore, total ammonia nitrogen (TAN) and nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2\text{-N}$) were analysed twice per week by the fluorescence method according to Holmes *et al.* (1999) and the spectrophotometric method according to Bendschneider and Robinson (1952), respectively. Total suspended solids (TSS) were also measured twice weekly: a water sample (50 ml) was collected from each tank and filtered under vacuum pressure through pre-dried and pre-weighed GF/C filter paper (FW1). The filter paper containing suspended materials was dried in an oven until it attained a constant weight (60°C for 24 h). Dried samples (FW2) were weighed to 0.01 mg using a Mettler AC 100 balance. TSS is the difference between FW1 and FW2. Chlorophyll a (Chl a) was determined using a spectrophotometer (Trilogy Turner Design) at wavelengths of 664 and 750 nm, following the method of Holm-Hansen *et al.* (1965).

2.4 Broodstock breeding and experimental design

After 10 weeks in the growth phase according to the CW and BFT treatments (see §1.2), the shrimp broodstock were transferred to the hatchery. Shrimps were caught in a grow-out tank using a cast net and a dip and transferred to the hatchery according to technology defined by Wabete *et al.* (2006). Once in the hatchery, male and female shrimps were stocked separately in circular polyethylene “maturation tanks” with a 4 m³ water capacity. Among the males, only those from BFT were kept; they were stocked into two maturation tanks at a density of 100 individuals per tank, totalling 200 animals. In contrast, females from

different grow-out tanks were kept separately: each maturation tank received animals from a single corresponding grow out tank. In this way, the only treatments applied, CW and BFT, were before the transfer of broodstock into the hatchery, with 3 replicates per treatment. During the reproduction period, the experimental unit was represented by the rearing “maturation tank” ($n=3$ for each original treatment).

Once in the hatchery all the females underwent the same breeding protocol described hereafter. Seven days after the animals were transferred to the hatchery, the females were fished out individually with a landing net to undergo unilateral eyestalk ablation (Ottogalli *et al.*, 1988). To prevent haemorrhage, a wire ligature was used below the section. Once the operation was over, the animals were returned to in their initial tank. Eyestalk ablation triggers ovarian maturation and leads the shrimps to spawn. The first females ready to spawn were observed two to three days after eyestalk ablation. They are detectable by their developed ovaries, orange/brown in colour, which are easily visible through the carapace along the dorsal part of the abdomen from the cephalothorax to the base of the telson. The state of gonad development was assessed daily by directing a light towards the animal in its tank. The mature females spawned between 11:00 am and 02:00 pm. In *L. stylirostris*, as in other open thelycum penaeid species, mating occurs a few hours before spawning. In the laboratory, the males and females were kept in separate tanks and females that were ready to spawn were inseminated manually one to two hours before spawning occurred. The spermatophores were extracted by simple dorso-ventral pressure on the 5th pair of pereopods on the male. The sperm was then extracted from the spermatophore and spread, using forceps, on the thelycum (a simple depression of the cuticle in the ventral area of the female) between the two last pair of pereopods. The inseminated females were then placed individually in calm (without aeration) and dark spawning tanks. Right after spawning, the females were transferred back to their original tanks. The feeding regime of the broodstock in the hatchery was: fresh food twice a day (08:00 am and 04:00 pm) (mussels and squid at 9% of shrimp biomass) and commercial feed pellets once a day (01:00 pm) (at 3% of shrimp biomass). Shrimps were fed *ad libitum*. The photoperiod (day/night: 14 h/10 h) was set from the first day: the spotlights above the tanks were switched on at 06:00 pm and turned off at 08:00 am.

2.5 Larval rearing and experimental design

Nauplii (nii) collected from broodstock during the second and third days of the reproduction period were mixed and randomly distributed according to the original treatment (CW or BFT) given the breeders in sixteen (16) 150-L tanks at an initial stocking density of 160 nii per litre of seawater. Each treatment comparing larvae from CW vs. BFT breeders was then carried out in eight tanks ($n=8$). All larvae were cultured under identical conditions. The water temperature was maintained at 30–31 °C and a 14 h:10 h photoperiod was used. The water temperature, survival and growth of the larvae were measured daily.

An algae mixture of *Chaetoceros gracilis* and *Isochrysis galbana* was distributed one time at the niii V stage. Thirty hours after stocking, larvae were fed microparticles (INVE Frippack® CD2 30-90µm) *ad libitum* and from day 5 they were fed live preys (*Artemia* spp.). The amount of food and proportion of *Artemia* sp. added was adjusted for each larval stage. Prophylactic antibiotic (Oxytetracycline hydrochloride- Limoxin WS- Holland) was applied at a concentration of 15 ppm every three days from the Zoe 2 stage.

Survival and growth were studied at two stages of larval development. For this purpose, 4 tanks per treatment were sacrificed ($n=4$) when the larvae reached Zoe 2 and Post larvae 1 stages, respectively. To estimate the number of larvae, each tank was drained into a 10 litre bucket over a 250 µm filter. Then, after manual mixing, a volumetric count of the larvae was done under a microscope from 10 samples of 25 mL each. Furthermore, a sample was observed to calculate the proportions of different larval stages.

2.6 Analysis

2.6.1 Zootechnical data

2.6.1.1 Monitoring ovarian maturation and spawning

After eyestalk ablation and until the end of the experiment (over 10 days), females that were ready to spawn were monitored and systematically inseminated before being placed individually into the spawning tanks. Cumulative relative spawning (CS in %) can be calculated using the following formula:

$$CS = \left(\sum_{i=0}^n \frac{P_i}{F_i} \right) \times 100, \text{ where } i = \text{day } i; F_i = \text{number of females on day } i; P_i = \text{number of spawns on day } i.$$

2.6.1.2 Determination of spawning rank

After spawning, the females were individually tagged and returned to their maturation tank. Tagging was carried out by coloured eye rings; the rank of spawns and spawning frequency for each female could thus be determined.

2.6.1.3 Number of eggs per spawn

One hour after spawning, the number of eggs was determined for each spawn. Each spawn was concentrated into 3 litres by draining the spawning tank over a 100 µm filter, and then poured in a 10 litre bucket. After manual mixing, a volumetric count of the eggs and nauplii was done from 5 samples of 1 ml each.

2.6.1.4 Gonado-somatic index (GSI)

According to Lagler (1971), the gonado-somatic index (GSI) is the ratio of gonad weight (Wg) to total body weight (Wt). GSI can be calculated using the following formula:

$$\text{GSI (\%)} = \frac{W_g}{W_t} \times 100$$

Average GSI was determined for 3 mature females (ripe ovaries at stage 4; stage determined according to King (1948) and Yano *et al.* (1988)) per maturation tank for a total of 9 average values (three per tank) per treatment.

2.6.2 Biochemical analysis

Only shrimps in inter-molt were sampled for oxidative stress analysis. Molting stages were determined by microscopic examination of antennal scales according to the method of Drach and Tchernigovtzeff (1967). This was to minimize variations, and because changes in physiological parameters are generally observed during the molting cycle in crustaceans.

2.6.2.1 Sampling and preservation

Shrimp and egg sampling - The digestive glands from nine female breeders were sampled for each treatment (three per tank) the day before transferring them to the hatchery. Individual shrimps were caught and directly put in iced sea water (0°C) to slow down and halt enzyme activity. Individual body weights were recorded. The digestive glands were removed from sampled shrimps, separated into three parts and immediately frozen in liquid nitrogen. The eggs were sampled just one hour after spawning and were processed in the same way.

Biofloc particulate sampling - At the end of the grow-out period, biofloc was filtered through a 100 µm mesh and kept at – 80 °C until analysed (one sample from each BFT tank).

Preservation for antioxidant defence analysis - Tissues and biofloc particles were defrosted. One part was homogenized in 4 ml of 10 mM Tris buffer, 1 mM DTPA, 1 mM PMSF, pH 7.4 and the other part in 4 ml of 30 mM trisodium citrate buffer, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA specifically for Total Antioxidant Status (TAS) determination. The homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatants were kept at – 80 °C until analysed. For glutathione (GSH) assays, the supernatants were neutralized with 6% metaphosphoric acid before storage.

Preservation for lipid analysis - Tissues and particles were dried with a lyophilisator (Alpha 1-2 LD, Christ®) for 48 hours.

2.6.2.2 Antioxidant defences

All the parameters were determined by biochemical assays with a microplate reader (Bioteck®).

Determination of antioxidant enzyme activity - Prior to SOD and CAT activity and soluble protein determinations, all samples were heat-shocked to enable cell disruption. This was achieved by submitting the samples three successive times to 1 min in liquid nitrogen and then defrosting at 37°C. Total SOD activity was assayed following the method of Marklund and Marklund (1974), which is based on the auto-oxidation of pyrogallol. CAT activity was measured by following the reduction of H₂O₂ at 240 nm according to Clairbone (1985). The soluble protein content was determined by the Bradford method (1976) using bovine serum albumen (Sigma Chemical Company, Inc., USA) as a standard. Enzymatic activities were all expressed as specific activities (IU, nmol.mg of protein⁻¹).

Glutathione assays and total antioxidant status determination - The amounts of total glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined spectrophotometrically using 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid according to the method of Akerboom and Sies (1981). The GSSG/GSH ratio correlating positively with oxidative stress level (Storey, 1996), was calculated. TAS is a quantitative measurement that represents the total contribution from a wide range of antioxidant molecules (Prior and Cao, 1999). Increasing values reflect higher levels of antioxidant defences against free radical reactions. Using TAS to detect the actual antioxidant status in crustaceans has been previously limited to evaluations of the effects of astaxanthin (Pan *et al.*, 2003). TAS was determined using the Randox Kit, referred to as the “Total Antioxidant Status Kit” (Randox Co., Antrim, UK). The TAS of a sample is a quantitative measurement of the state of balance of various antioxidant components under specified reaction conditions. The kit used allows measurement of the total amount of blood antioxidants by inhibition of the transformation of 2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS[®]) into its cation radical (ABTS[®]+) in the presence of a peroxidase (metmyoglobin) and H₂O₂. The total protein content was also determined by the Bradford method (1976) for GSH and TAS samples. The results were expressed as mmol or μmol. mg protein⁻¹, respectively, for GSH and TAS content.

2.6.2.3 Lipid analysis

Lipids were extracted according to Folch *et al.* (1957) using an accelerated solvent extractor (ASE 350[®]). Neutral lipids (NL) and phospholipids (PL) were separated using Macherey-Nagel Chromafix[®] Cartridges (ref-731830) with chloroform and methanol. Saponification and methylation were done on the NL and PL fractions. Fatty acid methyl esters were analysed with a gas chromatograph (CLARUS 500-Perkin Elmer[®]) equipped with a capillary column (BPX70-0.25μm-30Mx0.22MM-SGE[®]) and flame ionization detector. The fatty acids (FAs) were identified by comparing their retention times with those of standards.

2.6.3 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using *XLSTAT* software 2012. Percent data (survival rate) were normalized using an arcsine transformation before analysis. The normality of data distribution and homogeneity of variance were tested for biochemical parameters and reproductive performance index data using the Shapiro-Wilk test. Zootechnical data were normally distributed and variances were homogenous; hence, effects of broodstock treatments were tested using a one-way analysis of variance. Biochemical data were not normally distributed and variances were not homogenous; hence, effects of different broodstock treatments and different tissues were tested using the Kruskal-Wallis test.

3. Results

3.1 Grow-out period

3.1.1 Water quality parameters

Descriptive statistics for water quality parameters are given in Table III-6. No difference was observed for temperature and dissolved oxygen between the treatments. Furthermore, all the parameters measured were within acceptable ranges for the shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Della Patrona and Brun, 2008). The biofloc productivity in terms of TSS level had a mean value of 97 mg over the course of the experiment. The concentrations of TAN and NO_2^- - N in the BFT and CW treatments were near zero over the course of trial. In the BFT tanks, Chl a values were relatively high, indicating significant primary production.

Table III-6: The overall means $\pm$ s.d of measured water quality parameters for both grow-out systems.

Parameters	CW	BFT
Temperature (°C)	25.54 $\pm$ 0.78	24.70 $\pm$ 1.30
Dissolved Oxygen (mg.L ⁻¹)	7.09 $\pm$ 0.76	6.80 $\pm$ 0.64
pH	8.20 $\pm$ 0.06	7.78 $\pm$ 0.09
Chlorophyll a (µg.L ⁻¹)	0.39 $\pm$ 0.48	77.91 $\pm$ 38.12
TSS (mg.L ⁻¹)	3.20 $\pm$ 2.30	97.10 $\pm$ 18.20
TAN (mg.L ⁻¹)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
NO_2^- (mg.L ⁻¹)	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.01

3.1.2 Biofloc glutathione content

The average GSH content of the biofloc particulates, on a dry matter basis, was 1.22 $\pm$ 0.56 mM.g⁻¹ protein. The sampling was done on the last day when TSS values were 101 mg.L⁻¹. Subsequently, the concentration of GSH in the rearing water was 0.12 $\pm$ 0.06 mM.L⁻¹ and its potential dietary availability to the animals was 0.38 $\pm$ 0.19 mM of GSH per gram of shrimp.

3.1.3 Biofloc lipid composition

Biofloc particles presented a total lipid concentration of 6.91% of dry matter. PLs and NLs represented, respectively, 88% and 12% of the total lipids which were corresponded to 49.1 and 6.3 mg.g⁻¹ DM (Table III-

7). The main proportion of fatty acids from PLs was represented by saturated fatty acids, n-3 fatty acids, mono-saturated, n-9 fatty acids and n-6 fatty acids with, respectively, 0.59, 0.55, 0.32, 0.25 and 0.1 mg.g⁻¹ DM which represented 29%, 32%, 18%, 15% and 5% of total fatty acids. Among saturated fatty acids, myristic acid (C14:0) and palmitic acid (C16:0) presented the highest concentrations. Highly unsaturated fatty acids (HUFA) were dominated by eicosapentaenoic (EPA: C20:5 n-3), arachidonic (ARA: C20:4 n-6) and docosahexaenoic (DHA: C22:6 n-3) acids. In contrast, the polyunsaturated fatty acid content (PUFA) linoleic acid (LA): C18:2 n-6 and α linoleic acid (ALA): C18:3 n-3 of the PL fraction from biofloc was low. The NL was dominated by saturated fatty acids (SFA) (C16:0) and EPA (20:5n-3).

Table III-7: Fatty acid concentrations in the neutral and phospholipid fractions in biofloc particles.

Values are means ± s.d (n=3). All concentrations are reported as mg.g⁻¹ dry matter. "n.d" indicates not determined. (PUFA: Polyunsaturated fatty acids; SFA: saturated fatty acids; LA: Linoleic acid; ALA: α-linoleic acid; ETA: Eicosatetraenoic acid; ARA: Arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid).

Fraction	Neutral lipids	Phospholipids
Concentration (mg.g ⁻¹ DM)		
Total lipids	69.1. ± 8.80	
Total fraction	6.30 ± 1.00	49.1 ± 4.20
ΣFA	1.98 ± 0.40	19.41 ± 1.25
14:0s	0.08 ± 0.01	2.12 ± 0.43
14:1n-9	0.01 ± 0.00	0.25 ± 0.05
16:0s	0.36 ± 0.15	2.66 ± 0.29
16:1n-9	0.14 ± 0.01	2.21 ± 0.34
18:0s	0.13 ± 0.06	0.33 ± 0.05
18:1n-11	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01
18:1n-7	0.05 ± 0.02	0.62 ± 0.36
18:1n-9	0.09 ± 0.05	0.36 ± 0.06
18:1n-9t	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
18:2n-6 (LA)	0.04 ± 0.01	0.23 ± 0.03
18:3n-3 (ALA)	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.01
18:3n-6	n.d	n.d
18:4n-3	0.02 ± 0.00	0.56 ± 0.10
20:0s	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01
20:1n-11	n.d	n.d
20:1n-7	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00
20:1n-9	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00
20:2n-6	n.d	n.d
20:3n-3	n.d	n.d
20:3n-6	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00
20:4n-3 (ETA)	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.01
20:4n-6 (ARA)	0.06 ± 0.01	0.65 ± 0.05
20:5n-3 (EPA)	0.42 ± 0.08	4.41 ± 0.22
22:0s	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01
22:1n-11	n.d	n.d
22:1n-9	n.d	n.d
22:5n-3 (DPA)	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.04
22:6n-3 (DHA)	0.09 ± 0.04	0.70 ± 0.08
24:0s	0.02 ± 0.01	0.26 ± 0.03
24:1n-9	n.d	0.01 ± 0.01

Categories		
Σ Saturated	0.59 ± 0.23	5.44 ± 0.71
Σ Mono saturated	0.32 ± 0.08	3.54 ± 0.59
Σ PUFA	0.63 ± 0.05	6.81 ± 0.37
Σ n-3	0.55 ± 0.06	5.90 ± 0.41
Σ n-6	0.10 ± 0.01	0.91 ± 0.05
Σ n-9	0.26 ± 0.05	2.87 ± 0.43
Ratio		
Σ n-3/ Σ n-6	5.33 ± 1.06	6.53 ± 0.78
PUFA/SFA	1.29 ± 0.71	1.26 ± 0.17
DHA/EPA	0.21 ± 0.12	0.16 ± 0.02
ARA/EPA	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.18
DPA/ARA	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.36

3.1.4 Grow-out zootechnical results

No difference was found between the two treatments, CW and BFT, in terms of survival rate, growth rate, body weight of females and biomass at the end of the grow-out period (Table III- 8).

3.2 Reproduction

3.2.1 Survival during the reproduction period

At the end of the reproduction period in the hatchery, broodstock from BFT exhibited a significantly ($p=0.03$) higher final survival rate ($79.80 \pm 10.40\%$) compared to those from the CW treatment ($52.60 \pm 8.20\%$).

Table III-8: Zootechnical performances of the two rearing systems (CW vs. BFT) at the end of the grow-out period.

Values are means ± s.d (n=3). The stars indicate “significant” differences between treatments (* $p \leq 0.05$; “n.s” not significant).

Parameters	CW	BFT	S
Survival rate (%)	49.12 ± 13.98	53.72 ± 7.29	n.s
Growth rate (g.day ⁻¹)	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	n.s
Females final weight (g)	48.25 ± 0.84	48.93 ± 0.70	n.s
Finale biomass (g.m ⁻²)	284.41 ± 26.98	315.42 ± 14.26	n.s

3.2.2 Spawning rates

The final cumulative spawning number was significantly higher ($p= 0.04$) in females from BFT (shrimps spawned 52.00 ± 5.51 times; $n=75$ females) compare to those from CW (shrimps spawned 35.00 ± 4.04 times; $n=75$ females) (Table III-9).

Table III-9: Total spawning number, total eggs produced based on 75 females per treatment (CW vs. BFT) and larval survival rates at the Zoe 2 and PL1 stages.

Values are tank means $\pm$ s.d. The stars indicate “significant” differences between treatments (* $p \leq 0.05$; “n.s” not significant).

Parameters	CW	BFT	S
Total spawning number	35.00 $\pm$ 4.04	52.00 $\pm$ 5.51	*
Total eggs number $\times 10^7$	0.61 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.11	*
Larval survival zoe 2	70.06 $\pm$ 13.79	95.90 $\pm$ 7.29	*
Larval survival Post larvae 1 stage	45.48 $\pm$ 7.67	68.73 $\pm$ 12.60	*

The evolution, after eyestalk ablation (EA), of the relative cumulative spawning rate for broodstock from CW and BFT is shown in Fig III-4A. The spawning rate was similar between the two groups during the first 5 days, whatever the origin of the females. However, from the sixth day after EA, the cumulative spawning rate increased faster for broodstock from the BFT treatment. At the end of the experiment, cumulative spawning rates were 58% and 88% for shrimp from the CW and BFT treatments, respectively ($p=0.04$). Considering the first spawning rank (Fig III-4B), the final spawning rate was significantly lower for CW females (48%) compared to those from the BFT treatment (70%) ($p=0.03$). However, for the second (Fig III-4C) spawning rank, the final spawning rate was not significantly different between treatments, at 10% and 18% for shrimp from the CW and BFT treatments, respectively ($p>0.05$).

3.2.3 Gonado-somatic index (GSI) and number of eggs

Mature females (stage 4 of vitellogenesis) from CW presented significantly lower GSI ($p=0.04$) compared to those from the BFT treatment with, respectively, 6.56% $\pm$ 0.58% ($n=9$) and 7.28% $\pm$ 0.56% ($n=9$). This corresponded to a significantly lower ($p=0.04$) number of eggs laid per spawn by females from CW (175726 $\omega \pm$ 52976 ω) compared to females from the BFT treatment (202325 $\omega \pm$ 60118 ω). Finally broodstock from CW produced a lower total cumulative number of eggs (-72%) compared to those from the BFT treatment ($p=0.04$). The total numbers of eggs produced over the trial period based on 75 females from each treatment are presented in Table III-9.

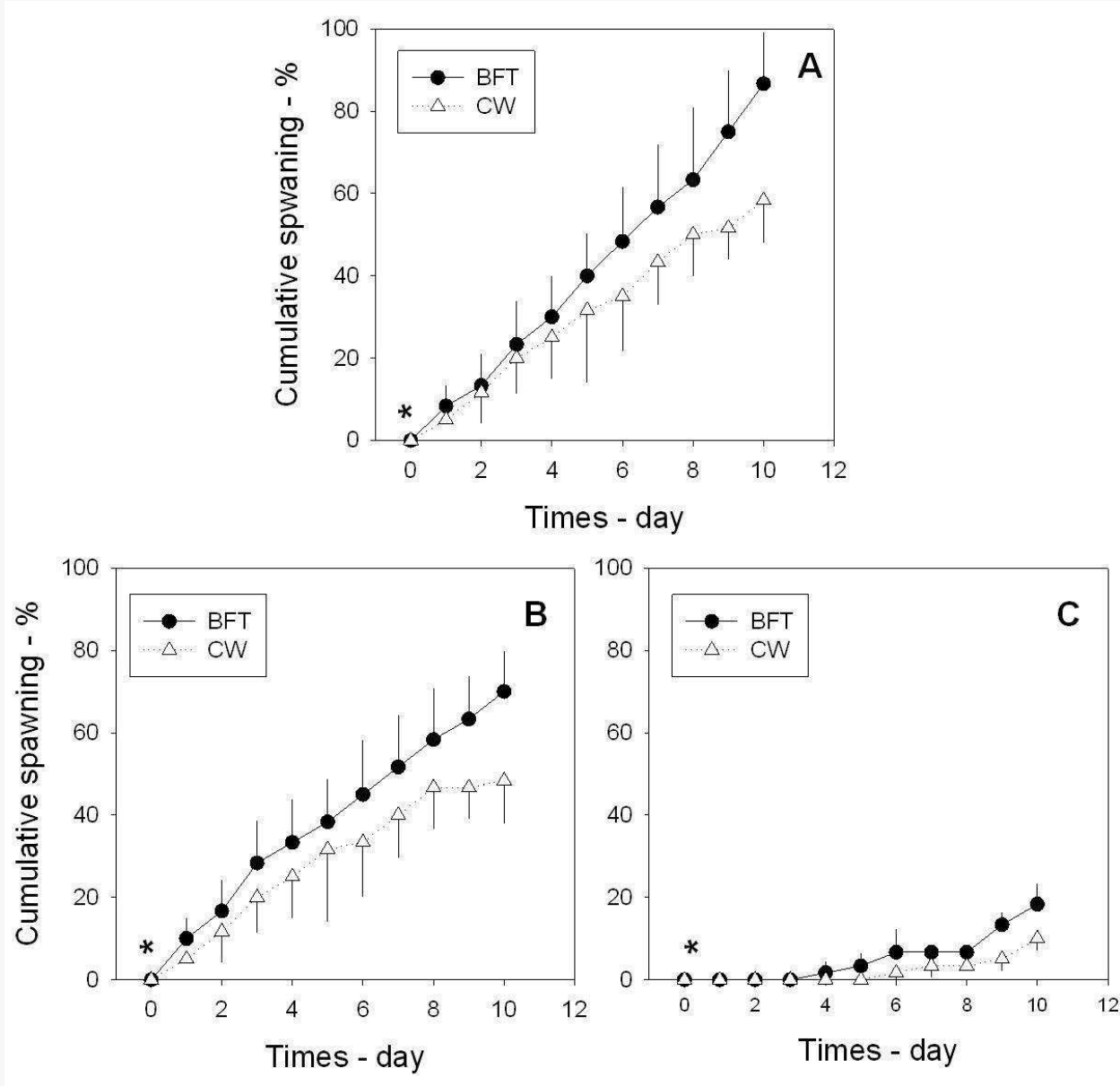


Figure III-4: Evolution of cumulative spawning rates after eyestalk ablation (*) for 75 females per treatment (CW and BFT), including all spawns (A) and according to spawning rank 1 (B) or spawning rank 2 (C).

3.3 Antioxidant defences and oxidative stress status of broodstock

The antioxidant level and oxidative stress status of broodstock at the end of the grow-out period before their transfer to the hatchery are shown in Table III-10. The antioxidant defences in the digestive glands of broodstock from CW compared to those from the BFT treatment exhibited significantly lower levels of GSH ($p=0.02$) and TAS ($p=0.04$). No significant difference was revealed regarding measured antioxidant enzyme activities. The GSSG/GSH ratio, a valuable biomarker of oxidative stress (Storey, 1996), was significantly higher ($p=0.04$) in the digestive glands of broodstock from CW compared to those from the BFT treatment.

Table III-10: Oxidative status and antioxidant defences in the digestive glands of females from both treatments (CW and BFT).

Values are means $\pm$ s.d (n=9). The stars indicate “significant” differences between treatments (* $p \leq 0.05$; “n.s” not significant).

Parameters	CW	BFT	S
TAS ($\mu\text{mol.mg protein}^{-1}$)	53.66 $\pm$ 10.48	65.61 $\pm$ 6.54	*
SOD (U.mg protein ⁻¹)	3.31 $\pm$ 0.56	6.36 $\pm$ 4.39	n.s
Catalase ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)	0.61 $\pm$ 0.51	1.24 $\pm$ 0.45	n.s
GSH (mmol.mg protein ⁻¹)	1.20 $\pm$ 0.49	2.56 $\pm$ 1.04	*
GSSH/GSH	0.40 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.03	*

3.4 Lipid composition of the shrimp digestive gland and eggs

3.4.1 Digestive gland

Total lipids were significantly higher in digestive gland from BFT female (229.0 $\pm$ 41.7 mg.g⁻¹DM) compared to those from CW female (150.8 $\pm$ 28.4 mg.g⁻¹DM; $p=0.04$). NLs and FA in the NL fraction in the digestive glands of BFT females were, respectively, 2.5 and 3.7 fold higher ($p \leq 0.05$) compared to levels in the digestive glands of females from the CW treatment (Table III-11). However, no significant differences were observed for PLs and fatty acids in the PLs fraction. The concentration of each FA was calculated for the NL and PL fractions in the digestive glands (Table III-11).

The saturated and mono-saturated acids in the NL fraction were, respectively, 3.1 and 3.8 fold higher in the digestive glands of broodstock from BFT compared to those from the CW treatment ($p \leq 0.05$). Among the PUFA, ALA and LA in the NLs fraction were, respectively, 3.5 and 3.8 fold higher in females from BFT compared to those from the CW treatment ($p \leq 0.05$). Among the HUFA, ARA, EPA and DHA acids in the NL fraction were, respectively, 4.9, 4.9 and 7.2 fold higher in females from BFT compared to those from the CW treatment ($p \leq 0.05$). However, the treatments, BFT or CW, did not appear to significantly affect the $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, PUFA/SFA, DHA/EPA, ARA/EPA, or DPA/ARA ratios. In contrast, no significant differences were observed in the PL content of the digestive gland or in the fatty acids in this lipid fraction according to the origin of the females (BFT or CW).

3.4.2 Eggs

Total lipids were significantly higher in eggs from BFT female (266.6 $\pm$ 8.1 mg.g⁻¹DM) compared to those from CW female (239.7 $\pm$ 16.8 mg.g⁻¹DM; $p=0.04$). PLs and FA in the PL fraction in eggs from BFT females were, respectively, 2.5 and 2.2 fold higher ($p \leq 0.05$) compared to their levels in eggs from CW females (Table III-12). In eggs from BFT females, PLs represented 40% of the total lipid content, while those from CW females presented only 18% ($p \leq 0.05$). The PLs content being 2.5 fold higher in the BFT eggs, the contents of all FA found in this class of lipids were also higher with this treatment compared to CW (Table III-12).

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

Table III-11: Fatty acid concentrations in the neutral and phospholipid fractions in digestive glands from CW or BFT females.

Values are means $\pm$ s.d (n=9). All concentrations are reported as mg.g⁻¹ dry matter. "n.d" indicates not determined. The stars indicate "significant" differences between treatments (*p $\leq$ 0.05; "n.s" not significant).

Fraction	Neutral lipids			Phospholipids		
Treatments	CW	BFT	S	CW	BFT	S
concentration (mg.g ⁻¹ DM)						
Total	30.30 $\pm$ 13.40	77.50 $\pm$ 17.20	*	106.70 $\pm$ 18.50	108.10 $\pm$ 17.50	n.s
Σ FA	13.78 $\pm$ 11.50	50.96 $\pm$ 17.18	*	57.17 $\pm$ 16.84	71.32 $\pm$ 23.31	n.s
14:0s	0.21 $\pm$ 0.17	0.35 $\pm$ 0.19	*	0.92 $\pm$ 0.47	0.89 $\pm$ 0.39	n.s
14:1n-9	0.03 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	n.s	0.10 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.09	n.s
16:0s	2.79 $\pm$ 2.30	8.70 $\pm$ 3.00	*	11.69 $\pm$ 4.46	16.47 $\pm$ 1.49	n.s
16:1n-9	0.36 $\pm$ 0.31	0.77 $\pm$ 0.28	*	1.44 $\pm$ 0.72	1.47 $\pm$ 0.60	n.s
18:0s	0.69 $\pm$ 0.51	2.09 $\pm$ 0.30	*	0.39 $\pm$ 0.85	3.60 $\pm$ 0.21	n.s
18:1n-11	0.04 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	*	0.18 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.02	n.s
18:1n-7	0.54 $\pm$ 0.46	1.78 $\pm$ 0.55	*	2.12 $\pm$ 0.81	2.40 $\pm$ 0.69	n.s
18:1n-9	4.24 $\pm$ 3.61	16.79 $\pm$ 5.77	*	14.63 $\pm$ 6.60	20.01 $\pm$ 6.75	n.s
18:1n-9t	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
18:2n-6 (LA)	1.67 $\pm$ 1.58	6.32 $\pm$ 2.73	*	6.96 $\pm$ 1.84	8.81 $\pm$ 3.71	n.s
18:3n-3 (ALA)	0.12 $\pm$ 0.13	0.42 $\pm$ 0.24	*	0.61 $\pm$ 0.19	0.84 $\pm$ 0.43	n.s
18:3n-6	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
18:4n-3	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
20:0s	0.06 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.08	*	0.19 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.05	n.s
20:1n-11	0.09 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.21	*	0.26 $\pm$ 0.15	0.37 $\pm$ 0.16	n.s
20:1n-7	0.06 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.10	*	0.16 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.09	n.s
20:1n-9	0.69 $\pm$ 0.59	2.95 $\pm$ 1.28	*	1.95 $\pm$ 1.10	2.44 $\pm$ 0.74	n.s
20:2n-6	0.09 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.28	*	0.34 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.22	n.s
20:3n-3	0.02 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.07	*	0.09 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.10	n.s
20:3n-6	0.02 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.05	*	0.01 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.05	n.s
20:4n-3 (ETA)	0.03 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.11	*	0.17 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.16	n.s
20:4n-6 (ARA)	0.09 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.13	*	0.96 $\pm$ 0.43	0.84 $\pm$ 0.18	n.s
20:5n-3 (EPA)	0.23 $\pm$ 0.19	1.15 $\pm$ 0.26	*	3.07 $\pm$ 1.43	3.42 $\pm$ 0.87	n.s
22:0s	0.07 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.12	*	0.21 $\pm$ 0.18	0.24 $\pm$ 0.05	n.s
22:1n-11	0.23 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.55	*	0.52 $\pm$ 0.42	0.60 $\pm$ 0.18	n.s
22:1n-9	0.11 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.23	*	0.28 $\pm$ 0.20	0.31 $\pm$ 0.09	n.s
22:5n-3 (DPA)	0.05 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.18	*	0.25 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.19	n.s
22:6n-3 (DHA)	0.39 $\pm$ 0.37	2.78 $\pm$ 1.63	*	2.15 $\pm$ 0.57	2.95 $\pm$ 1.32	n.s
24:0s	0.02 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.07	*	0.05 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.04	n.s
24:1n-9	0.05 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.07	*	0.12 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.03	n.s
Categories						
Σ Saturated	3.83 $\pm$ 0.31	11.82 $\pm$ 3.47	*	16.91 $\pm$ 6.04	21.49 $\pm$ 7.32	n.s
Σ Mono saturated	6.44 $\pm$ 5.45	24.76 $\pm$ 8.84	*	21.64 $\pm$ 6.34	28.05 $\pm$ 9.39	n.s
Σ PUFA	2.70 $\pm$ 2.53	12.32 $\pm$ 5.42	*	14.62 $\pm$ 1.11	18.22 $\pm$ 6.47	n.s
Σ n-3	0.84 $\pm$ 0.80	4.95 $\pm$ 2.39	*	6.34 $\pm$ 1.88	7.98 $\pm$ 2.65	n.s
Σ n-6	1.86 $\pm$ 1.74	7.37 $\pm$ 3.05	*	8.27 $\pm$ 1.50	10.24 $\pm$ 0.40	n.s
Σ n-9	7.46 $\pm$ 5.48	21.21 $\pm$ 7.46	*	18.51 $\pm$ 8.79	24.44 $\pm$ 8.27	n.s
Ratio						
Σ n-3/ Σ n-6	0.69 $\pm$ 0.46	0.65 $\pm$ 0.08	n.s	0.81 $\pm$ 0.39	0.79 $\pm$ 0.12	n.s
PUFA/SFA	0.62 $\pm$ 0.18	1.03 $\pm$ 0.39	n.s	0.96 $\pm$ 0.39	0.85 $\pm$ 0.15	n.s
DHA/EPA	1.34 $\pm$ 0.71	2.28 $\pm$ 1.06	n.s	0.74 $\pm$ 0.15	0.86 $\pm$ 0.34	n.s
ARA/EPA	0.38 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.07	n.s	0.28 $\pm$ 0.30	0.21 $\pm$ 0.25	n.s
DPA/ARA	0.43 $\pm$ 0.20	0.63 $\pm$ 0.29	n.s	0.29 $\pm$ 0.28	0.36 $\pm$ 0.41	n.s

Thus, in the PLs, the predominant essential fatty acids ARA, EPA and DHA had levels in the eggs that were, respectively, 2.5, 2.8 and 3 fold higher for BFT compared to the CW treatment. Regardless, the treatment (BFT or CW) did not appear to significantly affect the $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, PUFA/SFA, DHA/EPA, EPA/ARA, and DPA/ARA ratios, except for the DHA/EPA and ARA/EPA ratios, which were higher in the NL fraction of the BFT treatment, and the PUFA/SFA ratio, which was higher in the PL fraction of the CW treatment. In contrast, no significant differences were observed in the NLs content of the eggs or in the FA in this lipid fraction, regardless of whether the origin of the females was CW or BFT.

3.4.3 Digestive glands compared with eggs

Comparing the ratios of lipids from digestive glands and eggs (Table III- 11 and 12) in NLs and PLs fractions, PUFA/SFA, $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, DHA/EPA, and EPA/ARA were significantly lower in digestive glands ($p \leq 0.05$) which could mean a preferential accumulation of PUFA n-3, DHA and EPA in eggs.

3.5 Larval survival

The larval survival rate from BFT females was 37% and 51% higher at the Zoe 2 stage ($p=0.02$) and PL1 stage ($p=0.02$), respectively (Table III-9.).

4. Discussion

To ensure the reliability of post-larval production in hatcheries, it is important to understand the origins of variations in the reproduction of penaeid shrimps in captivity. The main studies in this area have focused on the influence of nutrition (Wouters *et al.*, 2001), size or age (Peixoto *et al.*, 2004), and season (Crococ and Coman, 1997) on spawning performances and larvae quality. Nevertheless, the consequences of rearing conditions on broodstock shrimp are poorly documented. In our previous study we compared the broodstock from an extensive rearing system (earthen pond) and an intensive system (Biofloc Technology, BFT) (Cardona *et al.*, submitted). The reproductive performances of broodstock from BFT were much higher than those reared extensively in an earthen pond. We hypothesised that the extra energy required for the shrimps from BFT to produce more eggs may come from feeding on biofloc aggregates. To this end, the aim of the present study was to assess the contribution of the biofloc to the lipid nutrition and antioxidant status of the broodstock as reflected in their reproductive performance and the health of larvae of *L. stylirostris*.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

Table III-12: Fatty acid concentrations in the neutral and phospholipid fractions in eggs from CW or BFT females.

Values are means $\pm$ s.d (n=9). All concentrations are reported as mg.g⁻¹ dry matter. "n.d" indicates not determined. The stars indicate "significant" differences between treatments (*p $\leq$ 0.05; "n.s" not significant).

Fraction	Neutral lipids			Phospholipids		
Treatments	CW	BFT	S	CW	BFT	S
Concentration (mg.g ⁻¹ DM)						
Total	73.90 $\pm$ 61.70	80.20 $\pm$ 6.00	n.s	43.00 $\pm$ 32.30	107.60 $\pm$ 32.80	*
Σ FA	59.51 $\pm$ 49.92	61.13 $\pm$ 9.81	n.s	28.59 $\pm$ 3.26	65.77 $\pm$ 24.32	*
14:0s	1.75 $\pm$ 1.53	1.17 $\pm$ 0.36	n.s	0.29 $\pm$ 0.22	1.77 $\pm$ 0.63	*
14:1n-9	0.08 $\pm$ 0.07	n.d	-	n.d	n.d	-
16:0s	15.14 $\pm$ 12.86	14.13 $\pm$ 2.75	n.s	4.03 $\pm$ 3.24	15.77 $\pm$ 6.46	*
16:1n-9	3.42 $\pm$ 2.91	3.00 $\pm$ 0.77	n.s	0.74 $\pm$ 0.58	3.71 $\pm$ 1.53	*
18:0s	2.07 $\pm$ 1.72	2.59 $\pm$ 0.42	n.s	1.62 $\pm$ 1.32	3.46 $\pm$ 0.83	*
18:1n-11	0.11 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.02	n.s	0.05 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.05	*
18:1n-7	9.11 $\pm$ 7.62	2.37 $\pm$ 1.43	n.s	0.40 $\pm$ 0.51	2.08 $\pm$ 0.82	*
18:1n-9	9.11 $\pm$ 7.62	10.72 $\pm$ 1.43	n.s	2.18 $\pm$ 1.76	8.07 $\pm$ 3.20	*
18:1n-9t	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
18:2n-6 (LA)	2.05 $\pm$ 1.72	1.88 $\pm$ 0.33	n.s	0.57 $\pm$ 0.46	1.92 $\pm$ 0.77	*
18:3n-3 (ALA)	0.35 $\pm$ 0.30	0.25 $\pm$ 0.07	n.s	0.11 $\pm$ 0.09	0.44 $\pm$ 0.18	*
18:3n-6	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.02	n.s	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.03	*
18:4n-3	0.31 $\pm$ 0.26	0.28 $\pm$ 0.07	n.s	0.04 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.13	*
20:0s	0.25 $\pm$ 0.21	0.33 $\pm$ 0.05	n.s	0.07 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.08	*
20:1n-11	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
20:1n-7	0.23 $\pm$ 0.19	0.32 $\pm$ 0.04	n.s	0.05 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.06	*
20:1n-9	0.85 $\pm$ 0.70	1.23 $\pm$ 0.16	n.s	0.25 $\pm$ 0.20	0.76 $\pm$ 0.21	*
20:2n-6	0.22 $\pm$ 0.18	0.29 $\pm$ 0.04	n.s	0.09 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.06	*
20:3n-3	0.13 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.03	n.s	0.04 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.07	*
20:3n-6	0.06 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	n.s	0.00 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.02	*
20:4n-3 (ETA)	0.15 $\pm$ 0.13	0.14 $\pm$ 0.04	n.s	0.04 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.08	*
20:4n-6 (ARA)	0.72 $\pm$ 0.60	0.72 $\pm$ 0.16	n.s	0.53 $\pm$ 0.43	1.31 $\pm$ 0.26	*
20:5n-3 (EPA)	5.68 $\pm$ 4.80	3.75 $\pm$ 1.06	n.s	3.48 $\pm$ 2.86	9.77 $\pm$ 3.10	*
22:0s	0.01 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	n.s	0.02 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.03	*
22:1n-11	n.d	0.23 $\pm$ 0.40	-	n.d	n.d	-
22:1n-9	0.06 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01	n.s	n.d	0.03 $\pm$ 0.00	-
22:5n-3 (DPA)	0.39 $\pm$ 0.32	0.37 $\pm$ 0.09	n.s	0.14 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.17	*
22:6n-3 (DHA)	10.68 $\pm$ 8.86	12.97 $\pm$ 1.21	n.s	3.45 $\pm$ 2.78	10.49 $\pm$ 4.11	*
24:0s	0.14 $\pm$ 0.12	0.19 $\pm$ 0.02	n.s	0.05 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	*
24:1n-9	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
Categories						
Σ Saturated	19.66 $\pm$ 16.41	18.44 $\pm$ 3.59	n.s	6.07 $\pm$ 4.88	21.33 $\pm$ 8.00	*
Σ Mono saturated	15.83 $\pm$ 13.25	17.87 $\pm$ 0.26	n.s	3.91 $\pm$ 3.13	14.96 $\pm$ 5.84	*
Σ PUFA	20.75 $\pm$ 17.31	20.92 $\pm$ 3.01	n.s	8.48 $\pm$ 6.7	25.37 $\pm$ 8.93	*
Σ n-3	17.69 $\pm$ 14.77	17.92 $\pm$ 2.47	n.s	7.29 $\pm$ 5.91	21.80 $\pm$ 7.83	*
Σ n-6	3.05 $\pm$ 2.55	3.00 $\pm$ 0.53	n.s	1.19 $\pm$ 0.96	3.57 $\pm$ 1.10	*
Σ n-9	13.51 $\pm$ 11.34	15.03 $\pm$ 2.31	n.s	3.17 $\pm$ 2.54	12.57 $\pm$ 4.92	*
Ratio						
Σ n-3/ Σ n-6	6.14 $\pm$ 0.66	6.01 $\pm$ 0.27	n.s	6.38 $\pm$ 0.51	6.05 $\pm$ 0.29	n.s
PUFA/SFA	1.12 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.06	n.s	1.39 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.05	*
DHA/EPA	2.25 $\pm$ 0.66	3.62 $\pm$ 0.91	*	1.01 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.08	n.s
ARA/EPA	0.14 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01	*	0.19 $\pm$ 0.14	0.31 $\pm$ 0.25	n.s
DPA/ARA	0.55 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.01	n.s	0.33 $\pm$ 0.37	0.28 $\pm$ 0.30	n.s

4.1 Health and reproductive performance of the broodstock and larvae

Broodstock from the BFT treatment showed significantly higher survival rates during the reproduction period in the hatchery. This indicates that the shrimps from BFT, compared to the CW treatment, were more resistant to the handling stress caused by their fishing, transfer into the hatchery and eyestalk ablation (Wabete *et al.*, 2004). This improved survival of broodstock from BFT has to be linked to their lower GSSG/GSH ratio compared to the shrimps from the CW treatment. Broodstock from BFT also exhibited a better antioxidant status, marked by a higher concentration of GSH and a higher level of TAS. GSH is considered to be one of the most important components of the antioxidant defences of living cells, neutralizing hydroxyl radicals against which there is no enzymatic neutralization (Surai, 2002). The maintenance of appropriate GSH levels is therefore crucial to organisms that periodically undergo oxidative stress (Storey, 1996). GSH can either be endogenously produced or obtained through food. In our previous study and in this study, we showed that biofloc particulates represent a potential source of dietary GSH. Furthermore, TAS, which measures non-enzymatic antioxidant defences, provides integrative information on the susceptibility of an organism to oxidative stress; as its value increases, the level of antioxidant defence against free radical reactions increases (Chien *et al.*, 2003; Lemaire and Chim, 2007). Thus, our result indicates that BFT rearing acts in such a way as to increase the antioxidant status of shrimps and to reduce oxidative stress, leading to a better resistance to handling stress undergone during their transfer into the hatchery and the reproduction process (Wabete *et al.*, 2004).

The improved health of shrimp broodstock bred in BFT could contribute to their better reproductive performance. Indeed, females from BFT produced more eggs and spawn more frequently than their counterparts bred in CW. This confirms our previous results obtained by comparing the broodstock reared extensively in earthen ponds with those from BFT (Chim *et al.*, 2010) and the results obtained by Emeranciano *et al.* (2013) for the shrimp *Farfantepenaeus duorarum*.

The relationship between broodstock and offspring quality is regularly evoked insofar as the vitellus of peneaid shrimp eggs must wholly support the development of the embryo and the first larval stages (nauplius) until moulting occurs into a “first-feeding” larvae (Zoe1) (Harrison, 1990). Indeed, the embryo and pre-feeding larvae of peneaid shrimps are lecithotrophic, as their nutrition is solely supplied by egg yolk reserves (Racotta *et al.*, 2003). The quality and quantity of nutrients in egg yolk is dependent on maternal body reserves, capacity for biosynthesis, and dietary intake during maturation (Harrison, 1990; Racotta *et al.*, 2003). Few studies have shown the relationship between the nutrition of laying shrimps and the quality of their larvae (Cahu *et al.*, 1995; Wyban *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 1999).

4.2 Dietary lipids from biofloc contribute to broodstock nutrition and egg vitellus.

These improved qualities of brood stock and larvae can be explained by the contribution of natural food (organic material and microorganisms) from the biofloc system, especially with regard to dietary lipids. Under our culture conditions, we can easily understand that biofloc potentially represents an important food source, especially for PLs and PUFAs. But it is important to note that the proximal composition or nutritional value of biofloc changes according to the culture conditions and is closely related to the microflora of the biofloc environment (Ju *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012). Thus Crab *et al.* (2010), unlike in our study, found a lower lipid content (2.3 to 5.4% of DM) and only a trace of n-3 FA (0.4 to 0.7 mg.g⁻¹). Under our culture conditions, the outdoor tanks were exposed to daylight and the biofloc aggregate was a mixture of microalgae and bacteria. Microalgae biomass is well known to be rich in PUFA and could be an important source of essential FA for aquatic animals (Becker, 1994; Olvera-Novoa *et al.*, 1998).

In our study, the total lipid content of the biofloc was close to 7% of the dry matter, 88% of which was represented by PLs. Thus, biofloc is potentially a good source of PLs, which juvenile shrimp typically require within the range of 1.2 to 1.5 % (NRC, 2011). FA (n-3) represented the highest proportion of all FAs in the PLs fractions. The essential FAs for shrimps found in biofloc aggregates were dominated by EPA (10% of the dry matter), DHA (1.7% of DM) and ARA (1.5% of DM). The dietary requirements for these 3 essential FAs for *P. japonicas*, *P. monodon* and *L. vannamei* were found to be 0.5 to 1.1% (EPA and DHA) and 0.5% (ARA), respectively (NRC, 2011).

The increase of 158% of NLs in the digestive gland of shrimp reared in BFT compared to shrimps reared in CW suggests that additional dietary lipid are provided by biofloc. The digestive gland is considered as the main storage organ (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000; Luvizotto-Santos *et al.*, 2003) and the NLs are considered as energy reserves (Vazquez Boucard *et al.*, 2004). Lipids stored in the digestive glands of spawners are necessary for the synthesis of vitellin and the development of oocytes (Vazquez Boucard *et al.*, 2004). Furthermore, the lipid reserves in the digestive glands have been highly correlated with the success of spawning and hatching (Wouters *et al.*, 2001). The nutritional supplementation provided by biofloc also resulted in a significant increase in GSI, which was 11% higher in BFT compared to the CW treatment. This higher GSI corresponded to an increase of 150% in the PLs content of the eggs. Thus, it appears that PLs are selectively accumulated in the eggs. In fact, PLs are predominant in shrimp ovaries, mainly phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine (Gehring, 1974; Teshima and Kanazawa, 1983; Mourente and Rodriguez, 1991; Ravid *et al.*, 1999).

Furthermore, we showed in the eggs, mostly in the PLs fraction, an increase of 130% in the total FA concentration in the BFT relative to the CW treatment. The fatty acids EPA, DHA and ARA contribute the most to this increase in the total FAs. These FAs play a crucial role in the reproduction of penaeid shrimps (Alava *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994; Coman *et al.*, 2011) Xu *et al.* (1994) postulated that EPA plays a specific

role in the ovarian development process, whereas DHA may play some other role in early embryogenesis that is related to the egg hatchability of larval *P. chinensis*. A similar study was performed by Cahu *et al.* (1995) with domesticated *F. indicus* and showed that hatching percentage was related to dietary n-3 HUFA. The ARA content of eggs of *P. monodon* shrimp has also been correlated with fecundity and egg production (Huang *et al.*, 2008; Coman *et al.*, 2011). More broadly, the latter FA is believed to play an important role in reproduction in many cultured marine fish and crustacean species (Stacey and Goetz, 1982; Wouters *et al.*, 2001; Furuita *et al.*, 2003; Mazorra *et al.*, 2003). ARA and EPA are both precursors of prostaglandins and are considered essential for the synthesis of these hormones (Sargent *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 1995). Furthermore, in fish, it is believed that EPA competes with the enzyme systems that produce prostaglandins from ARA (Furuita *et al.*, 2003). In our study, the enrichment of eggs with PLs, n-3 HUFA and ARA may also explain the better survival of larvae from females that received the BFT treatment. Indeed, the newly hatched nauplii do not feed and are nourished by the remaining yolk, which must sustain them through several moults and through metamorphosis into Zoe 1 larvae within about 48 h (Harrison, 1990). The quality and quantity of nutrients in egg yolk is dependent on maternal body reserves, their capacity to be biosynthesized, and dietary intake during maturation (Racotta *et al.*, 2003). This is especially the case for essential nutrients such as n-3 HUFA that cannot be synthesized *de novo* and may be depleted during embryogenesis, the remainder thus being insufficient to support larval development (Kanazawa *et al.*, 1979; Teshima *et al.*, 1989).

Finally, the parallel increase of PUFA, HUFA and also of TAS and GSH, in shrimp tissues from BFT appears consistent. Indeed, the high PUFA and HUFA concentration in lipid fraction of shrimp tissues from BFT make them particularly susceptible to peroxidation (Angel *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2008), and must be protected by appropriate antioxidant defences. The increase of GSH and TAS contents seems associated with that one of PUFA and HUFA; antioxidant protects the animal against oxidative stress (Surai *et al.*, 2001): stress is defined as an imbalance between antioxidant and prooxidants in favour of the last. Thompson *et al.* (1992) obtained similar results with the rat where lipid peroxidation also increased with decreased liver and kidney GSH levels.

In summary, our results suggest that biofloc lipids are assimilated by brood stock during the grow-out period. These lipids were either set aside in the digestive gland or incorporated directly into the ovary. Once in the hatchery, during the reproduction period, lipid reserves, especially of essential nutrients like n-3 HUFA in the digestive gland, are probably transferred to the ovary in order to complete secondary vitellogenesis. Shrimps reared in BFT obtained complementary dietary lipids by feeding on biofloc aggregates and specifically stored PLs and essential FAs in oocytes that are necessary for embryogenesis and pre-feeding larvae development. In the absence of additional lipids brought by biofloc aggregates, shrimp brood stock, embryos and pre-feeding larvae lacked PLs and essential FAs, which could explain the higher mortality,

reduced reproductive performance and larval survival noted for the shrimp brood stock reared in clear water.

5. Conclusion

This study shows that BFT improves the antiradical status of the shrimp *L. stylirostris*, which are thus less susceptible to oxidative stress. Two key pieces of new information emerge from the present study. Firstly, biofloc is a source of further dietary lipids that can act as energetic substrates, but also as a source of PLs and essential fatty acids necessary to sustain reproduction, embryonic and larval development. Second, improving the reproduction of the brood stock also leads to an improvement in the quality of the larvae. This latter result is explained by the improvements in the anti-radical status and nutritional status of brood stock reared in BFT as well as their offspring.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Government and Southern, Northern and Island Provinces of New-Caledonia and the management of marine resources and mining of Tahiti. We would like to thank the Technical Centre for Aquaculture of Tahiti for their help during the running of the experiment, Fabrice Pernet for help with the lipid analyses and Marie Madeleine Le Gall and Karl Renoux for help with biochemical analysis.

References

- Alava, V.R., Kanazawa, A., Teshima, S., 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, pp. 345–351
- Angel D., Fiedler U., Eden N., Kress N., Adelung D. & Herut B., 1999. Catalase activity in macro-and microorganisms as an indicator of biotic stress in coastal waters of the eastern Mediterranean Sea. *Helgoland Marine Research* 53, 209–218.
- Aquacop, 1984. Review of ten year of experimental penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South Pacific). *Journal of the World Mariculture Society* 15, 73-91.
- Avnimelech, Y., 2009. *Biofloc Technology - A practical guide Book*. Baton Rouge, Louisiana, United States, The World Aquaculture Society.
- Akerboom, T.P.M., and Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulphides in biological samples, *Methods Enzymol* 77, 373-382.
- Becker., E., W., 1994. *Applications of algae. Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 250–260
- Bell, J. G., Castell, J. D., Tocher, D. R., MacDonald, F. M., & Sargent, J. R., 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(2), 139-151.
- Bendschneider, K., and Robinson, R.J, 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. mar. Res.*, 11, pp. 87–96.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Browdy, C.L., Bratford, D., Stokes, A.d., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. Worldaqua. Soc., Baton Rouge. LA, pp. 20–34.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, P.R., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525–537.
- Cahu, C., Guillaume, J.C., Stephan, 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(1), 159-170.
- Cahu, C. L., Cuzon, G., & Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(3), 417-424.
- Clairbone, A., 1985. Catalase. In: R. Greenwald, Editor, *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, New York, 283-284.
- 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(1), 177-191.
- Chim, L., Huber, M., Lemaire, P., Brun, P., Goguenheim, J., 2010. Floc culture system applied for intensive broodstock farming of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*: First trial carried out in New Caledonia. *EAS Aquaculture Europe 2010*. In book of abstract.
- Coman, G. J., Arnold, S. J., Barclay, M., & Smith, D. M., 2011. Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 141-151.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4), 559-567.
- Crocos, P.J., Coman, G.J., 1997. Seasonal and age variability in the reproductive performance of *Penaeus semisulcatus* broodstock: optimising broodstock selection. *Aquaculture*, 155(1), 55-67.
- Della Patrona, L., Brun, P., 2008. L'élevage de la crevette bleue en Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus stylirostris*. Ifremer, Département LEAD (Laboratoire Ecosystème et Aquaculture Durable) en Nouvelle-Calédonie.
- Drach, P., Tchernifovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18, 596-609.
- Ekasari, J., Crab, R., Verstraete, W., 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17(3), 125.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arevalo, M., Gaxiola, G., 2013. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquaculture Research*.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., Schell, D.M., 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquac. Res.* 33, 839–846.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 226(1), 497-509.
- Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., & Takeuchi, T., 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220(1), 725-735.
- Gehring, W. R., 1974. Maturational changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 49(3), 511-524.
- Hargreaves J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 34, 344–363.
- 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.
- Holm-Hansen, O. Lorenzen, C.J., Holmes, P.E., Strickland J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil. Conseil International Pour l'Exploitation de la Mer.* 30 (1965). pp. 3–15.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Holmes, R.M., Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56(10): 1801-1808.
- Huang, J.-H., Jiang, S.-G., Lin, H.-Z., Zhou, F.-L. & Ye, L., 2008. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquacult. Res.*, 39, 240–251.
- Ju Z., Forster I., Conquest L., Dominy W. 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition* 14.
- Kanazawa, A., Teshima, S. I., & Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63(3), 295-298.
- King, J.E., 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, 94, pp. 244–262.
- Lagler, K.F., 1971. Capture, sampling and examination of fishes. In: Ricker W.E. (ed), *Methods for assessment of fish production in freshwaters* (2nd ed.). International Biological Programme, 3. Oxford and Edinburgh : 7-44-44.
- Lemaire, P., Chim, L., 2007. Effect of experimental temperature fluctuations on some «oxidative stress» bio-indicators in the digestive gland of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In *Annual Meeting* (pp. 9-13).
- Luo, W., Zhao, Y.L., Yao, J.J., 2008. Biochemical composition and digestive enzyme activities during the embryonic development of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Crustaceana*, 81(8), 897-915.
- Luvizotto-Santos, R., Bianchini, A., 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata dana*, 1851 (crustacea-grapsidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 295(2), 200-205.
- Marklund, S., and Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry* 47, 469- 474.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J. G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., ... & Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227(1), 21-33.
- Mourete, G., Rodriguez, A., 1991. Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biology*, 110(1), 21-28.
- NRC (National Research Council), 2011. *Nutrient Requirement of Fish and Shrimp*. The National Academy Press, Washington, D.C. US.
- Olvera-Novoa, M. A., Domínguez-Cen, L. J., Olivera-Castillo, L., & Martínez-Palacios, C. A., 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*, 29(10), 709-715.
- Ottogalli, L., Galinie, C., Goxe, D., 1988. Reproduction in captivity of *Penaeus stylirostris* in New Caledonia J. *Aquac. Trop.*, 3 (1988), pp. 111–125.
- 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* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Research*, 29(3), 183-189.
- Pan, C.H., Chien, Y.H., Hunter, B., 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297, 107–118.
- Peixoto, S., Cavalli, R. O., Wasielesky, W., D'Incao, F., Krummenauer, D., Milach, Â. M., 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. *Aquaculture*, 238(1), 173-182.
- Peng S., Chen L., Qin J.G., Hou J., Yu N., Long Z., Ye J. & Sun X., 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture* 276, 154–161.
- Prior, R.L., Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1173–1181.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227(1), 107-130.
- Ravid, T., Tietz, A., Khayat, M., Boehm, E., Michelis, R., & Lubzens, E., 1999. Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *Journal of experimental biology*, 202(13), 1819-1829.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., & Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1), 217-229.
- Schneider O., Sereti V., Eding E.H. & Verreth J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 32, 379-401.
- Shyne Anand, P. S., Kohli, M. P. S., Kumar, S., Sundaray, J. K., Roy, S. D., Venkateshwarlu, G., ... & Pailan, G. H., 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 418, 108-115.
- Stacey, N. E., & Goetz, F. W., 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 92-98.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Braz. J. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Surai, P. F., Fujihara, N., Speake, B. K., Brillard, J. P., Wishart, G. J., & Sparks, N. H. C., 2001. Polyunsaturated fatty acids lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semem. *Asian australien journal of animal sciences*, 14(7), 1024-1050.
- Surai, P. F., 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.
- Tacon, A.G.J., Cody, J., Conquest, L., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121–137.
- Teshima, S. I., & Kanazawa, A., 1983. Digestibility of dietary lipids in the prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49(6), 963-966.
- Teshima, S.I., Kanazawa, A., Koshio, S., Horinouchi, K., 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 92(1), 45-49.
- Thompson, K. H., Godin, D. V., & Lee, M., 1992. Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biological trace element research*, 35(3), 213-224.
- Vazquez Boucard, C. G., Patrois, J., Ceccaldi, H. J., 2004. Exhaustion of lipid reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture*, 236(1), 523-537.
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J. C., 2004. Caractérisation de problèmes de physiologie respiratoire et d'échanges ioniques associés à la manipulation chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* à 20 C. *Styli* 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. In Ifremer. Actes Colloq (Vol. 38, pp. 75-84).
- Wabete, N., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2006. A soft technology to improve survival and reproductive performance of *Litopenaeus stylirostris* by counterbalancing physiological disturbances associated with handling stress. *Aquaculture*, 260: 181-193.
- Wasieliesky, W., Atwood, H., Stokes, A. Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403.
- Wouters, R., Gomez, L., Lavens, P., & Calderon, J., 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: Its effect on reproductive performance and larval quality. *Journal of Shellfish Research*, 18(2), 651-656.
- Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202(1), 1-21.
- Wyban, J., Martinez, G. & Sweeney, J., 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture*, 59–62.
- 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(4), 359-370.

Partie III - Contribution trophique du biofloc aux géniteurs de *L. stylirostris* et aux réserves lipidiques des œufs: influence sur la reproduction et la survie des larves produites

- Xu, W.J., Pan, L.Q., Sun, X.H., Huang, J., 2012. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. Aquaculture Research, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03115.x>.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. Aquaculture, 412, 117-124.
- Yano, I., Tsukimura, B.T., Sweeney, J.N., Wyban, J.A., 1988. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. J. World Aquacult. Soc., 19 (4), pp. 204–209.
- Yepiz-Plascencia, G., Galván, T. G., Vargas-Albores, F., & García-Bañuelos, M., 2000. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. Marine Biotechnology, 2(5), 485-492.

Conclusion

La série d'études présentée dans ce chapitre a permis de révéler et de confirmer l'influence des conditions d'élevage sur les performances de reproduction des géniteurs de la crevette *L. stylirostris* et la qualité de leur descendance. Ainsi, la reproduction des animaux provenant d'élevage intensif en biofloc est très nettement améliorée comparée à celle des crevettes issues d'élevages intensif en eau claire ou extensif en bassin de terre. Comment pouvons-nous expliquer cette amélioration des performances des géniteurs produits en biofloc? Pour répondre à cette question, nous avons émis deux hypothèses non exclusives l'une de l'autre : la première concerne l'environnement. En effet nous savons que la technologie d'élevage en biofloc permet un bon contrôle de la qualité de l'eau (température, salinité, oxygène dissous...) (Avnimelech, 2009). Dans ces conditions, les animaux seraient moins exposés aux stress environnementaux et pourraient ainsi préserver leur énergie pour leur reproduction. La seconde hypothèse est que la productivité naturelle (biofloc) apporterait des nutriments essentiels, que l'animal est incapable de synthétiser et qu'il doit se procurer par son alimentation. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la piste nutritionnelle qui apparaissait d'autant plus plausible que nous avons montré chez les crevettes juvéniles (Partie II – Article 1) que la productivité naturelle du biofloc représentait entre 37 à 40% de l'alimentation des animaux. Néanmoins, ce résultat ne s'applique pas, dans l'état, aux géniteurs pour lesquels nous n'avons pas quantifié la part de productivité naturelle dans leur alimentation ; par contre nous avons montré que le biofloc contribuait significativement à leur nutrition lipidique. Cette dernière se traduit notamment par une accumulation de lipides neutres et acides gras dans la glande digestive et de phospholipides et acides gras dans les réserves vitellines. Parallèlement, nous renforçons ce résultats par des analyses de biofloc qui renfermait 6,7% de lipides et représentait une source potentielle en phospholipides (491 mg.g⁻¹ de matière sèche) et acides gras essentiels (214 mg.g⁻¹ de matière sèche).

En plus des lipides, nous avons aussi montré que le biofloc représentait une source potentielle de glutathion (GSH) que l'on retrouvait dans la glande digestive où la teneur moyenne en GSH était supérieure chez les animaux issus de l'élevage en biofloc. Cet apport d'antioxydant alimentaire naturel modifie très certainement les rapports d'équilibre des défenses antioxydantes des tissus de l'animal (Nicolini, 2011) et c'est effectivement ce que nous avons observé : les animaux élevés en biofloc, outre une concentration plus élevée en GSH, présentaient une capacité antioxydante globale (TAS) supérieure aux animaux élevés en eau claire. Les animaux du biofloc, comparés à ceux élevés en eau claire ou en bassin de terre, présentaient également un état de stress oxydant inférieur caractérisé par une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes majeures (SOD, CAT, GPX) (Article 3) et du rapport GSSH/GSH totaux (Article 4).

Les élévations parallèles, dans les tissus des crevettes élevées en biofloc, d'une part des acides gras à longues chaînes polyinsaturés et hautement insaturés (AGPI et AGHI) et d'autre part de la capacité du pouvoir antioxydant apparaissent cohérentes. En effet, dans le cas des animaux élevés en biofloc, l'augmentation des AGPI et AGHI que nous pouvons qualifier de pro-oxydants, car sensibles à la peroxydation (Angel *et al.*, 1999 ; Peng *et al.*, 2008), est compensée par une augmentation de la teneur en GSH et de la TAS prévenant ainsi l'animal du stress oxydant : stress qui se définit comme un déséquilibre de la balance anti et pro oxydants en faveur des seconds.

Un autre résultat inédit de notre travail est le lien que nous avons établi entre les conditions d'élevage du géniteur et la qualité de leur progéniture. En effet, les larves issues des géniteurs produits en biofloc présentaient, au cours de leur développement, des taux de survies bien supérieurs à celles issues de mères élevées intensivement en eau claire. Nos résultats d'analyses, effectuées sur les ovaires et sur les œufs, nous permettent de conclure que le complément trophique en lipides essentiels et en glutathion du biofloc est, chez la femelle, tout ou en partie transféré aux réserves vitellines durant la vitellogénèse et bénéficie à la nutrition de l'embryon et de la larve en phase de lécitotrophie. En effet, chez les crevettes Pénéides, les larves aux stades nauplii sont lécitotrophes et dépendent, durant 48 heures, entièrement des réserves vitellines pour leur développement (Harrison, 1990). Cela est particulièrement critique pour les nutriments, comme les AGPIs, qui ne peuvent pas être synthétisés par la larve et qui pour autant jouent un rôle fondamental dans leur développement (Teshima *et al.*, 1989).

Au cours de la partie II et de cette partie, nous avons vu l'importance, dans l'alimentation de la crevette, de la productivité naturelle engendrée par le système d'élevage en biofloc: son influence positive exercée sur la nutrition et la santé des crevettes juvéniles et la reproduction des animaux adultes. La productivité naturelle du biofloc consommée par les animaux, est constituée d'agrégats composés de microorganismes et de matière organique (Hargreaves, 2006 ; Avnimelech, 2009). Parmi ces microorganismes, les bactéries tiennent une place prédominante tant au niveau fonctionnel, comme la filtration biologique de l'eau de culture (Ebelling *et al.*, 2006) et l'action probiotique vis-à-vis de l'animal et son environnement, qu'en termes de source nutritionnelle pour les crevettes en élevage (Burford *et al.*, 2004 ; Avnimelech, 2013). Cela nous a donc logiquement conduit, dans le dernier volet de la thèse, à nous intéresser au compartiment bactérien de l'élevage en biofloc avec l'idée sous-jacente qu'une meilleure représentation de ce compartiment devrait nous éclairer sur certains aspects du réseau de causes à l'origine des meilleures performances physiologiques et de reproduction des crevettes issues des élevages en biofloc.

Partie IV – L'environnement bactérien du biofloc : influence sur le microbiote intestinal de la crevette

Introduction

Les études sur l'élevage des crevettes en biofloc ont montré l'influence de cette technologie, basée sur un très faible renouvellement d'eau et une forte aération, sur la qualité du milieu d'élevage et la nutrition des animaux. Cette technologie permet aux déchets azotés générés par les crevettes et potentiellement toxiques pour elles d'être convertis en biomasse bactérienne qui sert alors de source nutritionnelle (Schneider *et al.*, 2005). Outre le rôle nutritionnel, les communautés bactériennes du biofloc pourraient avoir un rôle majeur dans la santé des élevages. En effet, de nombreuses observations montrent que les crevettes sont en meilleure santé et présentent une meilleure croissance quand elles sont élevées dans des systèmes d'élevage avec une forte productivité naturelle comme le biofloc (Xu et Pan, 2012 ; Kim *et al.*, 2013 ; Ekasari *et al.*, 2014). Nos études sur *L. stylirostris* confirment cela, les survies des élevages en biofloc sont supérieures à celle des élevages de densité équivalente mais en eau claire (Article 1 et 2) et les géniteurs issus des bioflocs sont également plus résistants en période de reproduction (Article 4). Une hypothèse pour expliquer ces résultats, outre le complément nutritionnel apporté par le biofloc, est la présence dans le milieu d'élevage de bactéries, contenant potentiellement des composés bioactifs et/ou jouant un rôle probiotique. Ces bactéries seraient ingérées par la crevette en même temps que les particules de biofloc. Elles peuvent coloniser ou être en transit dans le tube digestif de l'hôte et avoir des effets bénéfiques sur sa santé en améliorant son équilibre intestinal, en contribuant à la digestion enzymatique, en inhibant les organismes pathogènes, en produisant des facteurs de croissance et en améliorant la réponse immunitaire et anti-radicalaire (Johansson et Söderhäll, 1985; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Vershuere *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2013, Xu et Pan, 2013b ; Castex *et al.*, 2014). Ainsi, le rôle des bactéries du biofloc sur la santé des crevettes pourrait s'exercer à travers le microbiote de son tube digestif. Plus généralement, chez les organismes marins, le microbiote du tube digestif est associé à la production d'enzymes digestives (Sugita *et al.*, 1987 ; Ramirez et Dixon, 2003 ; Izvekova, 2006 ; Kar et Ghosh, 2008 ; Tzuc *et al.*, 2014), à la compétition/exclusion des bactéries pathogènes et production d'éléments essentiels pour le métabolisme de l'hôte (Tzuc *et al.*, 2014). Cependant les résultats obtenus sur le sujet concernent principalement le poisson et très peu de données sont disponibles sur le microbiote du tractus digestif des crevettes Pénéides. Les quelques études réalisées chez les crevettes ont montré que le microbiote du tube digestif était principalement composé des genres *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* et *Vibrio* (Yasuda and Kitao, 1980 ; Dempsey *et al.*, 1989 ; Moss *et al.*, 2000 ; Oxley *et al.*, 2002). Cependant, tous ces résultats proviennent d'études utilisant les techniques de culture anaérobie qui révèlent uniquement les bactéries cultivables. Or ces dernières ne représentent qu'entre 10-50% des populations totales des bactéries de l'échantillon mesuré (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Wilson et Blitchington, 1996). Récemment, à l'aide de techniques moléculaires (PCR-DGGE et pyrosequençage principalement), certains auteurs ont montré que le microbiote du tube digestif de la crevette était composé de

Proteobacteria, *Firmicutes* et *Bacteroidetes* avec une prédominance des *Gamma-Proteobacteria*, classe comprenant les genres *Vibrio* et *Photobacterium* (Liu *et al.*, 2011 ; Chaiyapechara *et al.*, 2012 ; Rungrassamee *et al.*, 2013, 2014 ; Zhang *et al.*, 2014). L’influence des populations bactériennes de l’environnement d’élevage sur le microbiote intestinal de l’animal en culture a été très peu étudiée. Chaiyapechara *et al.* (2012) ont comparé, par la technique de PCR-DGGE, les populations bactériennes du tube digestif de la crevette *P. monodon* provenant de différentes fermes d’élevage commerciales. Ces auteurs avaient montré que la composition bactérienne du tube digestif des animaux provenant des différentes fermes était significativement différente au niveau des genres et des espèces de bactéries.

Bien que le rôle du compartiment bactérien sur la nutrition et la santé des élevages en biofloc soit très fortement soupçonné, très peu d’études ont été effectuées sur le sujet. Pour ma part je suis convaincue que la maîtrise de l’élevage en biofloc passera par une meilleure connaissance des populations bactériennes qui s’y développent et de leur influence sur le microbiote du tube digestif qui comme nous l’avons vu jouerait un rôle important sur la physiologie et la santé de l’animal. Dans ce cadre, je me suis intéressée à comparer d’une part les populations bactériennes du milieu provenant d’élevage en eau claire et en biofloc et d’autre part les bactéries du microbiote intestinal des crevettes élevées dans ces deux systèmes. Ce travail devait permettre de décrire la diversité taxonomique et l’abondance des bactéries des deux milieux d’élevage et mettre en évidence l’influence éventuelle des populations bactériennes de ces milieux sur celles du microbiote intestinal de la crevette. Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé l’étude des populations bactériennes par une approche métagénomique en utilisant la technique de pyroséquençage. Cette technique nous apporte une meilleure compréhension de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes dans un environnement.

Article 5: Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in biofloc system

Emilie Cardona^{1,2}, Yannick Gueguen^{1#}, Kevin Magré¹, Bénédicte Lorgeoux¹, David Piquemal³, Fabien Pierrat³, Florent Noguier³, Denis Saulnier¹.

¹IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, Unité de recherche Ressources Marines, B.P 7004, 98719 Taravao, French Polynesia.

²IFREMER, Unité de recherche Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable en Nouvelle Calédonie B.P. 2059, 98846 Nouméa, New Caledonia.

³ACOBIO, 1682 Rue de la Valsière, Cap Delta - CS77394-34184 Montpellier, France.

Present address: Ifremer, UMR 5244 IHPE, UPVD, CNRS, Université Montpellier, F-34095 Montpellier, France.

Article soumis dans le journal Plos one

Highlights

- Bacteria found in important abundance in biofloc have two principal characteristics: the need for organic substrate or nitrogen sources to grow and the capacity to attach to surfaces and co-aggregate.
- *Gammaproteobacteria Vibrionale* dominates shrimp intestine microbiota.
- The culture environment influences the shrimp intestine microbiota.

Abstract

Biofloc technology (BFT), a breeding system with zero or minimal water exchange, is gaining popularity as an aquaculture strategy. In the water column, it develops conglomerates of microbes, algae and protozoa, together with detritus and dead organic particles. The intensive microbial community present in this system can be used as a pond water quality treatment system and microbial protein can serve as a feed additive. The current problem with BFT is the difficulty in controlling its bacterial community composition for optimal water quality and also optimal shrimp health. Our analyses of the bacterial community identified in water from BFT and Clear sea water (CW) highlighted important differences in the frequency distribution of the bacterial community. Bacteria found in important abundance in BFT have two principal characteristics: the need for organic substrate or nitrogen sources to grow and the capacity to attach to surfaces and co-aggregate. A correlation between bacteria groups and physicochemical and biological parameters measured in rearing tanks was revealed. Moreover, our results show that water rearing bacterial communities influenced the microbiota of shrimp. Indeed, the biofloc environment modified the shrimp intestine microbiota, as shown with only 27% similarity between intestinal bacterial communities from both conditions. This study provides the first information describing the complex microbial biofloc community with which to understand the environment-microbiota host relationship in this rearing system.

1. Introduction

In shrimp aquaculture, intense interest has centred on biofloc technology (BFT). BFT is a rearing system with zero or minimal water exchange. In the water column, the aggregate development of microbes, algae and protozoa, along with detritus and dead organic particles, takes place (Avnimelech, 2009). The resulting intensive microbial community present in this system can serve as a pond water quality treatment system whilst microbial protein can be used as nutrient. The current problem with BFT is the difficulty controlling the biofloc bacterial community composition for optimal water quality and also optimal shrimp health. Today, the research priority with regard to BFT is measuring and describing the complex microbial biofloc community and developing methods to establish diverse and stable microbial communities. Few authors have quantified total heterotrophic bacteria and *Vibrio* sp. (Anguilera-Rivera *et al.*, 2014; Ekasari *et al.*, 2014). Zhao *et al.* (2012) reported that adding *Bacillus* into BFT water resulted in a decrease of *Vibrio* abundance. However, to the best of our knowledge, no author has characterised the totality of bacterial communities in BFT.

It is assumed by many authors that, by consuming natural productivity, shrimps ingest bacteria present on the particles (Avnimelech, 2009; Xu and Pan, 2013). It is also known that the composition of aquatic bacterial communities in ponds has a strong influence on the internal bacterial flora of farmed marine animals; this can play a role in nutrition, immunity, and disease resistance of animals (Luo *et al.*, 2006). However, no study has shown a relationship between the BFT bacteria and those of cultured animals.

In this study, an Illumina-based high-throughput sequencing method was used to analyse the microbial biodiversity and composition of the culture water, the intestinal microbiota and the association between culture method and the composition and bacterial profile of shrimp.

2. Materials and methods

2.1 Experimental design

Before the experiment, the biofloc culture was established in one 25m² tank with a low shrimp biomass of 300g.m⁻² for three months. After this period, biofloc was transferred into 12 outdoor polyester tanks (capacity, 250 litres). Juveniles of *Litopenaeus stylirostris* shrimps (4.45 ± 1.27 g) were randomly assigned for 35 days in two conditions to obtain a shrimp mean biomass of 900g.m⁻²: Clear sea Water system (CW) and BioFloc Technology (BFT). The experiment was conducted in 18 outdoor polyester tanks (capacity, 250 litres) in the Aquaculture Technical Center of Tahiti (Vairao, French Polynesia), with 6 replicates for CW and 12 replicates for BFT. Each tank was continuously aerated with blown air delivered through a stone diffuser and was covered with a shade net to control the sunlight (70% inhibition of light). The water renewal rate was

300% per day in CW treatment and 3% in BFT; water was directly pumped from a lagoon in Tahiti (French Polynesia). To balance the C:N ratio and promote the development of heterotrophic bacteria in BFT, molasses was added daily to obtain a C:N of 20:1 (Avnimelech, 2009). Shrimp were fed twice a day (8 am and 15 pm).

2.2 Physicochemical and biological measurement

Temperature and dissolved oxygen were recorded twice per day (08:00 am and 03:00 pm) with OxyGard Handy Gamma. The pH was recorded once per day (08:00 am) with a pH meter (Hach Lange HQ 40D). Furthermore, total ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) and nitrite-nitrogen ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) were analysed twice per week by a fluorescence method according to Holmes *et al.* (1999) and a spectrophotometric method according to Bendschneider and Robinson (1952). Total suspended solid (TSS) were also measured twice weekly: water samples (50mL) were collected from each tank and filtered under vacuum pressure through pre-dried and pre-weighed GF/C filter paper (FW1). The filter paper containing suspended materials was dried in an oven until a constant weight was achieved (at 60°C for 24h). Dried samples (FW2) were weighed to 0.01 mg using a Mettler AC 100 balance. TSS is the difference between FW1 and FW2. Chlorophyll a (Chl a) was determined using a spectrophotometer (Trilogy Turner Design) at wavelengths of 664 and 750nm, following the method of Holm-Hansen *et al.* (1965).

2.3 Water and intestine sample collection

Once a week, 60mL per tank of BFT rearing water were sampled and filtered through a 0.22µm Sterivex Millipore filter. CW rearing water was sampled for the same manner but with only two times during rearing period; we consider that with the higher renewal, water (300% per day), bacterial communities no change during rearing. The filter was put into 2mL microcentrifuge tubes with 1mL of lysis solution (0.1 M EDTA- pH 8; 1% SDS and 200 µg.mL⁻¹ proteinase K) and then incubated at 55°C for 24 hours. At the end of the experiment, shrimps were not fed during 24h before sampling. Next, three shrimps were randomly sampled from each tank. Intestines were aseptically dissected and directly put in 1.5mL microcentrifuge tube with 0.5mL of lysis solution. The samples were then incubated for 24 hours at 55°C.

2.4 DNA extraction

The lysis extract was submitted to CTAB extraction, whereby CTAB complexes, both with polysaccharides and with residual protein, effectively removed both in the subsequent emulsification and extraction. Next, a classic method using Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1) was used to extract DNA following the manufacturer's instructions (AMRESCO®). After centrifugation at 10 000 g and 4°C for 5 min, pelleted DNAs were resuspended in 50µL of ultrapure water, and stored at -20°C. The purity and concentration of the

extracted DNA were tested using the NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) and the optical biomass ratio (OD 260/OD 280) was analysed.

2.5 PCR amplification of 16SrNA genes and pyrosequencing

A barcoded sequencing approach was used to study the bacterial composition of water and intestines. Prior to pyrosequencing, PCR amplification was performed. All of the PCR components were UV irradiated for 30 min under a UV lamp prior to addition of the Taq Polymerase enzyme and DNA. The primer pair “V4 16S rRNA F 515” (5' GTG CCA GCM GCC GCG GTA A3') and “V4 16SrRNA R 806” (5'GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT 3'), targeting the V4 variable region of the 16S rRNA gene, was used to amplify the DNA samples by PCR (PTC-100, MJ Research, Inc.). The Go Taq Hot Start Polymerase Promega kit was used following the manufacturer's recommendations. Briefly, PCR was carried in 1 x PCR amplification buffer (10X buffer contains 200mM TRIS HCl (pH 8.4), 500mM KCl) and 2mM of MgCl₂ with 0.5µM of each primer, 0.2mM of each deoxyribonucleotide (dNTP), 1µL of DNA suspension and 1.25U of Taq DNA polymerase (Go Taq Promega™ 5U/ml). After initial denaturation at 95°C for 5 min, 30 cycles of amplification were carried out starting at 95°C for 1 min, followed by 30s at 58°C, and 1 min at 72°C, with a final extension at 72°C for 5 min. The quality of PCR products was verified by migration on a 1% agarose electrophoresis gel. The samples were then sent for pyrosequencing at the Acobiom laboratory (Montpellier, France). Pyrosequencing libraries were generated by the MiSeq Illumina genome sequencer (300 cycles).

2.6 Data analysis

Pyrosequencing data were analysed using Qiime 1.8.0 software package (Quantitative Insights Into microbial Ecology). First, data were filtered to remove forward primers, reverse primers and barcode sequences. Operational taxonomic units (OTUs) were selected (97% similarity) using the pick_closed_reference_otus.py with uclust method and Greengenes 13_8 reference. Shannon and Simpson indices were further determined. A final OTU *versus* sample table was generated for downstream analysis carried out using R Studio v0.98.1091. A Venn diagram was created to determine specific and common bacterial species of different samples. Non-metric multidimensional (MDS) plot using Bray-Curtis similarity index was applied to visualise the differences between samples. Analysis of similarities (ANOSIM) was performed to test whether there were significant differences between different groups. Moreover, similarity percentages analysis (SIMPER) was used to define the taxon at the root of dissimilarity between sample types. Frequency distribution matrix of samples' pyrosequencing results was used for these three types of analysis.

3. Results and discussion

Nowadays, biofloc technology is largely employed across the world. The advantages of BFT are that the intensive microbial community present in this system can serve as the pond water quality treatment system whilst microbial protein can be used as the nutrient. However, very little information is available on the bacterial communities present in the rearing water and also on the interaction of this microbial environment with bacteria of the shrimp microbiota. An important step to improve and optimise the biofloc technology concerns its microbial characterisation and control. In this study, we have characterised for the first time, using 454 next generation sequencing techniques, the biofloc microbial communities and evaluate its impact on the shrimp intestine microflora.

3.1 Bacterial diversity and composition in BFT and CW water rearing

A total of 4,141,873 sequences were obtained for water culture with an average of 111,943 reads per samples (n=38). Sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at the 0.97 similarity level. The Greengenes 13_8 reference OTU collection bank was used as reference. OTU richness of water varied from 435.02 ± 55.81 per sample in the CW condition to 277.59 ± 23.02 in the BFT condition.

To compare the bacterial diversity in each condition, Shannon and Simpson indices were calculated from the OTUs. The Shannon index varied from 2.86 ± 0.32 in the CW condition to 2.66 ± 0.39 in the BFT condition. The Simpson index varied from 0.15 ± 0.05 in the CW condition to 0.18 ± 0.09 in the BFT condition. The similar indices suggested a similar range of diversity between both conditions. It is important to note that the Simpson index, close to 0, revealed an important diversity of species.

Although the bacterial diversity was similar, the frequency distribution of bacteria phyla differed between conditions (Table IV-1). *Proteobacteria* was the most abundant phylum in water from both conditions. In this study, its relative abundance ranged between 50.4% for CW and 60.1% for BFT. This phylum is widely dispersed in marine environment and plays an important role in the process of nutrient cycling and the mineralisation of organic compounds (Kirchman *et al.*, 2002; Kersters *et al.*, 2006). *Bacteroidetes* was the second most abundant phylum with a relative abundance ranging from 30.01% for CW and 21.86% for BFT. This phylum is a dominant member of marine heterotrophic bacterioplankton and is frequently found colonising macroscopic organic matter particles (Woebken *et al.*, 2007). Finally, *Cyanobacteria* was the third most abundant phylum with a relative abundance ranging from 12.96% for CW and 8.47% for BFT. Altogether, these three phyla represented more than 90% of the total bacteria.

Table IV-1: Relative abundance of the most frequently identified bacterial phyla (>0.1% of total sequence) within water from different rearing conditions over all of rearing: clear water (CW) or biofloc (BFT).

Bacteria phyla	CW	BFT
<i>Proteobacteria</i>	50.40	60.07
<i>Bacteroidetes</i>	30.04	21.86
<i>Cyanobacteria</i>	12.96	8.48
<i>Euryarchaeota</i>	2.77	0.00
<i>Actinobacteria</i>	2.20	2.13
<i>Planctomycetes</i>	0.36	1.58
<i>Verrumicrobia</i>	0.33	1.37
<i>Chloroflexi</i>	0.31	0.31
<i>Crenarchaeota</i>	0.17	0.00

In BFT water, the taxa *Gammaproteobacteria Thiotrichaceae Leucothrix* (20.05%), *Alphaproteobacteria Rhodobacteraceae* (11.99%), *Cyanobacteria Chloroplast Stramenopiles* (8.02%), *Gammaproteobacteria Oceanospirillales* (6.11%) and *Bacteroidetes Saprospiraceae* (4.69%) were the most dominant taxa. In the CW conditions, *Bacteroidetes Flavobacteriales Cryomorphaceae* (24.49%), *Alphaproteobacteria Rickettsiales Pelagibacteraceae* (10.14%), *Stramenopiles* (8.42%), *Gammaproteobacteria Alteromonadaceae Glaciecola* (5.62%) and *Gammaproteobacteria Alteromonadaceae Colwelliaceae* (4.87%) were the most represented.

The variability of the main BFT bacterial taxa is correlated with changes in biotic and abiotic environmental factors, indicating their selective control of bacterial communities (Ramette 2007). In the BFT system, several physicochemical and biological parameters such as Chl a, NO_2^- -N and NH_4^+ -N changed over the course of rearing, whereas these were stable and close to zero in the CW system (Figure IV-1). Values of pH were relatively stable over the course of BFT rearing (between 7.7 and 7.9).

Analysis of correlation revealed a correlation between the evolution of the major bacteria genus found in BFT water and three environmental parameters of rearing (NO_2^- -N, NH_4^+ -N and Chl a). The variability in the most important bacterial communities on temporal scales of BFT rearing is shown in Figure IV-2.

This study revealed that the BFT environment harboured communities of bacterial genus that were distinct from those found in the CW environment. Indeed, results from similarity percentages revealed that profiles of water samples from each condition were distinct with 89% dissimilarity. The genera *Photobacterium*, *Leucothrix* and *Vibrio* were the three principal taxa at the root of dissimilarity (16.5%, 12.1% and 4.1%, respectively) between water from both conditions.

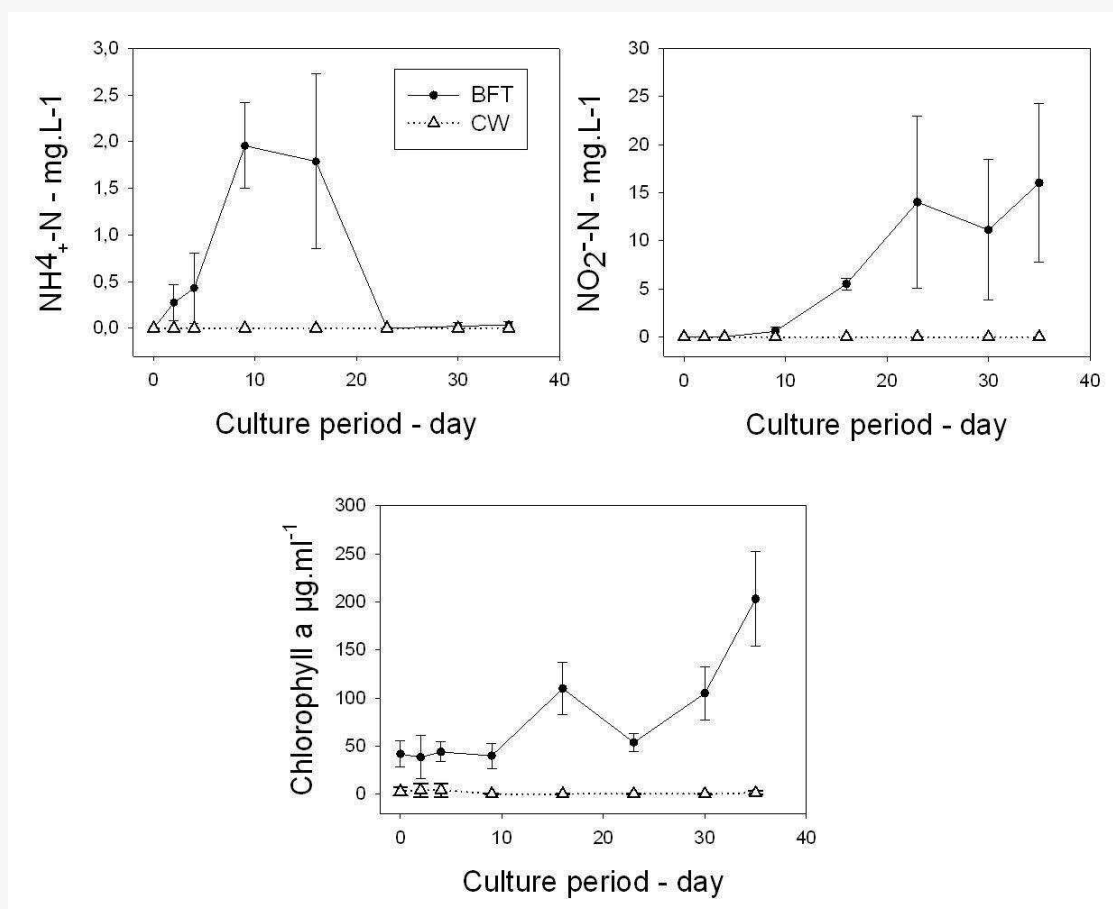


Figure IV-1: Evolution of $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and Chlorophyll a concentrations over course of both rearing systems.

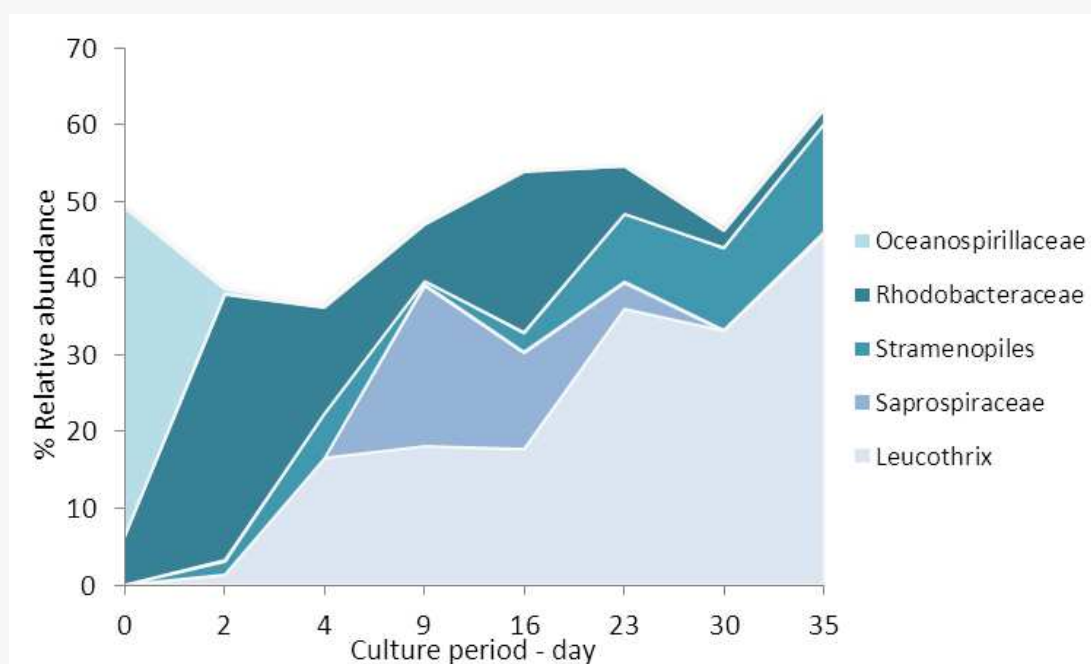


Figure IV-2: Relative abundance evolution of the five major taxa over course of rearing in BFT.

In this study, the frequency distribution of *Leucotrix* increased with the time peaking at the last rearing day with 40.2% of the total bacteria. This genus was considered to be comprised of bacteria capable of filamentous growth (Bland and Brock, 1973). Its evolution was positively correlated with nitrite concentration ($p < 0.0001$). Nitrite could be used as a growth source by this genus. Moreover, this genus needs to bind to survive. In BFT, biofloc particles present in important concentration in the water column and can serve as mounting surfaces ($222 \pm 85 \text{ mg.L}^{-1}$). Moreover, *Leucotrix mucor*, the most studied species in this genus, was found to obtain its nutrients for growth from the algae rather than from seawater (Bland and Brock, 1973). It is logical that its evolution is significantly correlated with Chl a concentration ($p = 0.004$). However, *Leucotrix mucor* is known to cause fouling disease in shrimps, although it is not considered to be a true pathogen (Gutiérrez-Salazar *et al.*, 2011). The orders *Oceanospirillales* representing 43.1% before the beginning of the experiment, decreased significantly after 2 days of rearing (1.2%). The genus that displayed the greatest change after the beginning of the experiment was *Marinomonas*. The brutal change could be attributed to the important increase in shrimp biomass between the biofloc preparation and beginning of the experiment. *Bacteroidetes Saprospiraceae*, a bacteria found only in BFT water, was positively correlated with $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration ($p > 0.0001$). This genus was known to easily use the organic substrate (Gao *et al.*, 2012). *Rhodobacteraceae*, found with important frequency in BFT water, is frequently detected in aquaculture biofilm systems (Cytryn *et al.*, 2005; Hjelm *et al.*, 2004). It is considered an excellent biofilm-forming organism and is among the first and dominant colonisers of the surface in all marine environments (Dang and Lovell, 2000, 2002). The ability to effectively colonise surfaces gives *Rhodobacteraceae* a competitive advantage in the BFT, where total suspended solid concentration is important. In addition, *Rhodobacteraceae* are known to exhibit a diverse range of metabolic activity. The *Rhodeobacter* group may possibly establish an antagonistic beneficial bacterial community in the rearing environment of turbot larva and thereby limit the survival of pathogenic bacteria (Hjelm *et al.*, 2004). Therefore, in our study, *Rhodobacteraceae* may have played an important role in maintaining the culture system's health. Indeed, *Vibrionales* order represented 6% of total sequence in CW condition (1.23% *Pseudoalteromonadaceae* and 4.74% *Vibrionaceae*), whereas it represented only 1.5% in BFT conditions (1.37% *Pseudoalteromonadaceae* and 0.14% *Vibrionaceae*). *Vibrio*, belonging to the *Vibrionaceae* family, have been characterised as pathogens for various aquatic organisms including crustacean larvae and juveniles (Lightner and Redman, 1988; Ruangpan and Kitao 1991; Karunasagar *et al.*, 1994; Mohny *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 2001; Bourne *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2006). The *Vibrio*, being less present in BFT, shrimps could be less exposed to vibrioses. In the CW condition, 80.2% of *Vibrionaceae* total sequence was represented by *Photobacterium damsela*. This species is known to be a marine fish pathogen and can be transmitted to fish through water (Fouz *et al.*, 2001). BFT limited the proliferation of this species and could thus minimise the risk of infection. The *Rhodobacteraceae* family could, in this study, limit the survival of pathogenic bacteria in BFT compared

to the CW environment. Another suggestion to explain the lower *Vibrio* abundance in BFT was proposed by Crab *et al.* (2010). Bioflocs had biocontrol activity against *Vibrio harveyi*, the virulence of which can be regulated by the process of cell-to-cell communication called quorum sensing (Defoirdt *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2010).

Interestingly, the CW environment harboured communities of bacterial genera that were distinct from those found in the BFT environment. *Pelagibacteraceae* is a family of extreme oligotrophs that are widely distributed over the Earth's oceans (Rappé *et al.*, 2002). Moreover, *Alteromonadaceae*, *Cryomorphaceae* and *Pelagibacteraceae* families, constituting the major families found in CW water, were considered the more abundant bacterial group in the eastern Mediterranean Sea, which is an ultraoligotrophic marine habitat (Fodelianakis *et al.*, 2014). Their significant presence in CW water can be explained by the fact that water was pumped directly into the lagoon of Tahiti (French Polynesia) which is also oligotrophic sea water. In the CW tank, water renewal was very high (300% per day); it is therefore logical that the bacterial communities reflect those of the lagoon.

Based on these observations, we can explain the difference in bacterial communities between the BFT and CW environments by the important organic matter and nutrient concentrations present in biofloc. The biofloc is characterized by bacteria such as *Gammaproteobacteria Thiotrichaceae Leucothrix* sp. *Alphaproteobacteria Rhodobacteraceae* spp and *Saprospiraceae*. These bacteria have the particularity to use organic matter and nitrogen compounds for growth and require a support for growth: these two conditions are found in BFT system particularly rich in organic matter and suspended particles in the water column. This ability to attach to the surfaces and to use organic matter may be a significant physiological characteristic of bacteria in biofloc. In contrast, the bacterial groups found in CW system, mainly *Alteromonadaceae*, and *Cryomorphaceae*, *Pelagibacteraceae* families, are characteristics of oligotrophic waters.

3.2 Effect of rearing environment on shrimp microbiota

In aquatic ecosystems, the intimate relationships between microorganisms and other biota and the constant flow of water through the digestive tract of fish and invertebrates will also affect their indigenous microflora (Gatesoupe, 1999). In this study, we focused on the bacterial distribution and composition of shrimp intestine after 35 days of rearing according to different conditions, CW or BFT.

A total of 963,352 sequences were obtained for intestine samples with an average of 118,843 reads per CW sample (n=3) and 151,702 reads per BFT sample (n=4). The OTU richness of water varied from 239.00 ± 31.11 per sample in the CW condition to 196.25 ± 9.00 in the BFT condition. The major order bacteria relative abundance of intestine samples from both conditions is presented in Table IV-2. As a reminder, shrimps did not have eaten commercial feed during 24h before sampling. BFT and CW libraries from

intestine samples were mostly dominated by one order affiliated to *Gammaproteobacteria Vibrionales*. This order is better represented in CW intestines (69.2% of total sequences) than in BFT intestines (58.6% of total sequences). Bacteria in this class have previously been reportedly found in high relative abundance in the intestine of others species of shrimps such as *Litopenaeus vannamei*, *Peneaus monodon* and *Fenneropenaeus chinensis* (Liu *et al.*, 2011; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2013, 2014; Zhang *et al.*, 2014). *Alphaproteobacteria Rhodobacterales* was the second most abundant order with a relative abundance ranging from 12.99% for CW and 7.38% for BFT. Although representing a small fraction of the sequences, *Chloroplast Stramenopiles* represented 10.5% in CW shrimp intestines, while this order represented less than 2% in BFT shrimp intestines. *Flavobacteriia Flavobacteriales* and *Bacteroidia Bacteroidales* orders belonging to the phylum *Bacteroidete* and *Mollicutes* orders belonging to the phylum *Tenericutes* represented 5.5%, 6.7% and 6.8%, respectively, in BFT shrimp intestines, while these orders represented less than 2% in CW shrimp intestines.

Table IV-2: Relative abundance of the most frequently identified bacterial orders (>1% of total sequences) within shrimp intestines from different rearing conditions: clear water (CW) or Biofloc (BFT).

Taxa	CW	BFT
<i>Gammaproteobacteria Vibrionales</i>	69.18	58.60
<i>Alphaproteobacteria Rhodobacterales</i>	12.99	2.02
<i>Chloroplast Stramenopiles</i>	10.53	0.14
<i>Bacteroidia Bacteroidales</i>	0.01	6.74
<i>Flavobacteriia Flavobacteriales</i>	1.87	5.53
<i>Gammaproteobacteria Alteromonadales</i>	1.57	1.11
<i>Mollicutes</i>	1.29	5.95

The *Pseudoalteromonadaceae* family represented 8.2% and 0.8% in the shrimp intestine from the CW and BFT conditions, respectively. *Vibrionaceae* family represented 57.58% and 54.5% in shrimp intestine from the CW and BFT conditions, respectively. *Photobacterium* represented 82 to 89% of *Vibrionaceae* total sequence in shrimp intestine, while *Vibrio* represented the remainder.

The Shannon index varied from 1.91 ± 0.67 in the CW condition to 2.01 ± 0.68 in the BFT condition and the Simpson index varied from 0.32 ± 0.19 in the CW condition to 0.26 ± 0.15 in the BFT condition. These comparable indices suggested a similar range of diversity between both conditions. However, in comparison with indices measured in water, bacterial diversity estimated by the Shannon index, in which a higher value means a greater bacterial diversity, revealed a significantly lower diversity in the intestine compared to water ($p < 0.0001$). Similarly, the Simpson index, in which a lower value means a greater bacterial diversity, confirmed this ($p < 0.0001$). Johnson *et al.* (2008) showed that water was substantially more diverse than the intestine of shrimps. They expected this because the environment of the shrimp gut is different from water

in an aquaculture tank and not all microbes in the water would be ingested and survive in the gut. Moreover, the shrimp gut is less aerobic than tank water and has immunological factors which may differentially select against some bacteria.

Maintenance and variation in bacterial OTUs in water rearing and in shrimp intestine according to both conditions were investigated and precisely quantified with a Venn diagram (Fig IV-3). The analyses revealed that 198 OTUs were shared between all sample types. The diagram clearly emphasises that water samples have a large pool of OTUs that are not found in the intestines (251 and 186, respectively, in water from BFT and CW; 184 OTUs shared between both) than the number found especially in the intestine (12 and 16, respectively, from BFT and CW; 3 OTUs shared between both). This result confirmed that water was substantially more diverse than shrimp guts. Water and intestine samples from BFT shared 20 OTUs that were not found in samples from CW. Similarly water and intestine samples from CW shared 21 OTUs not found in samples from BFT.

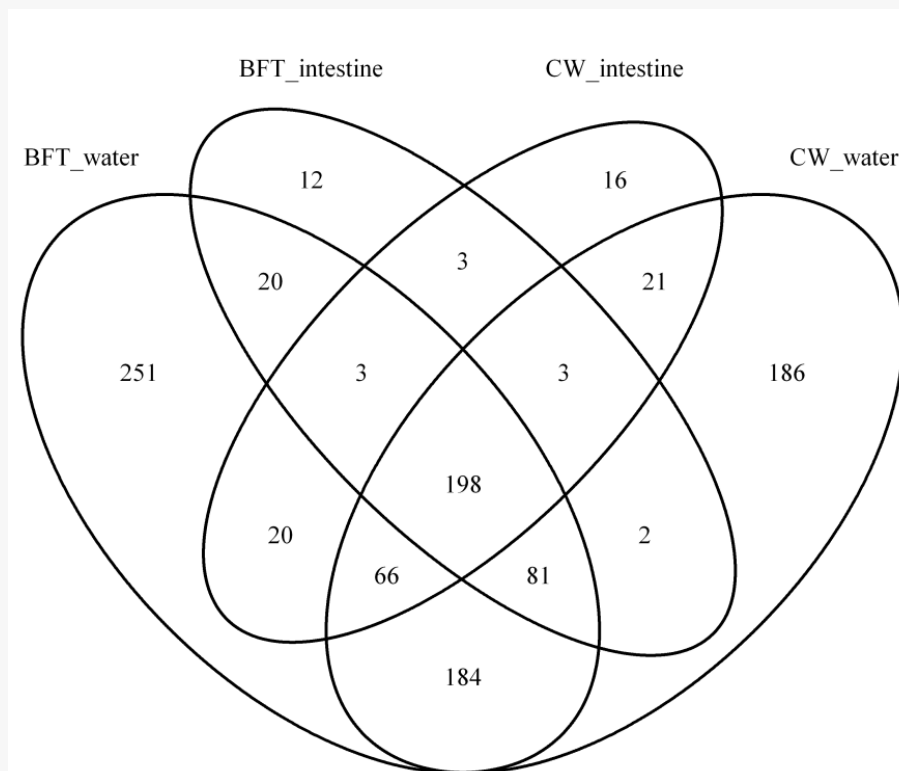


Figure IV-3: Venn diagram showing the unique and shared OTUs (3% of distance level) in the different libraries: BFT and CW intestines, BFT and CW water.

Significant differences in the bacterial communities of intestines and water from CW and BFT conditions were visualised by the MDS plot and confirmed using ANOSIM ($p = 0.002$) (Fig IV - 4). A stress value of below 0.2 (0.14 in our case) indicated that an MDS ordination plot is a good spatial representation of the difference

in the data. On this figure, we can see that bacterial communities in CW intestine reflected the CW outside environment after one month of rearing. Moreover, shrimp intestines from BFT presented distinct bacterial communities compared to those from CW.

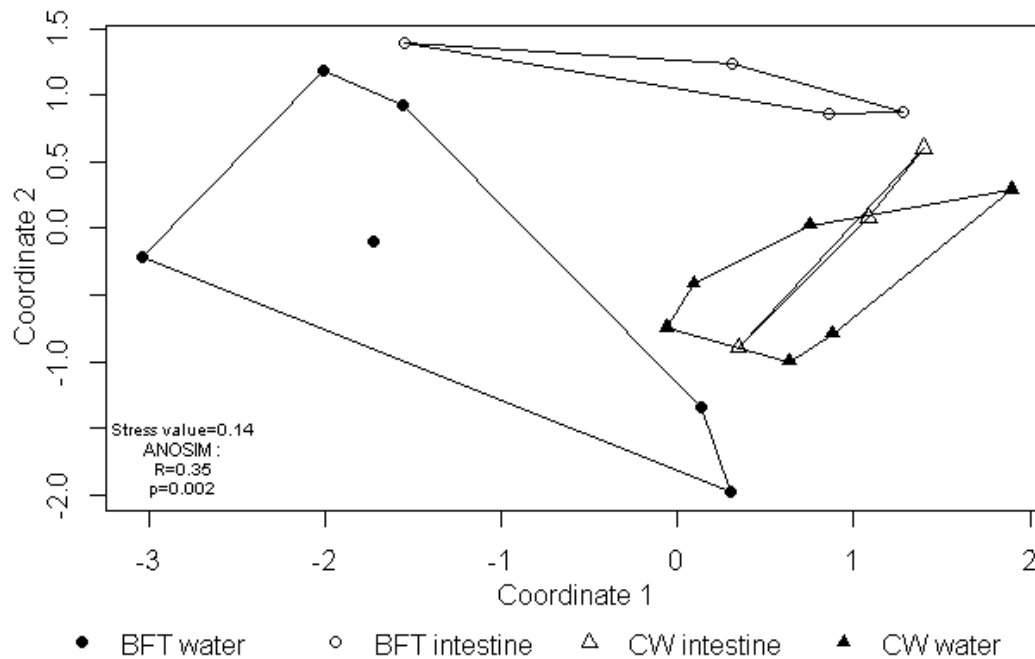


Figure IV-4: Non-metric multidimensional scaling (MDS) plot using the Bray-Curtis coefficient of pyrosequencing results associated with intestines and water samples from CW or BFT conditions after 35 days of rearing.

Each point represents a pyrosequencing profile from one sample.

Previous investigations have proposed that the intestinal microbiota of shrimp originate from their cultural environment (Harris, 1993; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). In this study, the results showed that profiles of intestinal bacterial communities from each condition were distinct (only 27% of similarity between the both conditions). Moreover, results of MDS figure provide evidence that the composition of bacterial communities in shrimp intestines from the CW condition was relatively similar to those of the rearing environment. Moreover, similarity percentage analysis revealed 35% similarity between water and intestine samples. This was not the case for the BFT condition, however, as similarity percentage analysis revealed only 13% similarity between water and intestine samples. *Cryomorphaceae* sp., *Photobacterium damsela* and *Pelagibacteraceae* sp. families were the three principal taxa at the root of dissimilarity (13.6%, 13.3% and 6.5%, respectively) between the intestine samples from both conditions. It is interesting because these taxa were found at a more important frequency distribution in the CW intestine and water than in the BFT intestine and water, confirming the influence of the bacterial composition of the water environment on that of the intestine. *Leucothrix* and *Rhodobacteraceae* contributed 2.9% and 1.8%,

respectively, to the dissimilarity; these group abundances were more important in BFT intestines than in CW intestines. These significant percentages also suggest that the BFT water environment bacterial composition influenced those of the intestine.

4. Conclusion

The present study explored the diversity of bacterial communities by exploiting 16SRNA pyrosequencing in the cultural environment (BFT and CW) and intestine of shrimp reared in both environments. The results demonstrated firstly that water harboured a remarkable diversity of bacterial communities and that the five most important bacterial families were different between both culture methods. Secondly, this study showed that culture environment interfered with the intestinal microbial structure communities. This study provides descriptive information of the bacterial community of biofloc rearing, and this influence on the intestinal shrimp microbiota, which can further be applied to research into immunity, disease resistance and nutrition of shrimp aquaculture.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Government and Southern, Northern and Island Provinces of New-Caledonia and the management of marine resources and mining of Tahiti. We would like to thank the Technical Centre for Aquaculture of Tahiti for their help during the running of the experiment and Fanny Marquer and Laure Quintric for their help with the bioinformatics analysis.

References

- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davo, A., Escalante, K., Chavez, C., Cuzon, G., & Gaxiola, G., 2014. Probiotic effect of floc on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 424, 215-219.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc Technology - A practical guide Book. Baton Rouge, Louisiana, United States, The World Aquaculture Society.
- Bendschneider, K., and Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. mar. Res.*, 11, pp. 87-96.
- Besemer, K., Peter, H., Logue, J. B., Langenheder, S., Lindström, E. S., Tranvik, L. J., & Battin, T. J., 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. *The ISME journal*, 6(8), 1459-1468.
- Bland, J. A., & Brock, T. D., 1973. The marine bacterium *Leucothrix mucor* as an algal epiphyte. *Marine Biology*, 23(4), 283-292.
- Bourne, D. G., Young, N., Webster, N., Payne, M., Salmon, M., Demel, S., & Hall, M., 2004. Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture*, 242(1), 31-51.
- Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., & Jiravanichpaisal, P., 2012. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. *Microbial ecology*, 63(4), 938-953.

- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W., 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1643-1649.
- Cytryn, E., Van Rijn, J., Schramm, A., Gieseke, A., de Beer, D., & Minz, D., 2005. Identification of bacteria potentially responsible for oxic and anoxic sulfide oxidation in biofilters of a recirculating mariculture system. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6134-6141.
- Dang, H., & Lovell, C. R., 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 467-475.
- Dang, H., & Lovell, C. R., 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 496-504.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P., 2007. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME journal*, 2(1), 19-26.
- Ekasari, J., Azhar, M. H., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P., 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*.
- Fodelianakis, S., Papageorgiou, N., Pitta, P., Kasapidis, P., Karakassis, I., & Ladoukakis, E. D., 2014. The Pattern of Change in the Abundances of Specific Bacterioplankton Groups Is Consistent across Different Nutrient-Enriched Habitats in Crete. *Applied and environmental microbiology*, 80(13), 3784-3792.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Milan, M., & Amaro, C., 2000. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of applied microbiology*, 88(3), 531-535.
- Gao, D. W., Tao, Y., & An, R., 2012. Digested sewage treatment using membrane-based process at different hydraulic retention times. *Desalination*, 286, 187-192.
- Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1), 147-165.
- Gutiérrez-Salazar, G. J., Molina-Garza, Z. J., Hernández-Acosta, M., García-Salas, J. A., Mercado-Hernández, R., & Galaviz-Silva, L., 2011. Pathogens in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) and their relationship with physicochemical parameters in three different culture systems in Tamaulipas, Mexico. *Aquaculture*, 321(1), 34-40.
- Harris, J. M., 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial ecology*, 25(3), 195-231.
- Hjelm, M., Riaza, A., Formoso, F., Melchiorson, J., & Gram, L., 2004. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and *Vibrionaceae* strains in a turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7288-7294.
- Holmes, R.M., Aminot, A., Kerouel, R., Hooker, B.A., Peterson, B.J., 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56(10): 1801-1808.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, P.E., Strickland J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil. Conseil International Pour l'Exploitation de la Mer*. 30 (1965). pp. 3–15.
- Johnson, C. N., Barnes, S., Ogle, J., Grimes, D. J., Chang, Y. J., Peacock, A. D., & Kline, L., 2008. Microbial Community Analysis of Water, Foregut, and Hindgut during Growth of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Closed-System Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(2), 251-258.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., & Karunasagar, I., 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3), 203-209.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E., 2006. Introduction to the Proteobacteria. *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*, 3-37.
- Kirchman, D. L., 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 91-100.
- Lightner, D. V., & Redman, R. M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1), 201-220.

- Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., & Li, Q., 2011. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture*, 317(1), 32-36.
- Luo P, Hu C, Xie Z, Zhang L, Ren C, Xu Y., 2006. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system. *J Trop Oceanogr* 25: 49–53
- Mohney, L. L., Lightner, D. V., & Bell, T. A., 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 116-125.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160.
- Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., & Giovannoni, S. J., 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418(6898), 630-633.
- Ruangpan, L., & Kitao, T., 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish diseases*, 14(3), 383-388.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N., 2013. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PloS one*, 8(4), e60802
- 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. *Aquaculture*, 192(2), 101-110.
- Wang, C. Z., Lin, G. R., Yan, T., Zheng, Z. P., Chen, B., & Sun, F. L., 2014. The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science*, 80(5), 1001-1007.
- Webster, N. S., Bourne, D. G., & Hall, M., 2006. *Vibrionaceae* infection in phyllosomas of the tropical rock lobster *Panulirus ornatus* as detected by fluorescence in situ hybridisation. *Aquaculture*, 255(1), 173-178.
- Woebken, D., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M., & Amann, R., 2007. Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4648-4657.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412, 117-124.
- Zhao, P., Huang, J., Wang, X. H., Song, X. L., Yang, C. H., Zhang, X. G., & Wang, G. C. (2012) The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicas*. *Aquaculture*, 354, 97-106.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z. & Li, E., 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449-455.

Conclusion

Le travail réalisé pour ce dernier chapitre de ma thèse a permis de décrire et comparer les populations bactériennes de deux systèmes d'élevage en intensif : eau claire et biofloc. Je me suis intéressée aux bactéries du milieu d'élevage et à celles constituant le microbiote intestinal des crevettes.

Le biofloc est composé d'une concentration en bactéries hétérotrophes totales élevée, de l'ordre de 10^5 à 10^9 bactéries.mL⁻¹ d'eau selon les auteurs (Burford *et al.*, 2003 ; Avnimelech, 2009 ; Kim *et al.*, 2013). Dans le cadre de ce travail, nous décrivons pour la première fois la composition bactérienne d'un élevage en biofloc. Au niveau de l'environnement, les systèmes de culture se distinguent par des communautés bactériennes très différentes. Celui du biofloc est caractérisé par des bactéries telles que *Gammaproteobacteria* *Thiotrichaceae* *Leucothrix*, *Alphaproteobacteria* *Rhodobacteraceae* et *Saprospiraceae*. Ces bactéries ont pour particularité d'utiliser la matière organique et les composés azotés pour leur croissance et de plus nécessitent d'un support de fixation pour se développer : ces deux conditions sont réunies dans le système en biofloc particulièrement riche en matière organique et en particules en suspension dans la colonne d'eau. A l'opposé, les groupes bactériens trouvés dans les élevages en eau claire, principalement les familles *Alteromonadaceae*, *Cryomorphaceae* et *Pelagibacteraceae*, sont caractéristiques des eaux oligotrophes du lagon polynésien. Malgré cette grande différence des communautés bactériennes entre les deux systèmes d'élevage, en termes de diversité des espèces en présence (indices de Simpson et de Shannon), les deux milieux sont comparables. Ce travail nous a aussi permis de montrer un faible développement des *Vibrio* dans l'élevage en biofloc. Certaines espèces de *Vibrio* sont connues pour être pathogènes à l'origine de maladies ou vibrioses (Lightner et Redman, 1998; Ruangpan and Kitao, 1991; Karunasagar *et al.*, 1994; Mohny *et al.*, 1994) comme cela est le cas avec les syndromes 93 et d'été à l'origine de fortes mortalités dans les élevages calédoniens (Herbland et Harache, 2008). Les *Vibrio* étant moins présents dans le biofloc, les crevettes seraient moins exposées aux vibrioses. Par ailleurs, le faible développement des *Vibrio* peut s'expliquer par la présence dans le biofloc de bactéries de la famille *Rhodobacteraceae*, suspectées pour avoir une activité anti-*Vibrio* (Hjelm *et al.*, 2004).

Au niveau de la crevette, le microbiote intestinal reflète les communautés bactériennes observées dans leur milieu d'élevage. Ainsi, en termes de diversité des espèces de bactéries, les microbiotes intestinaux des animaux sont similaires quel que soit l'élevage d'origine. Alors que les communautés bactériennes intestinales de crevettes élevées en eau claire et en biofloc présentaient seulement 27% de similarité. A l'origine de cette dissimilitude, nous trouvons les principaux groupes de bactéries listés supra qui caractérisent le type d'élevage.

Finalement, notre étude a permis de décrire, pour la première fois, les bactéries présentes dans le milieu d’élevage en biofloc en mettant en évidence un faible développement des *Vibrio* et une forte influence des communautés bactériennes du milieu d’élevage sur celles du microbiote intestinal de la crevette *L. stylirostris*. Ces résultats peuvent-ils expliquer les meilleures performances zootechniques et de reproduction des crevettes élevées en biofloc (parties II et III)? A ce stade de nos recherches, il ne nous est pas possible de répondre formellement à cette question, même si la littérature scientifique fait état de plus en plus d’exemples de relation entre le microbiote intestinal et la physiologie des animaux et que les probiotiques sont utilisés aujourd’hui à l’échelle industrielle en aquaculture (Castex *et al.*, 2014). Des travaux complémentaires seront donc nécessaires si l’on souhaite établir la nature du lien entre les bactéries du milieu d’élevage, le microbiote intestinal et la physiologie (nutrition, croissance, immunité, reproduction) de la crevette *L. stylirostris*.

Partie V - Synthèse générale et perspectives

Le développement de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie et en Polynésie française ne se situe pas à la même échelle et l'ordre des difficultés est différent.

En Nouvelle-Calédonie, la filière crevetticole représente le second secteur à l'exportation avec une production de 1560 tonnes en 2013. Cependant, elle rencontre des difficultés techniques et en particulier au niveau des écloseries avec des conséquences sur l'approvisionnement des fermes en post-larves. En écloserie, la chaîne de production repose sur des géniteurs et, si ces derniers ne sont pas dans des conditions physiologiques optimales (Chim *et al.*, 2008), les effets délétères peuvent affecter tous les maillons à commencer par une absence ou une vitellogénèse incomplète au cours de la maturation ovarienne avec pour conséquence des faibles taux de ponte, d'éclosion et une mortalité excessive des larves. La qualité de l'eau des élevages traditionnels en bassin de terre est soumise aux aléas climatiques (température, salinité...) et en certaines périodes de l'année, les animaux se retrouvent en dehors de leur zone de préférence physiologiques ; dans ces conditions, la crevette perd sa capacité à s'adapter aux contraintes de son environnement et s'affaiblit aux dépens de sa reproduction (Chim *et al.*, 2008). En conséquence, la technique de culture des géniteurs en bassin de terre développée en Nouvelle-Calédonie dans les années 80, et encore largement utilisée aujourd'hui, doit évoluer vers une technique permettant une meilleure maîtrise des paramètres d'élevage. C'est seulement ainsi qu'il sera possible de produire des géniteurs de qualité toute l'année en s'affranchissant des aléas climatiques.

En Polynésie française, la filière crevetticole est modeste (90 tonnes produites en 2013) et la contrainte majeure à son développement est le manque d'espace pour la construction de nouveaux bassins d'élevage. Cette contrainte foncière pourrait être, d'une certaine façon, contournée en intensifiant les élevages qui sont actuellement majoritairement réalisés par le système semi-intensif en bassin de terre avec des rendements de 5 à 8 tonnes par hectare par an. Une solution avait été évaluée par l'Ifremer dans les années 80 avec le système en biofloc (Blancheton *et al.*, 1987). Ce système a été appliqué à l'échelle pilote en 1988 à Tahiti dans la ferme privée de Sopomer. Cette ferme a obtenu des rendements importants avec des records de 25 tonnes de crevettes par hectare et par an (Aquacop et Garen, 1993). Cependant, les résultats de production ont été variables, probablement dû au fait que la technique de biofloc n'était pas complètement maîtrisée.

Le système d'élevage en biofloc est qualifié d'intensif avec des densités d'animaux pouvant aller jusqu'à 300 individus par m² ; il est basé sur l'absence de renouvellement d'eau et une forte aération. Dans ces conditions, les agrégats se développent dans la colonne d'eau. Ils sont composés de matière organique, bactéries, phyto et zooplancton et jouent, *in situ*, à la fois le rôle de filtre biologique et celui de complément alimentaire. On peut distinguer deux types de système : le biofloc hétérotrophe et le biofloc mixotrophe. Le premier se réalise à l'ombre, le plus souvent en intérieur, et son développement repose majoritairement sur

celui des bactéries hétérotrophes alors que le second est conduit à la lumière du soleil et se compose de microorganismes autotrophes (micro-algues, cyanobactéries) et hétérotrophes (bactéries et zooplancton). Le biofloc mixotrophe est celui mis au point à Tahiti dans les années 80 et c'est ce système d'élevage que nous avons étudié dans le cadre de cette thèse.

L'application du système biofloc en élevage des géniteurs de crevette est plus récente ; les premiers essais ont été effectués en 2004 à Tahiti (Goguenheim et Chim, 2009) avec des résultats qui étaient alors très prometteurs. Cependant le progrès apporté par ce système n'avait pas été quantifié parce que les essais avaient été réalisés sans élevage témoin en bassin de terre ou en eau claire. C'est en Nouvelle-Calédonie, en 2010, qu'une première expérience menée suivant un protocole complet permettait de comparer précisément les performances de reproducteurs issus des élevages traditionnels en bassin de terre et en biofloc (Chim *et al.*, 2010 ; Huber *et al.*, 2010). Ces premiers résultats montraient pour la première fois, d'une part la faisabilité technique de produire en intensif des géniteurs de la crevette *stylirostris* en biofloc et d'autre part les avantages en termes zootechniques, de biosécurité et économiques d'un tel système d'élevage.

Dans ce contexte, le système d'élevage en biofloc peut représenter une solution aux contraintes de développement de la crevetticulture en Polynésie française et de la production de géniteurs de qualité en Nouvelle-Calédonie. Mais, avant cela, il est nécessaire de mieux comprendre le fonctionnement de ce système d'élevage et ses interactions avec la crevette. C'est en effet en comprenant les mécanismes et les leviers de ce type d'élevage qu'il nous sera possible d'en maîtriser la conduite et d'en fiabiliser les résultats en termes quantitatif (rendement) et qualitatif (performance de reproduction des géniteurs). Cela représente l'objectif général de ma thèse dans lequel j'ai inscrit les objectifs spécifiques suivants :

- Mesurer les gains zootechniques apportés par l'élevage en biofloc (survie, croissance, performances de reproduction et conséquence sur la qualité des larves) ;
- Etudier les interactions trophiques entre le milieu d'élevage biofloc et d'en évaluer le rôle sur les performances zootechniques rappelées supra.

1. Synthèse des résultats

1.1 Influence de l'élevage en biofloc sur la survie, la croissance et la reproduction de la crevette *Litopenaeus stylirostris*

Les expérimentations menées au cours de cette thèse ont mis en évidence des gains zootechniques notoires, grâce à la technique d'élevage en biofloc, aux niveaux de la survie, de la croissance, des performances de reproduction et de la qualité des larves produites.

Nos études avec les animaux juvéniles de *L. stylirostris* ont montré systématiquement des taux de survie plus importants dans les élevages en biofloc, comparés à ceux en eau claire : les gains étaient compris entre 45 et 136% selon les expérimentations. Ces résultats confirment l'effet bénéfique du biofloc sur la survie de la crevette en élevage qui avait déjà été maintes fois observé par différents auteurs avec la crevette *L. vannamei* et *Penaeus monodon* (Burford *et al.*, 2004 ; Azim et Little, 2008 ; Avnimelech, 2009 ; Xu et Pan, 2012). Par contre, nos études avec les animaux géniteurs nous ont permis de faire une première observation tout à fait originale ; en effet les crevettes issues des élevages en biofloc apparaissent mieux s'adapter aux stress de manipulation (transfert, ablation du pédoncule oculaire, insémination artificielle) durant leur reproduction en éclosier et voient ainsi leur survie en fin de cycle nettement supérieure à celle des reproducteurs provenant des élevages en eau claire. Ainsi, les géniteurs élevés en biofloc, même une fois sortis de leur milieu d'élevage, conservent une plus grande résistance que leurs congénères issus d'élevages en eau claire. La deuxième observation tout aussi originale est que cette qualité de résistance des géniteurs provenant des élevages en biofloc semble avoir été transmise à la progéniture. En effet, les survies des larves issues des femelles élevées en biofloc étaient de 37% et 51% plus élevées, respectivement aux stades zoé 2 et post larve 1, comparées aux larves provenant des femelles élevées en eau claire.

Outre les effets positifs sur la survie aux différents stades du cycle de vie de la crevette, l'élevage en biofloc stimule également la croissance des animaux. Toutes nos expérimentations menées avec des animaux juvéniles concordent et montrent une amélioration considérable de la croissance des crevettes élevées en biofloc comparées à celles maintenues en eau claire : les gains de croissance, dans notre cas, étaient compris entre 100 et 400%. Nos résultats confirment les nombreuses études réalisées sur le sujet montrant un effet bénéfique du biofloc sur la croissance des crevettes Pénéides (Browdy *et al.*, 2001 ; Burford *et al.*, 2004 ; Wasielesky *et al.*, 2006 ; Xu et Pan, 2012).

Par contre, avant nos travaux réalisés à Tahiti et en Nouvelle-Calédonie, aucune étude structurée n'avait été entreprise pour évaluer l'élevage en biofloc des géniteurs de crevette et les conséquences sur leur reproduction. C'est donc un sujet particulièrement novateur qui nous a permis de montrer, pour la première fois, une amélioration très significative de la reproduction de la crevette *L. stylirostris* élevée en biofloc comparée aux animaux provenant d'élevages extensifs traditionnels en bassin de terre ou d'élevage intensif en eau claire. Les améliorations de la reproduction des géniteurs produits en biofloc se traduisent par une augmentation significative du nombre et de la fréquence des pontes ainsi que du nombre d'œufs pondus et de nauplii produits.

Sur la base de l'ensemble de nos résultats zootechniques, nous pouvons donc affirmer que le biofloc exerce une influence bénéfique sur la survie, la croissance, la reproduction et la qualité des larves de la

crevette *L. stylirostris*. Afin d'expliquer ces gains zootechniques au commencement de ma thèse, nous avons émis deux hypothèses non exclusives l'une de l'autre:

(i) La première concernait la nutrition ; en effet quelques études (Tacon *et al.*, 2002 ; Azim et Little, 2008 ; Ju *et al.*, 2008b ; Avnimelech, 2009 ; Crab *et al.*, 2010a) avaient montré que les animaux élevés en biofloc se nourrissaient des particules en suspension dans la colonne d'eau et en obtenaient un complément de nutriments essentiels (acides aminés et acides gras, vitamines, oligo-éléments...) ainsi que des facteurs de croissance et de probiotiques.

(ii) La seconde hypothèse touchait au « bien-être » de l'animal. Le biofloc confèrerait un milieu plus stable et plus propice au confort physiologique de l'animal qui peut ainsi conserver et orienter l'énergie nécessaire à son développement et à sa reproduction. Il est reconnu en effet que l'énergie, que l'animal va utiliser pour s'adapter aux stress de son environnement, le sera au dépend de ses autres fonctions physiologiques avec de possibles conséquences délétères sur sa croissance et sa reproduction.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai fait le choix de travailler sur la première hypothèse qui répond à mon objectif initial d'étudier les interactions trophiques entre le milieu d'élevage en biofloc et d'en évaluer le rôle sur les performances zootechniques.

1.2 Relation trophique entre le milieu d'élevage et la crevette

Pour commencer ces études, nous avons montré que la productivité naturelle du biofloc entrainait pour 37 à 40% dans l'alimentation de la crevette juvénile. Ce complément significatif d'aliment naturel représente un apport d'énergie, de nutriments et de molécules bioactives (Moss et Pruder, 1995 ; Ju *et al.*, 2008b ; Crab *et al.*, 2010a) qui contribue très certainement aux meilleures croissances des animaux élevés en biofloc comparés à ceux élevés en eau claire. De plus, les particules de biofloc, contrairement aux granulés distribués uniquement aux heures du repas, sont constamment disponibles à la consommation par les crevettes. Et effectivement nous avons observé que l'activité et l'expression des gènes de deux enzymes digestives (trypsine et α -amylase) étaient en moyenne plus élevées chez les crevettes issues d'élevages en biofloc comparées aux animaux élevés en eau claire. Néanmoins, ces résultats ne s'appliquent pas, dans l'état, aux géniteurs pour lesquels nous n'avons pas quantifié la part de la productivité naturelle dans leur alimentation. Cela étant, chez les animaux reproducteurs, nous montrons très clairement que la productivité naturelle du biofloc représente une source nutritive en lipides particulièrement riche en phospholipides et en acides gras polyinsaturés tels que les acides arachidonique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque. Ces lipides sont retrouvés sous forme de triglycérides dans la glande digestive et sous forme de phospholipides dans les œufs. Or, nous connaissons l'importance de ces lipides lors de la vitellogénèse de la crevette et du développement larvaire (Cahu *et al.*, 1994 ; Xu *et al.*, 1994 ; Palacios *et al.*, 1998 ; Coman *et*

al., 2011) ; tout laisse donc penser que ce complément en lipides apporté par la productivité naturelle contribue aux meilleures performances de reproduction des géniteurs élevés en biofloc et aux meilleures survies de leur progéniture. Plus généralement, la littérature scientifique nous informe que ces différents lipides sont indispensables aux Crustacés d'une part pour leur croissance à toutes les étapes de leur cycle de vie et d'autre part pour certaines de leurs fonctions physiologiques et immunitaires (Kanazawa *et al.*, 1977; Kanazawa *et al.*, 1985 ; Chim *et al.*, 2001 ; Zuo *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2013).

Parallèlement à l'apport en lipides, nous montrons que la productivité naturelle est une source nutritionnelle en glutathion. Le glutathion, puissante molécule antioxydante, est considéré comme la première « ligne de défense » contre les attaques radicalaires et il est particulièrement effectif contre le radical hydroxyle (Bains et Shaw, 1997). Ce complément alimentaire en antioxydant naturel modifie très certainement les rapports d'équilibre des défenses antioxydantes des tissus de l'animal comme cela a été montré expérimentalement par l'équipe (Givaudan, 2008 ; Nicolini, 2011). Et effectivement, dans notre cas, les animaux élevés en biofloc comparés à ceux provenant d'élevage en eau claire ou en bassin de terre, outre une concentration plus élevée en glutathion, présentaient une plus forte capacité antioxydante (TAS) et un état moindre de stress oxydant caractérisé par une réduction de l'activité des enzymes anti-radicalaires (SOD, CAT, GPX) et un plus faible rapport glutathion oxydé/glutathion totaux. Nos résultats suggèrent ainsi le rôle joué par le glutathion apporté par la productivité naturelle dans le renforcement du système des défenses anti-radicalaires de la crevette au cours de son développement depuis les stades larvaires jusqu'à sa reproduction en passant par les juvéniles.

Les élévations parallèles, dans les tissus des crevettes élevées en biofloc, d'une part des acides gras hautement insaturés (AGHI) et d'autre part de la capacité du pouvoir antioxydant avec notamment une augmentation de la teneur en GSH, apparaissent cohérentes. En effet, les concentrations élevées en AGHIs des fractions lipidiques des tissus des crevettes issues du biofloc les rendent plus particulièrement sensibles à la peroxydation et doivent être protégées par des défenses anti-radicalaires adéquates. L'augmentation de la teneur en glutathion et de la capacité antioxydante globale semble associée à celle des AGHIs prévenant ainsi l'animal du stress oxydant : stress qui se définit comme un déséquilibre de la balance anti et pro oxydants en faveur des seconds. Thomson *et al.* (1992) ont obtenu des résultats similaires chez le rat où l'augmentation de la peroxydation des lipides correspondait à la diminution de la concentration en GSH.

Le complément d'aliment naturel apporté par le biofloc est composé d'un mélange de matières organiques et de microorganismes représentés très largement par des bactéries (Azim et Little, 2008 ; Crab *et al.*, 2010). Ces bactéries sont ingérées et influencent la flore intestinale de l'hôte ; nos résultats montrent en effet que le microbiote intestinal de la crevette reflète les communautés bactériennes présentes dans son milieu d'élevage. Or, ces bactéries peuvent coloniser ou être en transit dans le tube digestif de l'hôte et avoir

des effets bénéfiques sur sa santé en améliorant son équilibre intestinal, en contribuant à la digestion enzymatique, en inhibant les organismes pathogènes, en produisant des facteurs de croissance et en améliorant la réponse immunitaire et anti-radicalaire (Johansson et Söderhäll, 1985; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Vershuere *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2013, Xu et Pan, 2013b ; Tuyub *et al.*, 2014 ; Castex *et al.*, 2014). Le rôle des bactéries sur le microbiote de la crevette pourrait contribuer à la santé de l'animal et expliquer les meilleures survies des crevettes élevées en biofloc ; il expliquerait en particulier nos résultats faisant état d'une régulation positive de certains gènes impliqués dans l'immunité et les défenses anti-radicales des animaux issus des élevages en biofloc soumis à un stress oxydant standardisé.

La Figure V-1 synthétise l'ensemble de nos résultats et des hypothèses associées. Ainsi, les effets positifs de l'élevage en biofloc sur les survies à tous les stades de développement de l'animal, les croissances et la reproduction ont pour origine le complément d'aliment et en particulier les acides gras essentiels apportés par la productivité naturelle. Or, ces acides gras proviennent très probablement des micro-algues et de leurs prédateurs et non pas des bactéries (Meyers et Latscha, 1997 ; Zhukova et Kharlamenko, 1999). C'est pourquoi, sur la base de nos travaux, nous préconisons l'utilisation de biofloc mixotrophe pour l'élevage de la crevette *L. stylirostris* et en particulier pour le développement de la filière géniteur en Nouvelle-Calédonie.

2- Perspectives

Enfin, au terme de cette thèse, différents sujets de recherche peuvent être proposés à deux niveaux : (i) approfondir nos connaissances sur les interactions entre le milieu d'élevage et la crevette et ii) comprendre la dynamique de développement des populations microbiennes qui interviennent comme source nutritionnelle et filtre biologique de la qualité de l'eau. L'objectif *in fine* étant la maîtrise du système d'élevage en biofloc qui doit permettre la production garantie en quantité et qualité d'animaux destinés soit à la consommation soit à la reproduction.

2.1 Perspectives de recherche sur les interactions entre le milieu d'élevage et la crevette

Nos résultats montrent sans ambiguïté une relation trophique entre la crevette et son milieu d'élevage ; cette relation, et notamment l'apport en acides gras essentiels et en glutathion, a une forte influence sur la santé des animaux qui se traduit par des meilleures survies, une stimulation des défenses immunitaires et anti-radicales, des meilleures croissances et une meilleure reproduction. Il serait intéressant de poursuivre ces investigations afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et immunitaires mis en jeux. L'étude de la relation trophique entre le milieu d'élevage et l'animal peut aussi être réalisée à travers des études nutritionnelles en donnant à manger aux animaux du biofloc concentré. Ce genre d'études a été effectué sur des crevettes juvéniles et a permis de mettre en évidence un facteur de croissance dans le biofloc (Kuhn *et al.*, 2009, 2010). Il serait intéressant de faire des études équivalentes avec

les animaux reproducteurs et chercher à identifier les éléments nutritifs impliqués dans l'amélioration des performances de reproduction mise en évidence au cours de cette thèse.

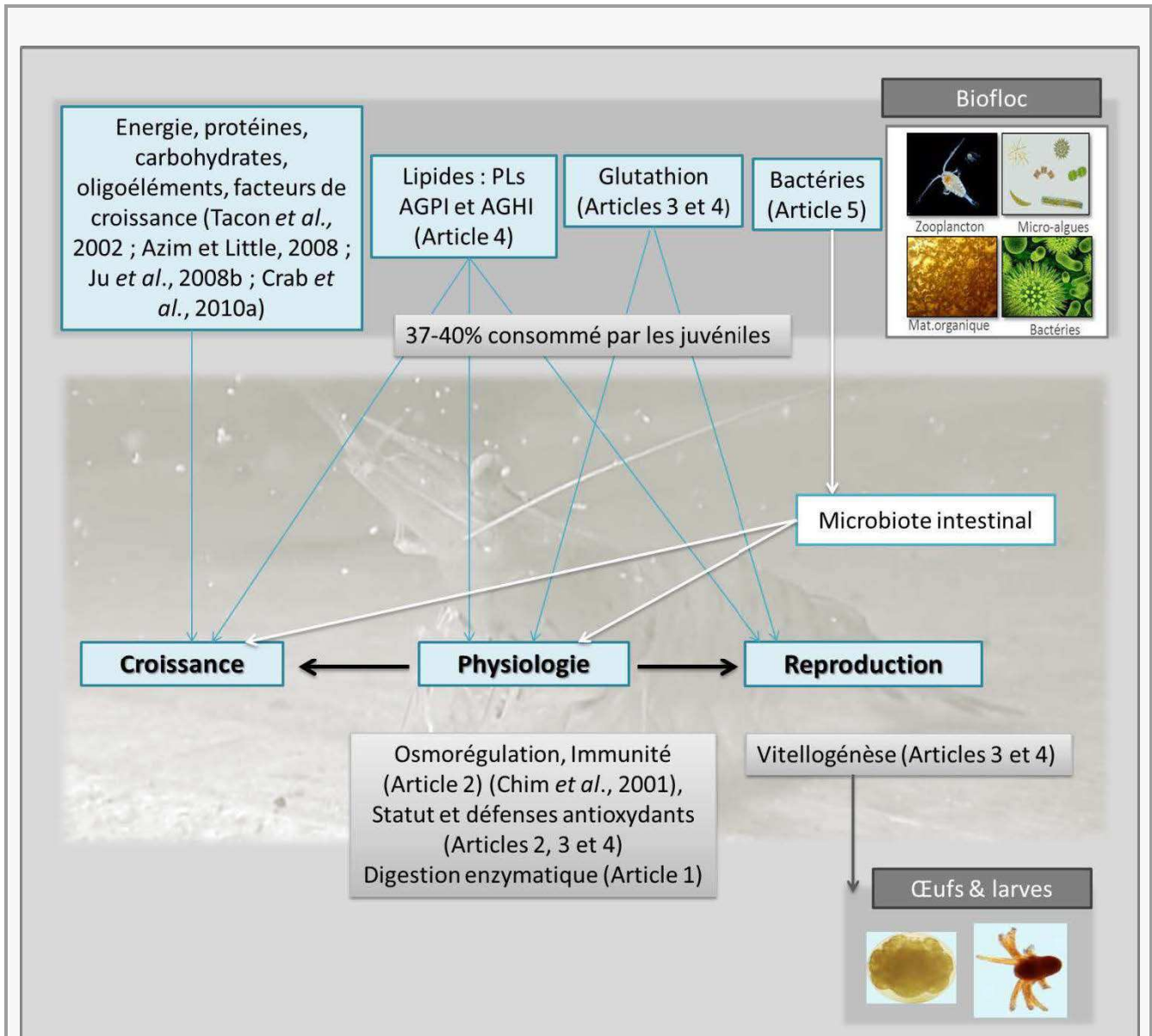


Figure V-1 : Influence de l'environnement trophique de l'élevage en biofloc sur les performances physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris*.

Le biofloc présente un environnement nutritif qui apporte à la crevette un complément alimentaire significatif. Ce complément d'aliment en suspension dans la colonne d'eau constamment disponible peut être consommé par l'animal à tout moment de la journée et de la nuit. L'aliment naturel du biofloc représente une source importante de lipides, en particulier de phospholipides et acides gras essentiels, qui jouent un rôle clef dans la croissance, la physiologie (osmorégulation et respiration, immunité) et la reproduction (vitellogénèse). Ces lipides accumulés dans les réserves de l'œuf au cours de la vitellogénèse interviennent de la même façon dans le développement embryonnaire et larvaire de la progéniture. Cette accumulation dans les tissus des acides gras polyinsaturés (AGHIs), particulièrement sensibles à la peroxydation, est associée à l'augmentation de la teneur en glutathion et des défenses anti-radicalaires prévenant ainsi l'animal du stress oxydant.

De plus, nous montrons au cours de cette thèse (Article 4) que les lipides présents dans les particules de biofloc jouent un rôle important dans la qualité des géniteurs. Nous admettons qu'ils ont une origine algale (biofloc mixotrophe). Mais il reste à voir si un biofloc hétérotrophe, c'est-à-dire essentiellement bactérien, donnerait les mêmes résultats au niveau des géniteurs et ainsi démontrer si oui ou non les acides gras sont les seuls responsables de ces améliorations. Si oui, nous préconiserons l'utilisation d'un biofloc mixotrophe. Si non, il serait intéressant de rechercher les autres « facteurs bioactifs » à l'origine de l'amélioration de la reproduction.

2.2 Perspectives de recherche sur les communautés bactériennes du milieu d'élevage et de la crevette

Dans la dernière partie de cette thèse (Article 5), nous montrons que le microbiote intestinal de la crevette reflète les communautés bactériennes présentes dans son milieu ; ceci ouvre plusieurs perspectives de recherches. Parmi celles-ci, nous proposerons deux sujets d'études : Le premier concerne la dynamique de développement des populations bactériennes au cours de l'élevage et le second s'intéresserait à la relation entre le microbiote du tractus digestif et la physiologie de la crevette.

Dynamique de développement des populations bactériennes - Les bactéries sont une composante fondamentale du biofloc et interviennent à trois niveaux : comme source nutritive, comme probiotique et comme « filtre biologique » en assimilant ou en transformant, par le processus de nitrification, les déchets azotés toxiques. Malgré les rôles clés joués par le compartiment bactérien dans le fonctionnement du biofloc, peu d'études ont été réalisées sur le sujet ; probablement pour des raisons méthodologiques basées sur des techniques microbiologiques difficiles et chronophages à mettre en œuvre. Avec les résultats de cette thèse, nous allons dessiner des amorces des principaux groupes bactériens du biofloc qu'il sera donc possible de quantifier par qPCR. L'outil que nous allons élaborer permettra donc d'envisager des recherches sur l'influence des conditions d'élevage (rapport C:N, salinité, biomasse d'élevage, lumière...) sur la dynamique des populations bactériennes du biofloc. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ces conditions d'élevage sur les autres micro-organismes présents dans un biofloc (micro-algues, zooplancton, champignons...). Par la suite, il faudrait définir une composition microbienne optimale correspondant à une bonne qualité de l'eau et à de bonnes performances zootechniques, et ainsi, établir des méthodes pour stabiliser ces communautés microbiennes telles que la fertilisation, les inoculums, l'ajout de probiotique... Ces études devraient aboutir à terme à la définition d'un protocole compréhensible d'élevage en biofloc où les rôles des micro-organismes sur la qualité de l'eau et comme source d'aliment seront maximisés.

Relation microbiote-physiologie de la crevette - Il est aujourd'hui reconnu que le microbiote du tube digestif peut être bénéfique au développement et à la physiologie de leur hôte en agissant sur l'absorption, la

réponse immunitaire et le développement épithélial (Harris, 1993). A l'inverse, différents facteurs de l'hôte comme l'alimentation, le stade de développement et l'état physiologique, peuvent influencer la composition du microbiote. Nous avons effectivement montré une influence des bactéries du biofloc, consommées par les animaux, sur celles du microbiote intestinal de la crevette *L. stylirostris*. Certaines bactéries du biofloc pourraient, une fois dans le tube digestif de l'hôte, avoir des propriétés probiotiques bénéfiques qui expliqueraient la meilleure santé (survie, réponse immunitaire et antiradicalaire) ainsi que les croissances et reproduction améliorées de la crevette *L. stylirostris* cultivée en biofloc. Cette hypothèse doit être évaluée par des études complémentaires pour comprendre les relations qui lient d'une part le compartiment bactérien du biofloc et le microbiote du tube digestif de l'hôte et d'autre part le microbiote avec l'hôte.

Bibliographie

A

- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol. 95, 129-137.
- Alonso-Rodriguez, R., Páez-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(1), 317-336.
- Angel D., Fiedler U., Eden N., Kress N., Adelung D. & Herut B., 1999. Catalase activity in macro-and microorganisms as an indicator of biotic stress in coastal waters of the eastern Mediterranean Sea. Helgoland Marine Research 53, 209–218.
- AQUACOP, Patrois, J., Barret, J., Mazurié, J., 1987. Intensive culture *P.vannamei* and *P.stylirostris* ; preliminary results presented at the 1987 WAS, Guayaqui.
- AQUACOP, Garen, P., 1993. Elevage intensif de crevettes Pénéides. Le point des techniques au COP. Rapport interne COP, DRV/AQ/TAH 92.018, 18pp.
- Arnold, S.J., Coman, F.E., Jackson, C.J., Groves, S.A., 2009. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. Aquaculture, 293(1), 42-48.
- Austin, D.A., Baker, J.A., 1988. Fate of bacteria ingested by larvae of the freshwater mayfly *Ephemera danica*. Microb. Ecol. 15, 323-332.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176(3), 227-235.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture, 264(1), 140-147.
- Avnimelech Y., 2009. Biofloc Technology : A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Avnimelech, Y., Kochba, M., 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using 15^N tracing. Aquaculture, 287(1), 163-168.
- Avnimelech, Y., 2013. Probiotic effect of biofloc technology: depression of tilapia infection by *Streptococcus*. Biofloc Technology and shrimp disease workshop, World Aquaculture Society, Ho Chi Minh City, 2013, Book of Abstract.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 283(1), 29-35.

B

- Babior, B.M., 1984. The respiratory burst of phagocytes. Journal of Clinical Investigation, 73(3), 599.

- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews*, 198(1), 149-168.
- Bains, J. S., & Shaw, C. A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25(3), 335-358.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., De Abreu, L., Wasielesky, J.W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquacult. Nutr.*, 16, pp. 163–172.
- Bauchau, A.G., 1981. Crustaceans. *Invertebrate blood cells*, 2, 385-420.
- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M.B., Wasielesky, Jr., Wilson, P., Luís, H.S., 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 342–343, 112–116.
- Becerra-Dorame, J.M., Martinez-Cordova, L.R., Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., López-Elías, J.A., Mendoza-Cano, F., 2012. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. *Aquaculture Research*.
- Bell, T. A., Lightner, D. V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology.
- Blancheton, J.P., Calvas, J., Michel, A.H., Vonau, V., 1987. Intensive shrimp breeding process. Brevet déposé à United States Patent. Patent number : 4,640,227.
- Brennan, C.A., Anderson, K.V., 2004. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 457-483.
- Browdy, C.L., Bratvold, D., Stokes, A.D., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. *Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp 20–34
- Browdy, C.L., Hargreaves, J., Hoang, T., Avnimelech, Y., 2014. *Proceedings of the Biofloc Technology and Shrimp Disease Workshop*. December 9-10, 2013, Ho Chi Minh City, Vietnam. The Aquaculture Engineering Society, Copper Hill, VA USA.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1), 393-411.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232(1), 525-537.

C

- Cahu, C.L., Guillaume, J.C., Stephan 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.

- Cahu, C., 2003. Les facteurs nutritionnels influençant la qualité des larves et post-larves de crevettes pénéides . In Styli 2003, trente ans de crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Goarant C., Harache Y., Herbland A et Mugnier C., éditeurs. Editions IFREMER 38 : 93-98.
- Castex, M., 2009. Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie (Doctoral dissertation, AgroParisTech).
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., & Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture, 294(3), 306-313.
- Castex, M., Daniels, C., & Chim, L., 2014. Probiotic Applications in Crustaceans. Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, 290.
- Ceccaldi, H.J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6 (Eds. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 261- 291. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., & Jiravanichpaisal, P., 2012. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. Microbial ecology, 63(4), 938-953.
- Chamberlain, G.W., 2010. History of shrimp farming. In the shrimp book, edited by Victoria Alday-Sanz, Nottingham, University press.
- Charniaux-Cotton H, Payen G., 1988. Crustacean reproduction. In: Laufer H, Downer RGH (eds). Endocrinology of Selected Invertebrate Types. Alan R. Liss, New York. 1988; pp. 279–303.
- 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?. Aquaculture research, 32(2), 91-94.
- Chim, L., Lucien-Brun, H., LeMoullac, G., 2002. Marine shrimp farming. Fisheries and Aquaculture: Towards Sustainable Aquatic Living Resources Management, in Knowledge for sustainable development. An insight into the Encyclopedia of Life Support Systems, UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, UK, Volumes II, 1059p.
- Chim, L., Goarant, C., Lemonnier, H., Mugnier, C., Wabete, N., Ansquer, D., Brun, P., Lemaire, P., 2008. Le syndrome 93 ou syndrome d'hiver. In Herbland A et Y Harache, coord. Sante de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, pp.15-31.
- Chim, L., Huber, M., Lemaire, P., Brun, P., Goguenheim, J., 2010. Floc culture system applied for intensive broodstock farming of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*: First trial carried out in New Caledonia. EAS Aquaculture Europe 2010. In book of abstract.
- Chim, L., 2011. Etudes éco-physiologiques de la crevette *Litopenaeus stylirostris* appliquées à son élevage commercial. Habilitation à Diriger des Recherches (HDR). Université de Nouvelle-Calédonie 117 pages
- Chu, C.P., Lee, D.J., 2004. Multiscale structures of biological flocs. Chemical Engineering Science, 59, pp 8-9.

- Cohen, J.M., Samosha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering*, 32, pp 425-442.
- Coman, G.J., Arnold, S.J., Barclay, M., Smith, D.M., 2011. Effect of arachidonic acid supplementation on reproductive performance of tank-domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 141-151.
- Conklin, D.E., 1997. Vitamins. Pages 123-149 In D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M.(Eds.). *Crustacean nutrition. Advances in world aquaculture 6*, WAS, LSU, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquac. Res.* 41, 559–567.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1643-1649.

D

- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *The ISME journal*, 2(1), 19-26.
- Della Patrona, L., Brun, P., 2008. L'élevage de la crevette bleue en Nouvelle-Calédonie. *Litopenaeus stylirostris*. Ifremer, Département LEAD (Laboratoire Ecosystème et Aquaculture Durable) en Nouvelle-Calédonie.
- Dempsey, A.C., Kitting, C.L. & Rosson, R.A., 1989. Bacterial variability among individual peneid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* 56, 267-278.
- De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N., Verstaete W., 2008. The basics of bioflocs technology : the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, pp 125-137.
- Deshimaru, O., Shigeno, K., 1972. Introduction to the artificial diet for prawn *Penaeus japonicas*. *Aquaculture*, 1, 115-133.
- Dimopoulos, G., 2003. Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. *Cellular microbiology*, 5(1), 3-14.

E

- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358.

- Ekasari, J., Azhar, M. H., Surawidjaja, E. H., Nuryati, S., De Schryver, P., & Bossier, P., 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish & shellfish immunology*.
- Eisen, A.Z.H., Kenneth, O., Jeffrey, J.J., Bradshaw, R.A., 1973. Collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*: purification and properties. *Biochemistry* 12 Flegel, T.W., 2007a., 1814-1822.
- Emerenciano, M., Cuzon, G., Goguenheim, J., & Gaxiola, G., 2012. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture Research*, 44(1), 75-85.
- Epp, M.A., Ziemann, D.A., Schell, D.M., 2002. Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research*, 33(11), 839-846.

F

- Fan, T., Zhang, Y., Yang, L., Yang, X., Jiang, G., Yu, M., Cong, R., 2009. Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152(2), 144-149.
- Focken, 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(1), 105-116.
- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 2012.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 2014.
- Feng, S. Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ*, 18, 153-168.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.

G

- Galgani, F. G., Y. Benyamin, and H. J. Ceccaldi. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) : a comparison with *Penaeus japonicus*. *Bate. Comp. Biochem. Physiol. B* 72, 355-361.
- Givaudan, N., 2008. Mise au point d'un stress oxydant standardisé et évaluation préliminaire du Levucell SB20 en tant que probiotique alimentaire chez la crevette *Litopenaeus stylirostris*. 6 mois - Rapport de stage de 2ème année AgroParisTech, 65 pp.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., 2001. A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, *Aquac. Nutr.* 7, 59-69.

- Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R., Marteau, A. L., 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture*, 169(3), 291-296.
- Goguenheim, J., Chim, L., 2009. Elevage des géniteurs de *Litopenaeus stylirostris* en système floc : synthèse bibliographique et protocole de production, Rapport IFREMER.
- Goguenheim, 2010. Confirmation de la technique d'élevage en biofloc pour la production de géniteurs *Litopenaeus stylirostris* en Polynésie française : Biofloc et reproducteurs. Tahiti Aquaculture 2010 « Aquaculture durable en milieu insulaire tropical ».
- Grassé, P.P., 1994. Traité de zoologie. Morphologie, physiologie, reproduction, systématique, vol. VII (Ed. Masson), Paris, Milan, Barcelone, 917p.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R., 1999. Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France, p. 489

H

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering* 34, pp 344-63.
- Hari, B., Madhusoodana Kurup, B., Varghese, J.T., Schrama, J.W., Verdegem, M.C.J., 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, 252(2), 248-263.
- Harris, J.M., 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial ecology*, 25(3), 195-231.
- 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.
- Herbland, A., Harache, Y., 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, 15-31.
- Hjelm, M., Riaza, A., Formoso, F., Melchiorson, J., & Gram, L., 2004. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and *Vibrionaceae* strains in a turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7288-7294.
- Holmblad, T., & Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1), 111-123.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Veld, J. H., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, 41(2), 85-101.
- Hopkins, J.S., Hamilton II, 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. *Journal of the World Mariculture Society* 24, 304-320.
- Hu, K.J., Leung, P.C., 2004. Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 137, 21-33.

Huber, M., Cardona, E., Fersing G., Lemaire P., Brun P., Maillez J.R., Broutoi F., Peignon J.M., Goguenheim J. , Chim L., 2010. Premiers géniteurs de *L. stylirostris* issus d'élevages hyper-intensifs en floc en Nouvelle-Calédonie : performances comparées avec les géniteurs des élevages traditionnels. Fiche biotechnique (2010-02): 3.

Hultmark, D., 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. Current opinion in immunology, 15(1), 12-19.

I - J

Imlay, J.A., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 240, 1302-1309.

ISEE, 2012. Pêche et aquaculture. Institut de la Statistique et des Etudes Economiques, num.18. Nouvelle-Calédonie TEC-2012.

Izvekova, G. I., 2006. Hydrolytic activity of enzymes produced by symbiotic microflora and its role in digestion processes of bream and its intestinal parasite *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). Biology Bulletin, 33(3), 287-292.

Jang, I. K., Pang, Z., Yu, J., Kim, S.K., Seo, H.C., Cho, Y.R., 2011. Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. BMC immunology, 12(1), 70.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, 211(4), 213-236.

Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J., 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. Water research, 29(7), 1639-1647.

Johansson, M. W., Söderhäll, K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. Journal of Comparative Physiology B, 156(2), 175-181.

Jory, D., Carbrera, T., 2003. Marine Shrimp, in Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants, John S.Lucas (Editor), Paul C. Southgate (Editor), Wiley-Blackwell, 512 p.

Ju, Z.Y., Forster, I.P., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C., David Horgen, F., 2008a. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research* 39, 118–133.

Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008b. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*, 14(6), 533-543.

K

Kanazawa, A., Teshima, S.I., Tokiwa, S., 1977. Nutritional requirements of prawn, 7: Effect of dietary lipids on growth. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan).

- Kanazawa, A., Teshima, S., Sakamoto, M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on the growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39–49.
- Kar, N., & Ghosh, K., 2008. Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1), 115-120.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., & Karunasagar, I., 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3), 203-209.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., Jang, I. K., 2013. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362-371.
- Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Lawrence, A.L., Marsh, L., Flick, G.J., 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture* 296, 51–57.
- Kuhn, D.D., Lawrence, A.L., Boardman, G.D., Patnaik, S., Marsh, L., Flick, G.J., 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 303, 28–33.
- Kureshy, N., Davis, A., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204, 125-143.

L

- Lee, P.G., Blake, N.J., Rodrick, G.E., 1980. A quatitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricult. Soc.* 11, 392-402.
- Lee, P.G., Meyers, S.P., 1997. Chemoattraction and feeding stimulation. In: L.R. D'Abramo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, Editors, *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture* vol. 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 292-352.
- 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(1-4): 307-317.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Ann.Rev. Physiol.* 68, 253-278.
- Le Vay, L., & Gamboa-Delgado, J., 2011. Naturally-occurring stable isotopes as direct measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture*, 315(1), 95-103.
- Ling, E., Yu, X.Q., 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(12), 1356-1366.
- Lightner, D. V., & Redman, R. M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1), 201-220.
- Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., & Li, Q., 2011. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture*, 317(1), 32-36.

Luo P, Hu C, Xie Z, Zhang L, Ren C, Xu Y, 2006. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in brackish water *Litopenaeus vannamei* culture system. J Trop Oceanogr 25: 49–53.

M

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., McKee, D.A., Horowitz, S., Horowitz, A., 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. Aquacultural engineering, 21(3), 215-227.
- Megahed, M. E., 2010. The effect of Microbial Biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus Semisulcatus*) fed with different crude protein levels. Journal of the Arabian Aquaculture Society, 5, 119-142.
- Meyers, S.M. Latscha, T., 1997. Carotenoids. In: Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture, Vol. 6 (D'Abramo, L.R.D., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M. eds., pp. 164–193. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Milton, D. L., 2006. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. International Journal of Medical Microbiology, 296(2), 61-71.
- Mishra, J.K., Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Gandy, R.L., Ali, A.M., 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* under limited discharge condition. Aquacultural engineering, 38(1), 2-15.
- Mohney, L. L., Lightner, D. V., & Bell, T. A., 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society, 25(1), 116-125.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 187(2), 175-191.
- Moss, S.M., Reynolds, W.J., Mahler, L.E., 1998. Design and economic analysis of a prototype biosecure shrimp grow out facility. In: Moss, S.M. (Ed.), Proceedings of the US Marine Shrimp Farming Program Biosecurity Workshop, 14 February 1998, Hawaii, United States. The Oceanic Institute, Hawaii, United States, pp. 5–14.
- Moss, M.S., Leamaster, B.R. & Sweeney, J. N., 2000. Relative Abundance and Species Composition of Gram-Negative, Aerobic Bacteria Associated with the Gut of Juvenile White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Reared in Oligotrophic Well Water and Eutrophic Pond Water. Journal of the World Aquaculture Society 31, 255-263.
- Moss, S.M., Arce, B.J., Argue, C.A., Otoshi, F., Calderon, R.O., Tacon, A.G.J., 2001. Greening of the blue revolution: Efforts toward environmentally responsible shrimp culture. Pages 1–19 in C. L. Browdy and D. E. Jory, editors. The new wave: proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., Bachère, E., 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61(7-8), 961-972.

N - O

Nicolini, M., 2011. Influence de l'élevage en floc sur les performances de reproduction et les défenses antioxydantes des géniteurs de la crevette *L. stylirostris* : étude du rôle des glutathions nutritionnels. Rapport de stage Ifremer.

Oka, M., 1969. Studies on *Penaeus orientalis* Kishinouye. VIII. Structure of the newly found lymphoid organ. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 35 (1969), pp. 245–250.

Otoshi, C.A., Scott, M.S., Naguwa, F.C., Moss, S.M., 2007. Shrimp behavior may affect culture performance at super-intensive stocking densities. Global Aquaculture Advocate, pp 67-69.

Ouellet, P., C.T. Taggart, K.T. Frank. 1992. Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 49: 368–378.

Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L. & McKay, D., 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. Journal of Applied Microbiology 93, 214-223.

P

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* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery. Aquaculture Research, 29(3), 183-189.

Peng S., Chen L., Qin J.G., Hou J., Yu N., Long Z., Ye J. & Sun X., 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Aquaculture 276, 154–161.

Pérez Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world (keys and diagnoses for the families and genera), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

Picchiatti, S., Fausto; A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Scapigliati, G., Abelli, L., 2008. Early treatment with *lactobacillus delbrueckii* strain induces rise in intestinal T cells and granulocytes and modulates immune related genes of larval *dicentrarchus labrax* (L.). Fish & ShellfishImmunology, doi: 10.1016/j.fsi.2008.10.008.

Phillips, D. L., & Gregg, J. W., 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. Oecologia, 127(2), 171-179.

R

- Ramirez, R. F., & Dixon, B. A., 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227(1), 417-426.
- Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms*, 56, 249-258.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soye, C., Van Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249, 181-198.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., VanWormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268, 47-67.
- Rosenberry, B., 2001. World shrimp farming 2000. *Shrimp News International* No. 13. Shrimp News International, San Diego, CA.
- Ruangpan, L., & Kitao, T., 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish diseases*, 14(3), 383-388.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N., 2013. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PloS one*, 8(4), e60802.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N., 2014. Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *PloS one*, 9(3), e91853.

S

- Sainz, J.S, García-Carreño, F.L., Córdova-Murueta, J.H., Cruz-Hernández, P., 2005. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326, 105-113. Sakata, T., 1989. Microflora of healthy animals. In: Austin, B., Austin, B.,
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191(1), 133-144.
- Saulnier, D., Reynaud, Y., Arzul, I., Miossec, L., Le Roux, F., Goarant, C., 2007. Emergence de maladies chez les organismes d'intérêt aquacole: quelques scénarios illustrés d'exemples. *INRA Productions Animales*, 20(3), 207-212.
- Schrader, K.K., Green, B.W., Perschbacher, P.W., 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquacultural Engineering*, 45(3), 118-126.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural engineering*, 32(3), 379-401.
- Shiau, S.Y., 1998. Nutrient requirements of penaeids shrimps. *Aquaculture* 164: 77-93.

- Shyne-Anand, P.S., Kohli, M.P.S., Kumar S., Sundaray, J.K., Roy, S.D., Venkateshwarlu, G., Sinha, A., Pailan, G.H., 2013. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.051.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 71-90.
- Söderhäll K.; Cerenius L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23–28.
- Souza, D. M., Suita, S. M., Romano, L. A., Wasielesky, W., & Ballester, E. L. C., 2014. Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system. *Aquaculture Research*, 45(2), 270-277.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Sugita, H., Takahashi, T., Kanemoto, F.I., Deguchi, Y., 1987. Aerobic bacteria flora in the digestive tract of freshwater shrimp *Palaemon paucidens* acclimated with seawater. *Nipp. Suisan Gakkaishi* 53, 511.

T

- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, O.E., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8(2), 121-137.
- Taw, N.P.D., 2013. Recent developments of biosecurity and biofloc technology. Nashville, Tennessee USA, Blue Archipelago Berhad, session 7.
- Teshima, S., 1997a. Phospholipids and sterols. In: D'Abramo, L.R., Editor, 1997. *Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture* 6, 85-107.
- Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Kanazawa, A., 1997b. Assessment of cholesterol requirements in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture Nutrition* 3, 247-253.
- Teshima, S.I., Kanazawa, A., Koshio, S., Horinouchi, K., 1989. Lipid metabolism of the prawn *Penaeus japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and and hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 92(1), 45-49.
- Thompson, K. H., Godin, D. V., & Lee, M., 1992. Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biological trace element research*, 35(3), 213-224.
- Treerattrakool, S., Panyim, S., Chan. S.M., Withyachumnarnkul, B., Udomkit, A., 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *FEBS J* 275: 970–980.
- Tzuc, J. T., Escalante, D. R., Herrera, R. R., Cortés, G. G., & Ortiz, M. L., 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*, 3(1), 280.

V

- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. Microbiological research, 158(4), 299-308.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and molecular biology reviews, 64(4), 655-671.
- Vinatea, L., Gálvez, A. O., Browdy, C. L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Shutler, A., Leffler, J. W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. Aquacultural engineering, 42(1), 17-24.

W

- Wabete, N., 2005. Etude écophysologique du métabolisme respiratoire et nutritionnel chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*: application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Wasielisky Jr, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258(1), 396-403.
- Wigglesworth, J.M., Griffith, D.R.W., 1994. Carbohydrate digestion in *Penaeus monodon*. Marine Biology 120, 571-578.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161.
- Wilén, B. M., Jin, B., Lant, P., 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. Water research, 37(9), 2127-2139.
- Wilson, K. H., & Blitchington, R. B., 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology, 62(7), 2273-2278.
- Wyban, J.A., Sweeney, J.N., 1991. The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii.

X

- 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(4), 359-370.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture, 356, 147-152.

- Xu, W. J., Pan, L. Q., Sun, X. H., & Huang, J., 2013. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 44(7), 1093-1102.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013a. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zeroexchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. *Aquaculture Research*.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2013b. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*, 412, 117-124.

Y-Z

- Yasuda, K., Kitao, T., 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 19, 229–234.
- Zimba, P.V., Camus, A., Allen, E.H., Burkholder, J.M., 2006. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeaster, USA shrimp facility. *Aquaculture*, 261, pp 1048-1055
- Zhang, S. P., Li, J. F., Wu, X.C., Zhong, W.J., Xian, J.A., Liao, S.A., Miao, Y.T, Wang, A. L., 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1131-1138.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, K., Yu, N., Zhou, Z., Chen, L., Du, Z. & Li, E., 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, 434, 449-455.
- Zhukova, N.V., Kharlamenko, V.I., 1999. Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 153–157.
- Zuo, R., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Xu, H., ... & Zhang, Y., 2012. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). *Fish & shellfish immunology*, 32(2), 249-258.