



# Evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia

Mathieu Castex

## ► To cite this version:

Mathieu Castex. Evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2009AGPT0017 . pastel-00005363

**HAL Id: pastel-00005363**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00005363>**

Submitted on 11 Sep 2009

**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.

N° /2009AGPT0017/

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Physiologie, Nutrition

*présentée et soutenue publiquement  
par*

**MATHIEU CASTEX**

**le 8 avril 2009**

**Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus  
acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*  
en Nouvelle-Calédonie**

*Directeur de thèse : Catherine MARIOJOULS*

*Co-directeur de thèse : Liêt CHIM*

*Travail réalisé à l' IFREMER, Département LEAD/NC, F-98846, NOUMEA*

Devant le jury :

|                                  |                                             |                   |
|----------------------------------|---------------------------------------------|-------------------|
| <b>Mme Chantal CAHU,</b>         | Directrice de recherche, IFREMER            | <b>Présidente</b> |
| <b>M. Joël GATESOUBE,</b>        | Ingénieur de recherche, INRA                | Rapporteur        |
| <b>M. David M. SMITH,</b>        | Directeur de recherche, CSIRO (Australie)   | Rapporteur        |
| <b>M. Eric CHEVAUX,</b>          | Responsable R&D, Lallemand Animal Nutrition | Examineur         |
| <b>M. Liêt CHIM,</b>             | Cadre de recherche , IFREMER                | Examineur         |
| <b>Mme Catherine MARIOJOULS,</b> | Professeur, AgroParisTech                   | Examineur         |
| <b>M. Jean Louis NICOLAS,</b>    | Cadre de recherche , IFREMER                | Examineur         |
| <b>M. Philippe SCHMIDELY,</b>    | Professeur, AgroParisTech                   | Examineur         |



## **REMERCIEMENTS**

Á l'ensemble du personnel de l'IFREMER,

Á la société LALLEMAND qui m'a permis de réaliser ce travail, et à Vincent Usache pour sa profonde confiance...,

Aux équipes du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés de Brest, et à l'ensemble de la délégation IFREMER de Nouvelle-Calédonie,

Á mes broussards préférés et autres Tahitiens que je n'oublierai jamais,

Á ma directrice de thèse, Catherine Mariojous, à Philippe Schmidely, et à mes chers professeurs de l'AGRO (mention spéciale au département des Sciences Animales),

Á ma chère équipe Écophysiologie : Pierrette Lemaire, Nelly Wabete, Dominique Pham et Liêt Chim,

Á Loïc...,

Á ma maman calédonienne, j'ai nommé Pierrette...,

Á tous les amis avec qui j'ai tant partagé durant ces trois années, Caldoches, Kanaks ou Z'oreilles,

Á vous Franck et Lydia qui m'avez tant supporté...,

Á ma famille et mes amis laissés en métropole,

A toi Florence, pour ton soutien, durant mes moments de profond désarroi,

Á toi Liêt, plus qu'un mentor, tu as été un véritable ami, parfois un père, qui a si souvent trouvé les mots justes...

Á mes chers parents, à ma sœur et à mon frère, sans qui je ne serai sûrement pas arrivé jusque là,

Et enfin, et surtout, à mes deux grand mères adorées qui auraient été si fières...

**Á TOUS, UN GRAND MERCI !!!**



*Chercher à connaître n'est souvent  
qu'apprendre à douter...*

*(Antoinette du Ligier de la Garde, Madame Deshoulières)*



# SOMMAIRE

## Index des figures

## Index des tableaux

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b> | <b>1</b> |
|--------------------------|----------|

|                                                                                                                |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>PREMIERE PARTIE : Les probiotiques en crevetticulture : état des connaissances et question étudiée.....</b> | <b>3</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|

|           |                                                                                                        |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I</b>  | <b>Contexte de la crevetticulture .....</b>                                                            | <b>5</b>  |
| I.1.      | L'aquaculture mondiale.....                                                                            | 5         |
| I.2.      | Contraintes du développement aquacole.....                                                             | 6         |
| I.3.      | La crevetticulture .....                                                                               | 7         |
| I.3.1.    | Situation de la production mondiale .....                                                              | 7         |
| I.3.2.    | Les systèmes d'élevage .....                                                                           | 9         |
| I.3.3.    | Gestion des maladies .....                                                                             | 10        |
| I.4.      | Le contexte de la production en Nouvelle Calédonie.....                                                | 13        |
| I.4.1.    | Données historiques.....                                                                               | 13        |
| I.4.2.    | Alimentation en bassin .....                                                                           | 16        |
| I.4.3.    | Problèmes sanitaires de la filière calédonienne .....                                                  | 17        |
| I.4.4.    | Programme de recherche IFREMER .....                                                                   | 18        |
| <b>II</b> | <b>Revue des travaux réalisés sur l'utilisation des probiotiques chez les crevettes d'élevage.....</b> | <b>20</b> |
| II.1.     | Introduction .....                                                                                     | 22        |
| II.2.     | Probiotic definition .....                                                                             | 23        |
| II.3.     | Probiotic applications to shrimps.....                                                                 | 24        |
| II.3.1.   | Probiotic for shrimp larvae and early post larvae stages .....                                         | 27        |
| II.3.2.   | Probiotic applications during grow-out stages.....                                                     | 30        |
| II.3.3.   | In vivo studies under pond conditions .....                                                            | 40        |
| II.4.     | Studied parameters and investigated modes of action .....                                              | 41        |
| II.4.1.   | Competitive exclusion .....                                                                            | 42        |
| II.4.2.   | Inhibition of virulence .....                                                                          | 46        |
| II.4.3.   | Stimulating the immunity of the host .....                                                             | 47        |
| II.4.4.   | Stimulation of growth and improvement of the nutrition of the host .....                               | 48        |
| II.5.     | Conclusions and perspectives .....                                                                     | 51        |





|                                                     |                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.6.                                               | References.....                                                           | 55         |
| III                                                 | Les modèles biologiques.....                                              | 63         |
| III.1.                                              | Les crevettes pénéides .....                                              | 63         |
| III.1.1.                                            | Présentation de l'espèce étudiée : <i>Litopenaeus stylirostris</i> .....  | 64         |
| III.1.2.                                            | Cycle biologique.....                                                     | 66         |
| III.1.3.                                            | Cycle de mue .....                                                        | 67         |
| III.1.4.                                            | Nutrition .....                                                           | 68         |
| III.1.5.                                            | Immunité et mécanismes de défense .....                                   | 96         |
| III.1.6.                                            | Le stress oxydant .....                                                   | 101        |
| III.2.                                              | Les bactéries lactiques : le cas de <i>Pediococcus acidilactici</i> ..... | 112        |
| III.2.1.                                            | Les bactéries lactiques et leur utilisation en agroalimentaire .....      | 112        |
| III.2.2.                                            | <i>Pediococcus acidilactici</i> : taxonomie et origine .....              | 115        |
| III.2.3.                                            | <i>Pediococcus acidilactici</i> : utilisation en agroalimentaire .....    | 119        |
| <b>DEUXIEME PARTIE : Matériels et Méthodes.....</b> |                                                                           | <b>125</b> |
| I                                                   | Démarche expérimentale et expérimentations réalisées .....                | 127        |
| II                                                  | La station expérimentale de Saint-Vincent.....                            | 132        |
| III                                                 | Pêche et stabulation des animaux .....                                    | 134        |
| III.1.                                              | Pêche et transfert .....                                                  | 134        |
| III.2.                                              | Dispositifs expérimentaux.....                                            | 135        |
| III.2.1.                                            | Bacs expérimentaux de la zone extérieure.....                             | 135        |
| III.2.2.                                            | Bacs thermo-régulés de la salle de maturation .....                       | 135        |
| III.2.3.                                            | Salles d'infection expérimentale.....                                     | 136        |
| III.2.4.                                            | Cages flottantes .....                                                    | 137        |
| III.3.                                              | Marquage individuel des crevettes.....                                    | 137        |
| III.4.                                              | Conditions de stabulation .....                                           | 139        |
| III.4.1.                                            | Protocole de transfert en bacs expérimentaux .....                        | 139        |
| III.4.2.                                            | Renouvellement d'eau .....                                                | 139        |
| III.4.3.                                            | Alimentation .....                                                        | 139        |
| III.5.                                              | Aliment expérimental .....                                                | 140        |
| III.5.1.                                            | Formulation et production .....                                           | 140        |
| III.5.2.                                            | Incorporation du probiotique .....                                        | 140        |
| IV                                                  | Analyses.....                                                             | 144        |
| IV.1.                                               | Détermination des stades de mue .....                                     | 144        |
| IV.2.                                               | Dissection et prélèvements .....                                          | 145        |
| IV.3.                                               | Traitement des échantillons pour les dosages biochimiques.....            | 146        |
| IV.4.                                               | Paramètres physiologiques .....                                           | 147        |
| IV.4.1.                                             | Dosage des protéines .....                                                | 148        |
| IV.4.2.                                             | Dosage du glucose et du glycogène.....                                    | 148        |
| IV.4.3.                                             | Dosage des activités des enzymes digestives .....                         | 149        |
| IV.4.4.                                             | Mesures des bio-indicateurs du stress oxydant.....                        | 150        |
| IV.4.5.                                             | Analyses microbiologiques et biologie moléculaire .....                   | 154        |



---

## **TROISIEME PARTIE : Les études réalisées.....162**

---

### **Premier chapitre : Détermination de la dose et des modalités d'administration du probiotique .....165**

---

#### **INTRODUCTION ..... 166**

#### **I Mesure de la stabilité de *P. acidilactici* dans l'aliment..... 167**

##### **I.1. Matériels et Méthodes ..... 167**

I.1.1. Stabilité du probiotique au cours du stockage. .... 167

I.1.2. Stabilité du probiotique après immersion dans l'eau de mer ..... 167

##### **I.2. Résultats et discussion ..... 167**

#### **II Article 1: Evaluation of the dietary probiotic *P. acidilactici* at two levels on shrimp *L. stylirostris* survival following a temperature drop at the low end of its thermopreferendum ..... 172**

#### **III Devenir de *P.acidilactici* MA18/5M dans le tractus intestinal de la crevette et influence sur la composition de la flore intestinale ..... 195**

##### **III.1. Matériels et Méthodes ..... 195**

III.1.1. Première série expérimentale..... 195

III.1.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P. acidilactici* sur la flore intestinale ..... 198

##### **III.2. Résultats et discussion ..... 199**

III.2.1. Première série expérimentale..... 199

III.2.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P. acidilactici* sur la flore intestinale ..... 208

#### **CONCLUSION..... 214**

---

### **Deuxième chapitre : Effet du probiotique *P.acidilactici* sur la croissance et la nutrition de la crevette *L. stylirostris* ..... 216**

---

#### **INTRODUCTION ..... 217**

#### **Article 2: Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* by using individual measurements and nested design ..... 218**

#### **Article 3: Effects of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth and nutritional status in shrimp *Litopenaeus stylirostris* based on a growth-ration size approach ..... 242**

#### **CONCLUSION..... 272**

---



**Troisième chapitre : Effets du probiotique *P.acidilactici* sur le statut antioxydant de *Litopenaeus stylirostris* et sur le stress oxydant induit par une infection bactérienne.....278**

---

INTRODUCTION..... 279

Article 4: Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status in *Litopenaeus stylirostris* shrimp ..... 280

Article 5: Effect of probiotic *P. acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge ..... 289

CONCLUSION..... 317

---

**Quatrième chapitre : Application des résultats expérimentaux à l'échelle pilote : évaluation des effets de *P.acidilactici* sur une ferme commerciale au cours d'un épisode de vibriose..... 321**

---

INTRODUCTION..... 322

Article 6: Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions ..... 323

Article 7: Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia..... 331

CONCLUSION..... 344

---

**QUATRIEME PARTIE : Conclusion générale.....346**

---

I Synthèse des principaux résultats..... 349

II Avancées relatives à la compréhension des mécanismes d'action de *P. acidilactici* chez *L. stylirostris*.....354

III Contribution au développement de l'additif Bactocell® en crevetticulture ..... 356

IV Perspectives..... 358

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....361**

---

---

**ANNEXES.....383**

---



## Index des figures

**Figure 1.1 :** Production mondiale des pêches et de l'aquaculture (hors baleines et algues), source FAO

*Worldwide production from aquaculture and fisheries (except whales and seaweeds), source FAO*

**Figure 1.2 :** Evolution comparée de la production mondiale de crevettes par les pêches et l'aquaculture.

*Comparative evolution of worldwide shrimp production from aquaculture and fisheries*

**Figure 1.3 :** Représentation schématique des différentes stratégies pour prévenir et contrôler les vibriosés sans utilisation d'antibiotiques.

*Schematic overview of different strategies to prevent and control luminescent vibriosis without using antibiotics.*

**Figure 1.4 :** Evolution de la production annuelle de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie parallèlement à l'évolution des surfaces cultivables.

*Annual evolution of aquaculture shrimp farming in New Caledonia and increase in cultivable surface*

**Figure 1.5 :** Vue aérienne de fermes aquacoles de Nouvelle Calédonie (les fermes de Péneide de Ouano, et de Seafarm).

*Aerial view of shrimp farms from New Calédonie (Farm of Péneide de Ouano and Seafarm)*

**Figure 1.6 :** Localisation des 19 fermes de production de crevette en Nouvelle-Calédonie, des 5 écloséries, des deux ateliers de conditionnement et des installations IFREMER.

*Location of the 19 shrimp farms in New Caledonia, the 5 hatcheries, both conditioning factories and IFREMER facilities.*

**Figure 1.7 :** Morphologie externe d'une crevette pénéide.

*External morphology of a penaeid shrimp*

**Figure 1.8 :** Cycle biologique des crevettes de mer.

*Biological cycle of marine shrimps\**

**Figure 1.9 :** Appareil digestif d'une crevette pénéide.

*Overview of the penaeid shrimp's digestive tract*

**Figure 1.10 :** Représentation détaillée d'un tubule de l'hépatopancréas de crevette pénéides.

*Detailed representation of a penaeid shrimp's digestive gland tubule*

**Figure 1.11 :** Diagramme schématique d'un tubule de l'hépatopancréas de *Penaeus semisulcatus*, indiquant les fonctions des cellules épithéliales pendant les différentes phases du cycle digestif.





*Schematic representation of a digestive gland tubule from Penaeus semisulcatus, indicating the functions of the epithelial cells during the various stages of the digestive cycle.*

**Figure 1.12 :** Schéma simplifié de l'hydrolyse des sucres complexes chez la crevette *L. vannamei*.

*Simplified schema of complex sugars hydrolysis in the shrimp L. vannamei.*

**Figure 1.13 :** Différents types d'association de la flore intestinale au niveau du tractus intestinal des invertébrés aquatiques.

*Various association reported between aquatic invertebrates and gut microbes*

**Figure 1.14 :** Interactions entre microorganismes au niveau du tractus intestinal.

*Micro organism's interactions within the digestive tract*

**Figure 1.15 :** Modèle d'action des peptides antimicrobiens chez les crevettes péneides.

*Model of action of the antimicrobial peptides in penaeid shrimps*

**Figure 1.16 :** Schéma général des défenses cellulaires mis en place contre les dommages induits par le stress oxydant.

*Schematic outline of cellular defences against oxidative stress-mediated cellular damage.*

**Figure 1.17 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie

*Free radicals and reactive oxygen species implicated in biological systems*

**Figure 1.18 :** Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences ribosomiques de l'ADN 16S positionnant l'espèce *Pediococcus acidilactici* parmi différentes espèces de bactéries lactiques.

*Phylogenic tree derived from 16S ribosomal DNA sequence with Pediococcus acidilactici and other lactic acid bacteria. The tree was created by the neighbour joining method*

**Figure 1.19 :** Exemple de halo d'inhibition observé en test d'antagonisme in vitro :

probiotique/*Vibrio harveyi*. P : *Pediococcus*, R : *L. rhamnosus*, F: *L. farciminis*, B: *Lb. B3G*

*Example of inhibitory zones observed with in vitro antagonism assay between probiotic/Vibrio harveyi. P : Pediococcus, R : L. rhamnosus, F: L. farciminis, B: Lb. B3G*

**Figure 1.20.** Schéma représentant les interactions complexes entre l'hôte (ici la crevette), sa microflore intestinale et le probiotique.

*Schematic overview of the different interactions between the host, its intestinal microbiota and probiotic bacteria.*

**Figure 2.1 :** Station expérimentale IFREMER de Saint Vincent

*Experimental station of IFREMER Saint-Vincent*

**Figure 2.2 :** Pêche des crevettes *L. stylirostris* dans les bassins de terre de la station expérimentale de Saint Vincent.

*Fishing of L. stylirostris in earthen pond at the experimental station of Saint-Vincent*

**Figure 2.3 :** Installations expérimentales utilisées lors des différentes études.

*Experimental dispositif used during the study*



**Figure 2.4 :** Marquage en position médio-dorsale sur le deuxième segment de l'abdomen de *L. stylirostris*

*Shrimp tagging by sub-cuticle injection of a coloured elastomer.*

**Figure 2.5 :** Concentration mesurée en *P. acidilactici* dans l'aliment expérimental après enrobage.

*P. acidilactici* concentration in the feed after coating

**Figure 2.6 :** Prélèvement d'hémolymph chez *L. stylirostris*.

*Hemolymph sampling in L. stylirostris*

**Figure 2.7 :** Dissection et prélèvement de la glande digestive et du tube digestif de *L. stylirostris*.

*Dissection and sampling of L. stylirostris digestive gland and gut*

**Figure 2.8 :** Résumé des protocoles de traitement des échantillons en fonction des paramètres mesurés

*Summary of homogenates preparation for the subsequent analysis of the biochemical parameters.*

**Figure 2.9 :** Principe simplifié de la DGGE.

*DGGE principle*

**Figure 2.10 :** Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) utilisé au cours de ce travail.

*Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) used during the study*

**Figure 3.1.** Stabilité de la concentration en *P. acidilactici* MA 18/5M dans l'aliment Bio-Optimal Start feed (Biomar S.A, Nersac, France) au cours de plusieurs mois de stockage à température ambiante

*Stability of P. acidilactici MA18/5M concentration in the commercial feed Optimal Start feed (Biomar S.A, Nersac, France) after several month of storage at room temperature*

**Figure 3.2.** Conformité et de l'homogénéité de l'enrobage du granulé expérimental

*Conformity and homogeneity of P. acidilactici coating on the experimental feed*

**Figure 3.3.** Stabilité de la concentration en *P. acidilactici* MA18/5M dans l'aliment crevette au cours du stockage.

*Stability of P. acidilactici MA18/5M concentration in the experimental diet after several days of storage*

**Figure 3.4.** Stabilité à l'eau de *P. acidilactici* MA18/5M dans l'aliment après immersion dans l'eau de mer.

*Stability of P. acidilactici MA18/5M concentration in the experimental diet once immersed in sea water*

**Figure 3.5.** Protocole expérimental de l'expérimentation sur la fréquence d'apport de *P. acidilactici*

*Experimental design of the P. acidilactici frequency of administration trial*



**Figure 3.6.** Cages flottantes dans un des bassins de la station expérimentale.

*Floating cages used in the ponds of the IFREMER experimental station*

**Figure 3.7.** Evolution de la concentration en *P. acidilactici* dans le tube digestif de crevettes 48 heures suivant un repas

*Concentration of P. acidilactici 48 hours after feeding within the shrimps' digestive tract*

**Figure 3.8.** Evolution de la concentration en *P. acidilactici* sur 24 heures dans le tube digestif de crevettes nourries à une fréquence de 2, 4 et 6 repas par jour.

*Daily evolution of P. acidilactici concentration within the shrimps' digestive tract after feeding at 2, 4 or 6 meals a day*

**Figure 3.9.** Concentration de la flore totale, de la flore vibrionacée et de *P. acidilactici* à différents niveaux du tractus intestinal : estomac, glande digestive et tube digestif

*Total flora, Vibrio sp. and P. acidilactici concentration in the stomach, digestive gland and gut of the shrimp*

**Figure 3.10.** Concentrations hebdomadaires comparées en *P. acidilactici* dans le tube digestif de crevettes nourries à une fréquence de 4 repas par jour et élevées en bacs expérimentaux et en cages flottantes dans un bassin d'élevage.

*Comparative weekly concentration of P. acidilactici in the digestive tract of shrimps fed four meals a day and reared in experimental plastic tanks or in floating cages in ponds*

**Figure 3.11.** Profil RAPD des souches de bactéries dominantes isolées à partir d'homogénat du tractus intestinal de crevettes mis en culture sur Marina agar et TCBS. Les crevettes provenaient d'un élevage en cages flottantes mené pendant 9 semaines dans un bassin de la ferme commerciale Seafarm.

*RAPD analysis of the dominant bacterial strains isolated from Marine agar and TCBS culture of digestive tract homogenates of shrimps reared over 9 weeks in floating cages in the commercial farm Seafarm*

**Figure 3.12.** Evolution de la température de l'eau de mer et de la croissance des crevettes élevées en bacs ou en cages flottantes au cours de la deuxième série expérimentale.

*Sea water temperature and growth of the shrimps reared in tanks and in cages during the second experimental series*

**Figure 3.13.** Exemple de profil des communautés bactériennes du tube digestif de crevettes obtenu après PCR-DGGE (gradient dénaturant 40\_80%) sur les échantillons obtenus dans les cages flottantes.

*Example of Denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE) of bacterial communities in floating cages reared shrimp gut samples. Amplified 16S rDNAs were separated on a gradient of 40–80% denaturant.*

**Figure 3.14** Profil des communautés bactériennes du tube digestif de *L. stylirostris* obtenu par PCR-DGGE (gradient dénaturant 40-80%) après trois et quatre semaines d'élevage en bacs expérimentaux.

*Denaturing gradient gel electrophoresis analysis (DGGE) of bacterial communities in tanks reared shrimp gut samples. Amplified 16S rDNAs were separated on a gradient of 40–80% denaturant.*



**Figure 3.15** Dendrogramme obtenus à partir de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S des bandes excisées sur gel d'électrophorèse (Méthode des plus proches voisins avec 500 bootstrap replicates)

*Dendrogram of the bacterial communities in shrimp gut samples obtained by the neighbor-joining analysis (500 bootstrap replicates) of 16S sequences from excised denaturing gradient gel electrophoresis bands*

**Figure 3.16.** Représentation schématique des différentes hypothèses formulées afin d'expliquer l'effet du probiotique sur l'efficacité alimentaire et la croissance des crevettes  
*Schematic overview of the hypothesis formulated in order to explain the probiotic effect on feed utilization efficiency and growth of the shrimps*

**Figure 3.17.** Scénario explicatif des effets mesurés de *P. acidilactici* sur la croissance, l'utilisation de l'aliment et la nutrition de *L. stylirostris*  
*Explanatory scenario of the recorded effects of P. acidilactici on growth and nutrition of L. stylirostris*

**Figure 3.18.** Représentation schématique des mécanismes hypothétiques conduisant aux effets mesurés de *P. acidilactici* sur la réponse de *L. stylirostris* à une infection bactérienne par *V. nigripulchritudo*.  
*Schematic overview of the assumed mechanisms leading to the probiotic effect of P. acidilactici on L. stylirostris response to bacterial infection by V. nigripulchritudo*

**Figure 4.1.** Schéma simplifié des interactions entre *L. stylirostris*, sa microflore intestinale et le probiotique *P. acidilactici* MA18/5M.  
*Schematic overview of the possible interactions between L. stylirostris, the intestinal microbiota and the probiotic P. acidilactici MA18/5M*

**Figure 4.2.** Scénario explicatif global des effets de *P. acidilactici* chez la crevette *L. stylirostris*.  
*Global scenario of the effects of P. acidilactici on the shrimp L. stylirostris.*





## Index des tableaux

**Tableau 1.1** : Typologie des différents systèmes d'élevage de crevettes.

*Various shrimp farming systems used worldwide*

**Tableau 1.2** : Exemples de maladies associées à des souches de vibrios pathogènes chez différents animaux aquatiques.

*Examples of aquatic animal's diseases associated to pathogenic vibrios strains*

**Tableau 1.3.** Propriétés thérapeutiques et prophylactiques des principaux probiotiques utilisés au cours d'essai cliniques chez l'homme.

*Various therapeutic or prophylactic properties of specific probiotics used in human clinical trials*

**Tableau 1.4.** Principales études publiées sur l'utilisation des probiotiques *in vivo* chez les crevettes d'élevage.

*Summary of in vivo studies published towards probiotics for shrimp aquaculture*

**Tableau 1.5.** Liste des microorganismes autorisés en nutrition animale établi par la directive Européenne 70/524/EEC.

*List of microorganisms authorized as probiotics in feedingstuffs under Council Directive 70/524/EEC*

**Tableau 1.6** : Principales enzymes digestives répertoriées chez les crustacés.

*Main digestive enzymes reported in crustaceans*

**Tableau 1.7** : Teneurs optimales en protéine de l'aliment chez différentes espèces de crevettes pénéides.

*Optimal levels of protein in feed for different penaeid shrimp species*

**Tableau 1.8** : Principales espèces de *Vibrio* isolées à partir du tractus intestinal des crevettes pénéides.

*Main Vibrio species isolated from the shrimp digestive tract of penaeid shrimps*

**Tableau 1.9** : Caractéristiques biochimiques de la souche *P. acidilactici* MA18/5M obtenues par galerie API 50 CH.

*Biochemical characteristics of P. acidilactici MA18/5M based onf API 50CH*

**Tableau 1.10** : Diamètre moyen du halo d'inhibition (cm) causé par différentes souches probiotiques sur des bactéries du genre *Vibrio*, pathogènes de crevettes.

*Mean diameter of the inhibitory zones caused by several probiotic species toward shrimp's pathogenic Vibrio species*

**Tableau 1.11** : Espèces de *Pédiocoques* généralement présentes dans les produits fermentés.

*Pediococci in fermented foods*



**Tableau 1. 12 :** Principaux travaux (publiés ou ayant fait l'objet de communication rapportant l'évaluation des effets de *P. acidilactici* MA18/5M utilisé comme probiotique alimentaire en nutrition animale.

*Main published studies on the evaluation of P. acidilactici MA18/5M used as dietary probiotic in animal nutrition*

**Tableau 2.1 :** Composition de l'aliment expérimental fabriqué au laboratoire de Saint-Vincent, Nouvelle-Calédonie

*Composition of the experimental diet made at Saint-Vincent laboratory*

**Tableau 2.2 :** Composition chimique, énergie brute (GE) et digestible (DE) de l'aliment commercial et expérimental (Laboratoire Saint-Vincent) utilisés au cours de notre étude

*Chemical composition, gross and digestible energy of the commercial and the experimental diet used during our study*

**Tableau 2.3 :** Tableau de synthèse des différentes expérimentations réalisées

*Summary of the experimental trials achieved during this thesis*

**Tableau 3.1.** Quantification comparée en *P. acidilactici* dans le contenu digestif seul et associé à la paroi intestinale

*Comparative quantification of P. acidilactici contained in the digestive tract content and associated to the gut*

**Tableau 3.2.** Proportion relative de *P. acidilactici* par rapport à la flore totale et vibrionacée dans le tube digestif trois heures après un repas

*Relative ratio of P. acidilactici concentration compared to total cultivable flora and Vibrio sp. in the shrimps' digestive tract three hours following a meal*



## INTRODUCTION

L'aquaculture a connu un essor important depuis ces dernières décennies, et est reconnue aujourd'hui comme l'une des activités de production animale ayant le plus fort potentiel de développement. Parmi les nombreuses espèces marines produites, les crevettes Pénéides tiennent une place très importante, se situant aux premiers rangs des échanges mondiaux de produits aquatiques issus de l'élevage. La croissance rapide de cette activité, associée à une intensification mal maîtrisée des systèmes de production, a cependant conduit à l'apparition de maladies, virales et bactériennes, qui sont aujourd'hui un véritable frein au développement de ce secteur. Dans ce contexte une des priorités de la recherche aquacole est la lutte contre ces pathologies.

En ce qui concerne la Nouvelle-Calédonie, le développement de l'élevage de la crevette a été amorcé dans les années 70 par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer). Bien que modeste à l'échelle mondiale, ce développement a fait de cette activité le deuxième secteur à l'exportation du pays. Les élevages de Nouvelle-Calédonie sont indemnes de maladies virales avérées mais d'importantes mortalités saisonnières, associées à des bactéries pathogènes, viennent affecter leur rentabilité. Ces mortalités ont été attribuées à des causes multifactorielles incluant l'atteinte par des vibrios pathogènes (Herbland et Harache, 2008).

Face à ce type de problème, observé dans le Monde dans les élevages de crevettes mais également dans ceux d'autres espèces aquacoles (programme MOREST<sup>1</sup>), il n'existe pas de solution unique mais plutôt un ensemble de mesures à mettre en œuvre conjointement. L'utilisation de probiotiques, microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé et la croissance de l'animal cible, constitue l'une de ces mesures.

Ainsi, la société Lallemand, dont l'un des métiers est le développement et la commercialisation de probiotiques chez les animaux terrestres, s'est intéressée depuis quelques années à l'évaluation de l'efficacité de ses produits en aquaculture (Gatesoupe et al., 2002 ; Aubin et al., 2005a, Chim et al., 2005). Parmi les produits concernés, le Bactocell<sup>®</sup>, constitué de la souche *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, est celui qui a fait l'objet de l'évaluation la plus poussée en aquaculture, notamment chez les Salmonidés. Plus récemment des travaux préliminaires ont montré des effets prometteurs sur les crevettes Pénéides (Lallemand, unpub.results ; Usache et al., 2004 ; Chim et al., 2005), et ont déterminé la Société Lallemand à poursuivre ses investigations .

Indépendamment, l'IFREMER de Nouvelle-Calédonie a mis en place le programme pluridisciplinaire DESANS<sup>2</sup> (2002-2006) afin de comprendre les maladies affectant les élevages calédoniens et proposer des solutions de sortie de crise. C'est ainsi que le projet d'évaluation du probiotique de la société Lallemand a trouvé toute sa place dans le programme de recherche du laboratoire IFREMER et qu'une collaboration a été établie, au travers d'une convention CIFRE, pour la préparation de la présente thèse de doctorat.

---

<sup>1</sup> **MOREST**, pour "MORtalités ESTivales d'huîtres" est un programme national de l'Ifremer dont l'objectif était d'étudier les facteurs responsables des phénomènes de mortalités qui touchent certaines années les zones conchylicoles, notamment pendant l'été.

<sup>2</sup> DESANS pour Défi Santé Stylirostris

### **L'objectif de ce travail était triple :**

- (1)** déterminer les bénéfices zootechniques apportés par *P. acidilactici*,
- (2)** évaluer ses effets sur la biologie de la crevette,
- (3)** proposer éventuellement, à l'issue de ces recherches, une application à l'échelle commerciale, afin notamment d'offrir une solution complémentaire dans la lutte contre les mortalités subies par la filière calédonienne.

Au début de ce travail de thèse, très peu d'informations étaient disponibles. Il nous a donc fallu mettre en place une démarche expérimentale en plusieurs étapes, permettant, sur une durée de trois années, d'atteindre nos objectifs. Dans une première étape nous nous sommes attaché à établir les modalités d'utilisation du probiotique en étudiant le devenir de celui-ci au sein du tractus intestinal de la crevette. Puis, au cours de l'étape suivante, nous avons évalué les bénéfices apportés à la crevette en terme de croissance, de transformation de l'aliment, et de résistance à une infection bactérienne, en menant parallèlement une étude de ses effets sur différents aspects de la physiologie de l'animal. Enfin, nous avons cherché à valider nos résultats de laboratoire à l'échelle pilote, dernière étape indispensable pour pouvoir envisager l'application de ce probiotique à l'échelle commerciale.

**PREMIÈRE PARTIE :**

**LES PROBIOTIQUES EN CREVETTICULTURE :  
ETAT DES CONNAISSANCES ET QUESTION  
ETUDIÉE**





# PREMIÈRE PARTIE :

## LES PROBIOTIQUES EN CREVETTICULTURE :

### ETAT DES CONNAISSANCES ET QUESTION ETUDIÉE

|               |                                                                                                        |            |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I</b>      | <b>Contexte de la crevetticulture .....</b>                                                            | <b>5</b>   |
| <b>I.1.</b>   | <b>L'aquaculture mondiale .....</b>                                                                    | <b>5</b>   |
| <b>I.2.</b>   | <b>Contraintes du développement aquacole .....</b>                                                     | <b>6</b>   |
| <b>I.3.</b>   | <b>La crevetticulture.....</b>                                                                         | <b>7</b>   |
| I.3.1.        | Situation de la production mondiale .....                                                              | 7          |
| I.3.2.        | Les systèmes d'élevage.....                                                                            | 9          |
| I.3.3.        | Gestion des maladies .....                                                                             | 10         |
| <b>I.4.</b>   | <b>Le contexte de la production en Nouvelle Calédonie .....</b>                                        | <b>13</b>  |
| I.4.1.        | Données historiques.....                                                                               | 13         |
| I.4.2.        | Alimentation en bassin .....                                                                           | 16         |
| I.4.3.        | Problèmes sanitaires de la filière calédonienne .....                                                  | 17         |
| I.4.4.        | Programme de recherche IFREMER .....                                                                   | 18         |
| <b>II</b>     | <b>Revue des travaux réalisés sur l'utilisation des probiotiques chez les crevettes d'élevage.....</b> | <b>20</b>  |
| <b>II.1.</b>  | <b>Introduction.....</b>                                                                               | <b>22</b>  |
| <b>II.2.</b>  | <b>Probiotic definition .....</b>                                                                      | <b>23</b>  |
| <b>II.3.</b>  | <b>Probiotic applications to shrimps .....</b>                                                         | <b>24</b>  |
| II.3.1.       | Probiotic for shrimp larvae and early post larvae stages.....                                          | 27         |
| II.3.2.       | Probiotic applications during grow-out stages.....                                                     | 30         |
| II.3.3.       | In vivo studies under pond conditions .....                                                            | 40         |
| <b>II.4.</b>  | <b>Studied parameters and investigated modes of action.....</b>                                        | <b>41</b>  |
| II.4.1.       | Competitive exclusion .....                                                                            | 42         |
| II.4.2.       | Inhibition of virulence .....                                                                          | 46         |
| II.4.3.       | Stimulating the immunity of the host.....                                                              | 47         |
| II.4.4.       | Stimulation of growth and improvement of the nutrition of the host.....                                | 48         |
| <b>II.5.</b>  | <b>Conclusions and perspectives.....</b>                                                               | <b>51</b>  |
| <b>II.6.</b>  | <b>References.....</b>                                                                                 | <b>55</b>  |
| <b>III</b>    | <b>Les modèles biologiques.....</b>                                                                    | <b>63</b>  |
| <b>III.1.</b> | <b>Les crevettes pénéides.....</b>                                                                     | <b>63</b>  |
| III.1.1.      | Présentation de l'espèce étudiée : <i>Litopenaeus stylirostris</i> .....                               | 64         |
| III.1.2.      | Cycle biologique.....                                                                                  | 66         |
| III.1.3.      | Cycle de mue .....                                                                                     | 67         |
| III.1.4.      | Nutrition .....                                                                                        | 68         |
| III.1.5.      | Immunité et mécanismes de défense.....                                                                 | 96         |
| III.1.6.      | Le stress oxydant .....                                                                                | 101        |
| <b>III.2.</b> | <b>Les bactéries lactiques : le cas de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....</b>                       | <b>112</b> |
| III.2.1.      | Les bactéries lactiques et leur utilisation en agroalimentaire.....                                    | 112        |
| III.2.2.      | <i>Pediococcus acidilactici</i> : taxonomie et origine .....                                           | 115        |
| III.2.3.      | <i>Pediococcus acidilactici</i> : utilisation en agroalimentaire.....                                  | 119        |



## I Contexte de la crevetticulture

### I.1. L'aquaculture mondiale

Selon le rapport SOFIA (FAO, 2006), la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture destinée à la consommation humaine était de 107 millions de tonnes en 2005. La pêche, tant marine que continentale, s'est caractérisée entre 2000 et 2005 par une stagnation des prises aux environs de 94 millions de tonnes, alors que sur la même période, la production aquacole (hors production d'algues) a connu une augmentation d'environ 35 %, passant de 35 à 48 millions de tonnes. Ainsi, l'aquaculture a compensé la diminution des captures de la pêche et permis de satisfaire l'augmentation de la demande liée à la croissance démographique. La contribution par habitant de l'aquaculture, qui était de 0,7 kg en 1970, a atteint 7,1 kg en 2004, soit une croissance annuelle moyenne de plus de 7%.

Aujourd'hui l'aquaculture poursuit sa croissance avec un taux annuel de 8,8 % par an depuis 1970, contre seulement 1,2 % pour la pêche et 2,8 % pour les productions animales terrestres. Cette activité fournissait, en 2005, 48 millions de tonnes d'animaux aquatiques (Figure 1.1), soit 45 % des apports mondiaux pour l'alimentation humaine, pour une valeur approximative de 70 milliards de dollars US. Il faut noter que les pays d'Asie et la région Pacifique contribuent à hauteur de 91,5 % à la production aquacole en volume et 80,5 % en valeur. La production chinoise, à elle seule, représente la majorité de la production mondiale (69,6 % en volume et 51,2 % en valeur).

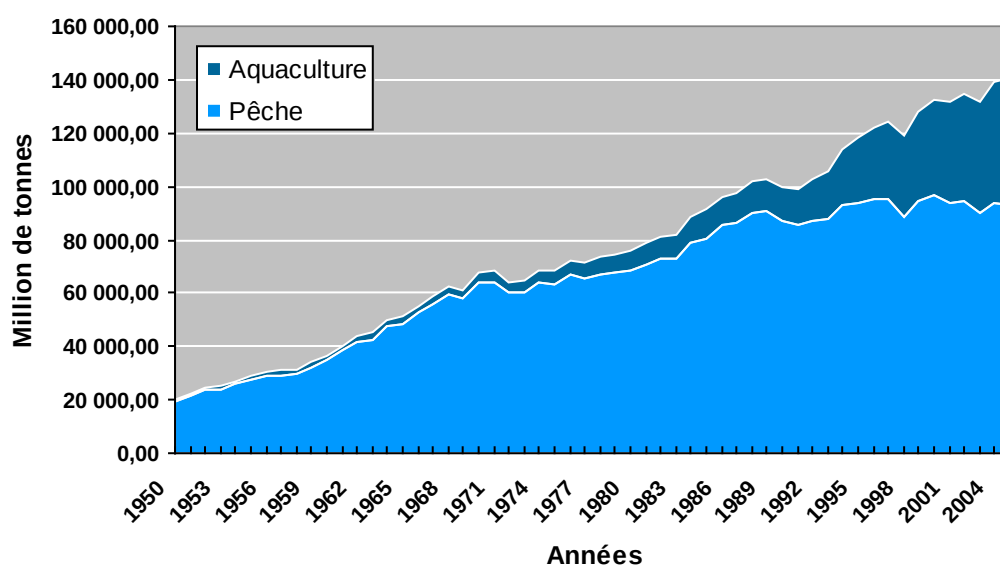


**Figure 1.1 :** Evolution comparée de la production mondiale de produits aquatiques par les pêches et l'aquaculture (FAO, 2006).

Le développement de l'aquaculture, toutes espèces confondues, poursuit sa croissance même si cette dernière est ralentie comparée aux années 1980 et 1990. Quoiqu'il en soit, l'aquaculture est reconnue comme l'activité ayant le plus fort potentiel de développement afin de satisfaire la demande croissante en produits d'origine aquatique. En effet, au rythme actuel de la croissance démographique mondiale, 40 millions de tonnes supplémentaires de produits aquatiques seront nécessaires d'ici 2030 pour maintenir les niveaux actuels de consommation individuelle. A ce titre, l'aquaculture constitue aujourd'hui un enjeu considérable et sa problématique de développement à l'échelle internationale doit désormais s'inscrire dans la durabilité.

## **I.2. Contraintes du développement aquacole**

Les systèmes aquacoles ancestraux, dont les origines étaient principalement en Asie et dans la zone Pacifique, se sont développés sur des modes intégrés, le plus souvent à l'échelle familiale, avec un impact limité sur l'environnement. Le développement de l'aquaculture à l'échelle commerciale, soumis aux lois du marché et associé à une élévation croissante des niveaux d'intensification, a marqué une rupture avec les modèles traditionnels. L'intensification des élevages a entraîné de fait un apport croissant d'intrants extérieurs aux zones de production, avec notamment l'introduction d'espèces exotiques, d'aliments composés, de produits chimiques (fertilisants, produits sanitaires, médicaments). L'ensemble de ces pratiques a conduit parfois à une dégradation accélérée des écosystèmes associés, avec des conséquences négatives tant au niveau de la durabilité des systèmes d'élevages qu'au niveau du développement régional avec son cortège de problèmes économiques et sociaux.

La FAO a décrit un ensemble d'effets néfastes de l'aquaculture intensifiée sur les écosystèmes, avec notamment :

- une pression croissante sur les pêches pour la fabrication de farines et huiles de poissons, principaux ingrédients entrant dans la composition des aliments destinés aux espèces carnivores,
- des modifications qualitatives et quantitatives des communautés benthiques,
- l'eutrophisation des lacs et/ou des zones côtières,
- la concurrence pour l'approvisionnement en ressources (en eau douce par exemple) conduisant, dans certains cas, à leur épuisement,

- la perturbation, voire la restructuration permanente des environnements biologiques et/ou sociaux,
- des effets négatifs liés à la fuite dans le milieu naturel des animaux domestiqués et/ou d'espèces étrangères,
- l'impact sur l'environnement et la santé humaine des produits chimiques utilisés pour le contrôle ou le traitement des maladies.

Les impacts négatifs de l'aquaculture, comme pour les systèmes de production terrestres, doivent rester dans les limites de la capacité d'accueil des écosystèmes et de l'acceptation sociétale. En conséquence et dans l'optique de pérenniser et de poursuivre le développement de l'aquaculture, il devient impératif de renforcer la réglementation et de permettre une meilleure gouvernance de ce secteur. Il est généralement admis que ce processus devra se réaliser avec la participation des producteurs à la prise de décisions et à la définition de la réglementation, l'objectif étant d'aboutir à une meilleure gestion de ces systèmes de production à travers l'autorégulation et l'utilisation de « bonnes pratiques d'élevages ». La poursuite de cet objectif passera inévitablement par un effort de recherche considérable, en vue notamment de développer des outils d'aide à la décision et de proposer des solutions durables pour le développement des filières aquacoles.

### **I.3. La crevetticulture**

#### **I.3.1. Situation de la production mondiale**

La production aquacole de Crustacés, principalement de crevettes marines, a connu une forte croissance à partir des années 1970 (Chim *et al.*, 2002). Entre 1970 et 2004, le taux de croissance annuel de ce secteur a été de 18,9 %, avec un pic dépassant 20 % dans les années 1970-1990. Les années 1990-2000 ont été marquées par un ralentissement de ce développement (9,1 %), essentiellement lié à l'apparition de maladies virales dans les principaux pays producteurs. Des illustrations en sont l'effondrement de la production à Taïwan en 1987-88, puis en Chine, en Indonésie, en Equateur, au Mexique, et en Inde dans les années 1993 à 1996, sous l'effet conjugué des virus WSSV (White Spot Syndrom Virus) et YHV (Yellow Head Virus). Ces maladies virales, leur dissémination et leur impact considérable sur la production font aujourd'hui l'objet d'une attention toute particulière. Des

mortalités significatives ont également été associées à des bactéries pathogènes aussi bien en phase larvaire qu'en phase de grossissement. La plupart de ces maladies sont causées par des bactéries appartenant au genre *Vibrio* : on peut citer *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo*, ou encore *V. damsela* (Lightner, 1998 ; De La Pena *et al.*, 1992 ; Song *et al.* 1993 ; Jiravanichpaisal *et al.*, 1994 ; Ishimaru *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997 ; Alday-sanz *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2004 ; Goarant *et al.*, 2006a).

La période 2000-2004 a été marquée par une reprise de la croissance de la production de Crustacés (croissance annuelle de 19,2 %), due principalement aux crevettes Pénéides. Ainsi la crevetticulture entre 2002 et 2004 a connu une croissance annuelle proche de 29 %, pour atteindre en 2005 un volume total de 2,6 millions de tonnes. La production par l'élevage fait aujourd'hui part égale avec la pêche (Figure 1.2).

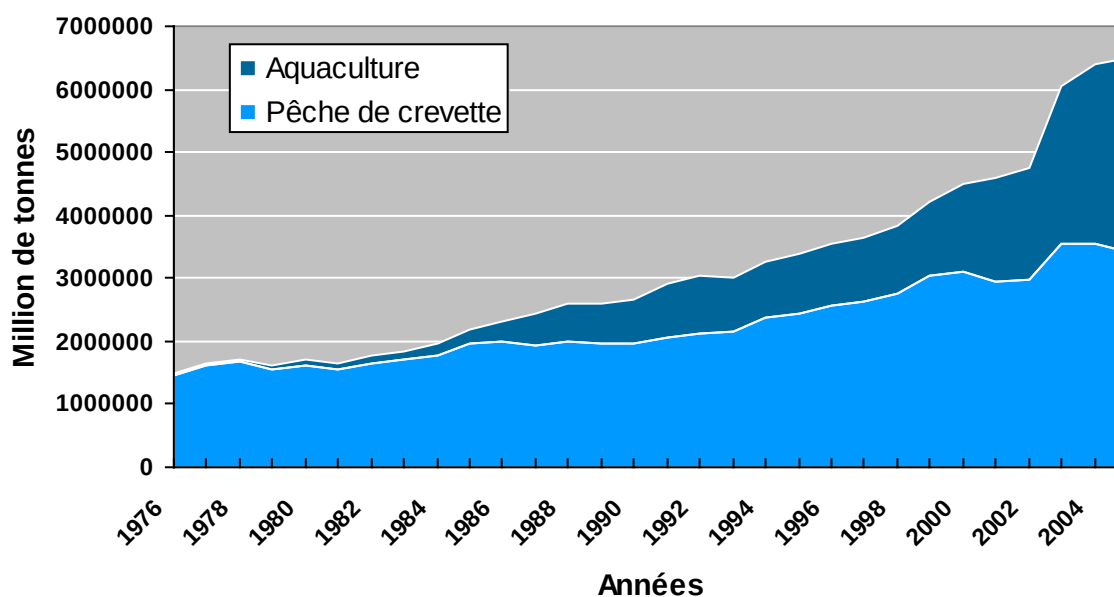


**Figure 1.2 :** Evolution comparée de la production mondiale de crevettes par les pêches et l'aquaculture (FAO, 2006).

En valeur, les crevettes issues de la pêche et 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 USA. La production aquacole de crevettes marines et dulçaquicoles est pratiquée dans plus de 60 pays, cependant elle est nettement dominée par les pays asiatiques et, dans une moindre mesure, l'Amérique Latine. La Chine se situe à la

première place des pays producteurs, suivie par la Thaïlande, l'Indonésie, le Vietnam, le Brésil, le Mexique et l'Equateur. En ce qui concerne les crevettes marines, la Thaïlande est le premier producteur mondial. Enfin, parmi les espèces de crevettes marines produites, plusieurs font l'objet d'élevage, mais trois dominant le marché et représentaient 86 % de la production mondiale en 2000 : il s'agit, par ordre d'importance décroissante, de *Litopenaeus vannamei*, de *Penaeus monodon* et de *Fenneropenaeus chinensis*.

### I.3.2. Les systèmes d'élevage

Il existe une gamme de différents modes de production, classés en fonction de leur niveau d'intensification et d'apport d'intrants, comme le montre la typologie présentée dans le tableau 1.1.

**Tableau 1.1** : Typologie des différents systèmes d'élevage de crevettes d'élevages (adaptée de Jory & Carbrera, 2003).

| Paramètres                                | Type de système        |                                          |                           |                                |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
|                                           | Extensif               | Semi-Intensif                            | Intensif                  | Super intensif                 |
| Unités de production                      | Bassin de terre        | Bassin de terre                          | de terre avec ou se       | Bassin liner                   |
| Surface                                   | 5-100 ha               | 2 à 30 ha                                | 0,5 à 1ha                 | 0,1 à 1 ha                     |
| Origine des post larves                   | Sauvage                | Sauvage ou éclosionerie                  | Eclosionerie              | Eclosionerie                   |
| Apport alimentaire                        | Productivité naturelle | Productivité naturelle + aliment composé | Productivité naturelle +  | Floc bactérien+aliment composé |
| Renouvellement                            | <5% jour               | 5-20% jour                               | 5-40% jour                | 2-5% jour                      |
| Fertilisation                             | non                    | oui                                      | parfois                   | non                            |
| Aération mécanique                        | non                    | Partielle ou nulle                       | Forte                     | Permanente                     |
| Utilisation énergétique (hp/ha)           | 0-2                    | 2-5                                      | 6-20                      | 20-60                          |
| Densité                                   | 1-5 PL.m <sup>-2</sup> | 5-25 PL.m <sup>-2</sup>                  | 25-120 PL.m <sup>-2</sup> | 120-1000 PL.m <sup>-2</sup>    |
| Main d'œuvre                              | <0.1.ha <sup>-1</sup>  | 0.1. ha <sup>-1</sup>                    | 0,4-2.ha-1                | 1-3.ha-1                       |
| Indice de conversion                      | 0.9-1.3                | 1.2-1.75                                 | 1.4-2.0                   | 1.4-3                          |
| Rendement par hectare                     | 50-500                 | 500-5000                                 | 5000-20000                | 20000-100000                   |
| Coût de production (\$.kg <sup>-1</sup> ) | 0.9-2                  | 2.5-5                                    | 5-8.5                     | ?                              |

L'élevage super-intensif a été développé dans les années 1980 et 1990 (Aquacop, 1987; Hopkins *et al.*, 1993 ; Sandifer & Hopkins, 1996). Cette technologie repose sur les flocs bactériens qui, outre le fait de contribuer à la minéralisation de la matière organique en excès,



constituent une part importante de l'apport alimentaire des animaux, permettant ainsi d'économiser l'aliment composé. Un tel système d'élevage nécessite une forte aération et un faible taux de renouvellement de l'eau. Ce système est considéré par de nombreux spécialistes comme l'avenir de la production aquacole mondiale (Rosenberry, 2004). C'est à Belize que se situe la ferme super-intensive la plus connue et la plus étudiée (Browdy *et al.*, 2001 ; Boyd & Clay, 2002 ; Burford *et al.*, 2004).

Enfin, malgré une tendance générale à l'intensification au cours de ces dernières années, les systèmes de production extensifs et semi-intensifs restent largement représentés. Des études ont par ailleurs montré la faisabilité de l'élevage de crevettes pénéides en cages flottantes (Paquotte *et al.*, 1998 ; Lombardi *et al.*, 2006). Ce dernier système est particulièrement adapté à une production à petite échelle au niveau de communautés villageoises car il ne nécessite pas d'investissements lourds et présente l'avantage de ne pas perturber l'environnement (Paquotte *et al.*, 1998).

### I.3.3. Gestion des maladies

Les rapports successifs de la FAO placent l'essor des maladies comme l'un des freins majeurs au développement de l'aquaculture. Les pertes annuelles liées à ces maladies sont estimées à 3 milliards de dollars US (Subasinghue *et al.*, 2001).

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 (WSSV<sup>1</sup>), la maladie de la tête jaune (YHV<sup>2</sup>), la baculovirose tétraédrique (*Baculovirus penaei*), la baculovirose sphérique (baculovirus spécifique de *Penaeus monodon*), et la nécrose hypodermique et hematopoiétique infectieuse (IHHNV<sup>3</sup>).

Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, les bactérioses constituent également un problème zoonitaire important en aquaculture de la crevette. Presque tous les animaux marins en élevage peuvent être atteints par ces bactéries, cependant les problèmes

---

<sup>1</sup> WSSV: White Spot Syndrome Virus

<sup>2</sup> YSH: Yellow Head Virus

<sup>3</sup> IHHNV: Infectious Hypodermic and Hematopoietic Necrosis Virus

paraissent exacerbés chez les crevettes Pénéides (Tableau 1.2). Les vibrioses lumineuses sont ainsi un problème majeur en élevage larvaire de crevettes en Amérique du Sud et en Asie, les mortalités les plus importantes étant imputables à *V. harveyi* (Robertson *et al.*, 1998; Austin et Zhang., 2006). A titre d'exemple, les pertes liées à ce type de pathologie dans les éclosiers indonésiens étaient de l'ordre de 100 millions de dollars US en 1991 (APEC, 2000). De plus, certains vibrios qui affectent les animaux d'élevage peuvent également être la cause de maladies chez l'homme comme c'est le cas pour *V. cholerae* et *V. vulnificus*.

**Tableau 1.2 :** Exemples de maladies associées à des souches de *Vibrio* pathogènes chez différents animaux aquatiques (Bergey, 2005)

| Maladies                       | Animal                                   | Espèces                             |
|--------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------|
| Maladie des points blancs      | Crevette                                 | <i>V. alginolyticus</i>             |
| Septicémie hémorragique        | Anguille, truite arc en ciel, Salmonidés | <i>V. anguillarum</i>               |
| Entérite                       | Mérou                                    | <i>V.harveyi</i>                    |
| Vibriose (larves et juvéniles) | Crevette                                 | <i>V. harvey</i>                    |
|                                | Crevette                                 | <i>V. penaeicida</i>                |
|                                | Crevette                                 | <i>V. nigripulchritudo</i>          |
| Brown spot disease             | Crevette                                 | <i>V. penaeidida</i>                |
| Brown ring disease             | Mollusques                               | <i>V. tapetis</i>                   |
| Maladies des larves            | Mollusques                               | <i>V. pectenocida, V. tubiashii</i> |

Traditionnellement, l'utilisation de traitements désinfectants et de traitements antibiotiques (principalement du type chloramphénicol, florfenicolgentamycine, triméthoprim, tiamulin, tétracyclines, quinolones et sulfonamides) ont permis de limiter, voire d'enrayer la plupart des infections bactériennes chez les espèces aquacoles. Holmström *et al.* (2003) ont rapporté ainsi que sur 76 éleveurs de crevettes interviewés, 56 utilisaient des antibiotiques. Moriarty (1999) estimait à 500-600 tonnes l'utilisation d'antibiotiques par les fermes de crevettes en Thaïlande en 1994. Selon les cas, l'utilisation de ces molécules est réalisée afin de traiter les animaux (antibiothérapie) lorsque la maladie a été diagnostiquée, ou dans un objectif de prophylaxie (antibioprévention) afin de prévenir une infection. L'utilisation de ces traitements a fortement été remise en cause, non seulement en aquaculture, mais également en santé humaine et en agriculture. En effet, l'utilisation massive des antibiotiques pour contrôler les maladies a entraîné une augmentation de la pression de sélection au sein des communautés bactériennes et a favorisé ainsi l'émergence de bactéries résistantes (World Health Organisation

antimicrobial resistance fact sheet, 2002). Outre le fait de rendre ce type de traitement inefficace, l'utilisation excessive des antibiotiques en aquaculture constitue aussi une menace directe pour la santé humaine et pour l'environnement (Angulo, 2000; Cabello, 2006). C'est pourquoi dans un souci de santé publique et afin d'inscrire cette industrie dans la durabilité, des efforts sont plus que jamais nécessaires pour promouvoir une utilisation raisonnée des antibiotiques en aquaculture et proposer de nouvelles stratégies de lutte contre les pathologies d'origine bactérienne.

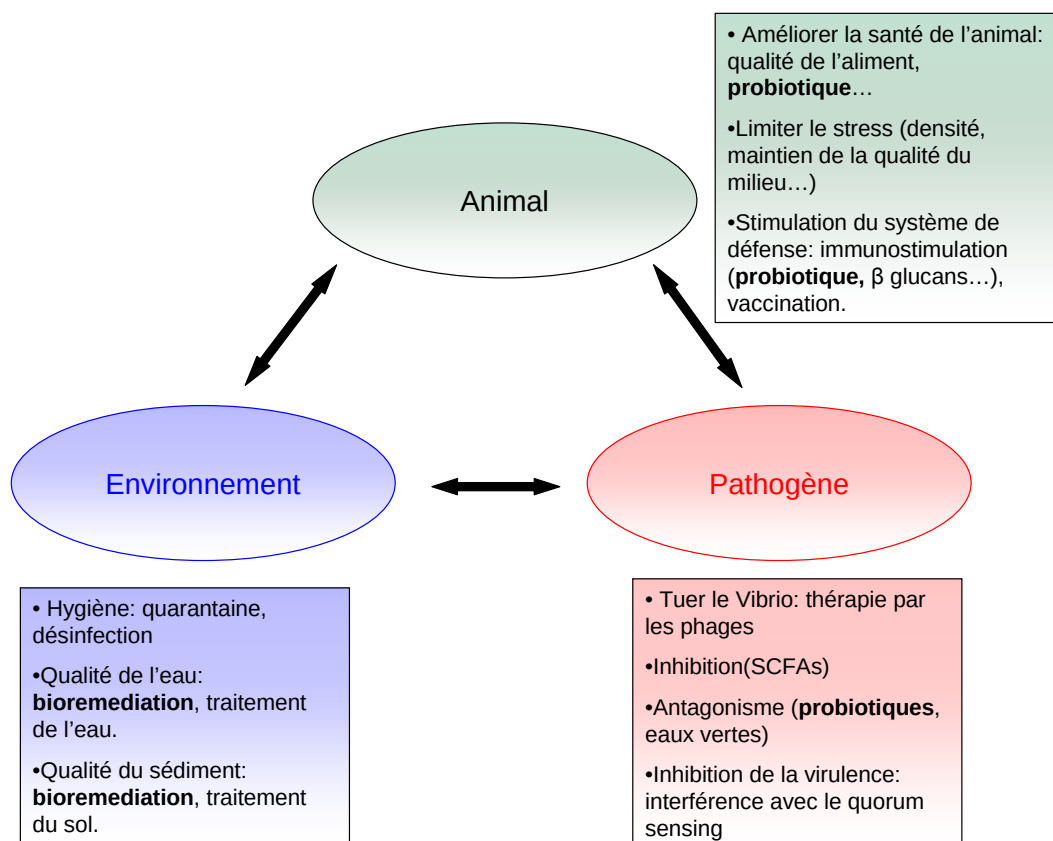


**Figure 1.3 :** Représentation schématique des différentes stratégies pour prévenir et contrôler les vibrioses sans utilisation d'antibiotiques. (D'après Defroidt *et al.*, 2007).

Ainsi, une approche globale, incluant les trois compartiments : l'environnement, l'animal et le pathogène, et s'inscrivant dans la notion de durabilité, a été proposée par Defroidt *et al.* (2007). Cette approche présente les différentes stratégies possibles, alternatives à l'usage des antibiotiques, pour contrôler les maladies d'origine bactérienne (essentiellement les vibrioses) à l'aide de mesures dites de « biocontrôle » (Figure1.3).

L'utilisation de microorganismes destinée à agir sur les différents compartiments : animal hôte, pathogène (concept probiotique) ou environnement (bioremédiation ou bioaugmentation), constitue une des stratégies possibles, faisant l'objet de cette thèse, et sera détaillée dans le chapitre II.

## **I.4. Le contexte de la production en Nouvelle Calédonie**

### **I.4.1. Données historiques**

En Nouvelle-Calédonie, l'aquaculture de crevettes a débuté dans les années 1970 avec l'appui du CNEXO, aujourd'hui IFREMER. L'espèce actuellement élevée, *Litopenaeus stylirostris*, a été importée du Mexique en 1972. Initialement, la production a été développée à titre expérimental par l'IFREMER avec l'implantation d'un seul site de production. C'est à partir de 1983 que la production commerciale a débuté. Dès lors, le développement a été rapide, passant d'une production de 16 tonnes, en 1983, à 2211 tonnes en 2004 pour une surface d'élevage de 650 ha (Figure 1.4). La production de crevettes est aujourd'hui la seconde production animale du pays; elle vient immédiatement après la production bovine, et elle représente le second secteur à l'exportation (loin derrière le nickel) pour un chiffre d'affaires de 22.7 millions d'Euros sur la campagne 2003/2004. La filière compte 5 écloséries, 19 fermes (de 11 à 130 ha), essentiellement de type « semi-intensif » (Figure 1.5), 2 usines de fabrication d'aliments et 2 usines de conditionnement. Cette activité représente plus de 1000 emplois dont plus de la moitié se situe en zone rurale, zone d'implantation des fermes de production (Figure 1.6). L'activité présente toujours un fort potentiel de développement, principalement dans la Province Nord où se situe la majorité des sites aménageables.

Cependant la filière a fait face au cours de ces dernières années à différents problèmes d'ordre techniques et économiques qui ont affecté son développement. Tout d'abord, l'intensification mal maîtrisée des systèmes d'élevage a conduit à l'émergence de maladies infectieuses d'origine bactérienne (voir paragraphe suivant). Parallèlement à ces problèmes d'ordre sanitaire, la filière de Nouvelle-Calédonie fait face à des problèmes économiques structurels et conjoncturels.

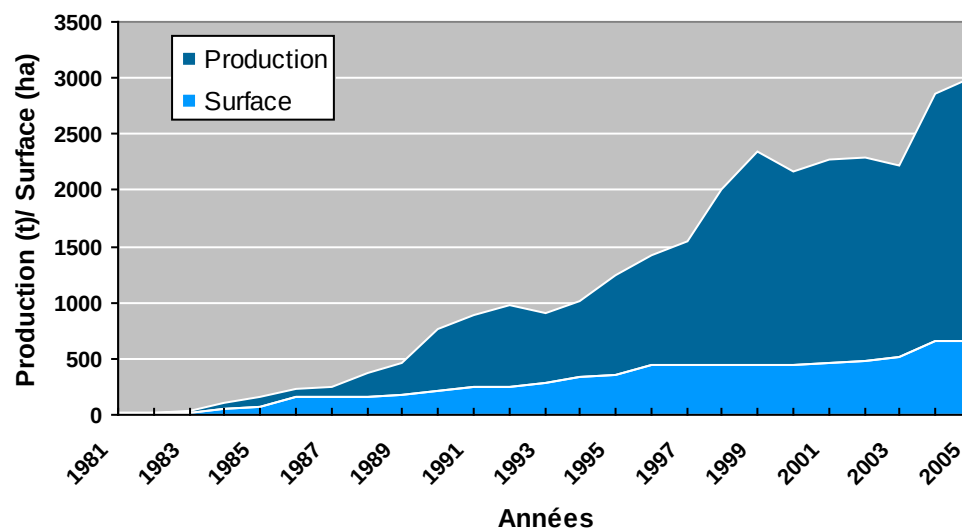


**Figure 1.4 :** Evolution de la production annuelle de crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie parallèlement à l'évolution des surfaces cultivables. (Source IFREMER/ GFA, 2006).



**Figure 1.5 :** A. Vue aérienne de la Ferme Aquacole Péneide de Ouano, 2005 (Source : zoneco). B. Vue satellite de la ferme Aquacole Sea Farm (Source : Google Earth).

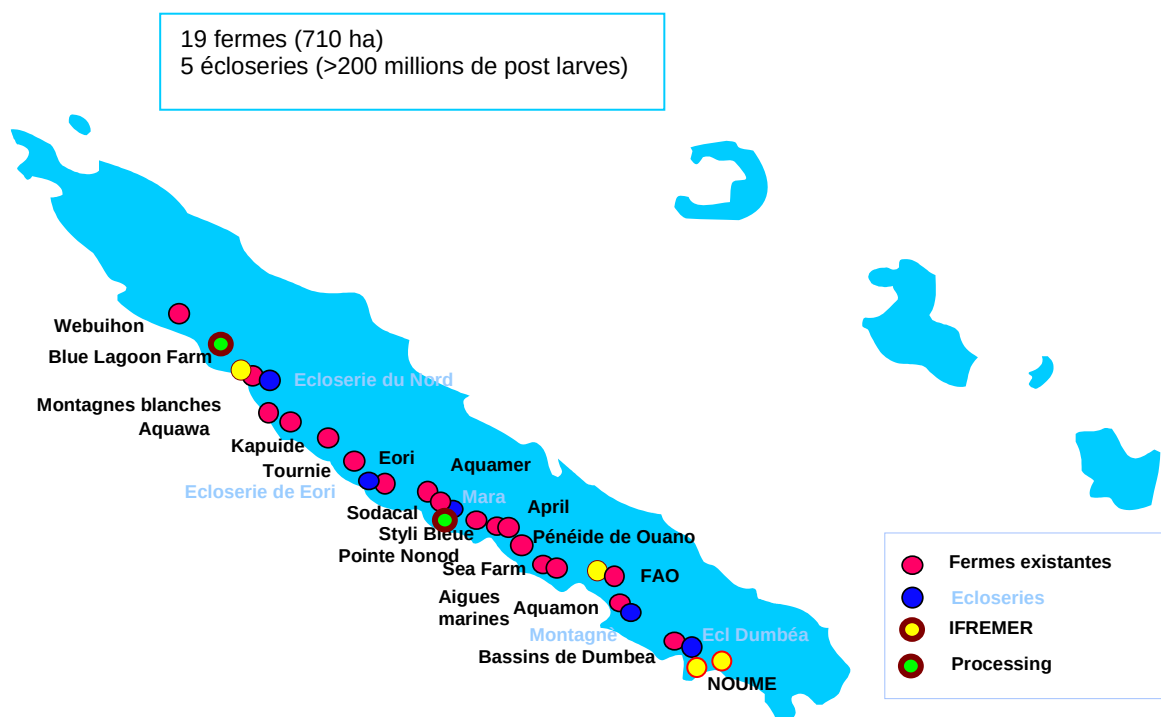


**Figure 1.6 :** Localisation des 19 fermes de production de crevette en Nouvelle-Calédonie, des 5 écloséries, des deux ateliers de conditionnement et des installations IFREMER (plus le centre administratif sur Nouméa).

Premièrement, l'augmentation des prix des matières premières et de l'énergie, couplée à des coûts de production déjà élevés en Nouvelle Calédonie, ont entraîné un manque de compétitivité de la filière par rapport aux grands pays producteurs d'Asie (Indonésie, Thaïlande, Inde...) et d'Amérique du sud (Brésil, Equateur, Argentine...).

Deuxièmement, la diminution des prix de la crevette d'élevage sur les marchés internationaux a eu des répercussions directes sur la commercialisation de la crevette calédonienne. Cela oblige la filière à viser des créneaux "haut de gamme" sur des marchés exigeants tel que le Japon, l'Australie et l'Europe, mais dans un contexte où la concurrence des productions émergentes (Brésil, Madagascar) est de plus en plus sévère. Une stratégie marketing axée sur des marchés de niche à haute valeur ajoutée apparaît aujourd'hui plus que jamais nécessaire. La qualité de la crevette de Nouvelle-Calédonie est en effet l'argument central mis en avant par la filière. Il apparaît évident que sa pérennisation passera obligatoirement par l'adoption de solutions techniques permettant de maintenir ce gage de qualité.

### I.4.2. Alimentation en bassin

Pour les filières crevetticoles semi-intensives comme celle de Nouvelle-Calédonie, l'élevage passe nécessairement par l'utilisation d'un aliment composé. Les aliments commerciaux destinés aux élevages sont composés d'un mélange de farines animales et végétales, d'huile de poisson et d'un complément en vitamines et en minéraux. La stabilité à l'eau de l'aliment est obtenue par un broyage fin des farines ( $< 500 \mu\text{m}$ ) et l'ajout de liants spécifiques. Les farines une fois mélangées subissent un traitement à la vapeur ( $> 80^\circ\text{C}$ ) avant d'être agglomérées, le plus souvent par pressage à sec, pour former des granulés cylindriques de 2 mm de diamètre et de 1-2 cm de long. Ces aliments industriels sont formulés à partir des besoins nutritionnels de la crevette qui ont été déterminés en conditions expérimentales plus ou moins contrôlées (Tacon, 1996). Ces besoins nutritionnels font, le plus souvent, l'impasse sur l'influence (i) des facteurs exogènes comme les variations physico-chimiques du milieu d'élevage dont notamment des changements de température en relation avec les saisons (Wyban *et al.* 1995), les pratiques d'alimentation et l'apport trophique endogène du bassin d'élevage (Tacon *et al.*, 2002) et (ii) des facteurs endogènes comme la phase de développement de l'animal. Les aliments commerciaux sont donc le plus souvent formulés par excès, ce qui peut poser des problèmes économiques et conduire à une pollution du milieu d'élevage.

En crevetticulture, l'estimation de la ration quotidienne est un exercice difficile qui repose beaucoup sur le savoir-faire de l'éleveur. La ration exprimée en aliment sec est un pourcentage de la biomasse des crevettes en élevage. Or, cette information dépend de la survie qui ne peut être connue avec exactitude pendant l'élevage. Pour déterminer la ration journalière, les fermiers se basent donc sur plusieurs indicateurs complémentaires : la survie estimée, le poids moyen des animaux, la vitesse de croissance et la consommation mesurée dans les mangeoires.

La ration diminue avec la taille des animaux et passe ainsi de 6 % chez les juvéniles (2 g de poids moyen) à 1,8 % chez les sub-adultes (22 g). Les éleveurs prennent en compte cette évolution en utilisant des tables de rationnement en fonction du poids moyen des animaux, estimé par des échantillonnages hebdomadaires. Cependant, la bonne utilisation de ces tables repose entièrement sur la justesse avec laquelle la taille de la population en élevage est

estimée. En Nouvelle-Calédonie, les élevages reçoivent 2 à 3 repas par jour et la répartition de l'aliment est faite par bateau de façon la plus uniforme possible sur la surface du bassin. Une bonne répartition est importante pour éviter l'excès de granulés non consommés par les crevettes en certaines zones du bassin.

L'indice de conversion de l'aliment (IC ou FCR) est le ratio de la quantité d'aliment distribué sur la biomasse de crevettes produite. L'IC moyen sur l'ensemble des élevages calédoniens pour la saison 2003/04 était de  $2,59 \pm 0,136$  ( $n = 65$ ). La production de 2214 tonnes de crevettes cette année-là avait donc nécessité 5750 tonnes d'aliment pour une valeur globale de 632 500 000 Fcp (5 315 126 €). L'indice de conversion des élevages calédonien est supérieur de 30 % à la norme internationale. Les causes de cet IC élevé peuvent être multiples et en interaction: milieu d'élevage délétère (sédiment réduit, hypoxie nocturne), zootechnie mal maîtrisée (préparation des bassins, densité d'élevage supérieure à la capacité de charge du système, mauvaise estimation de la biomasse...) et nutrition non optimisée (qualité inadéquate de l'aliment composé, faible apport trophique endogène du bassin). Pour pouvoir remédier à cet indice de conversion élevé, il est important de bien connaître, en conditions réelles d'élevage, les besoins énergétiques et nutritionnels des animaux. Cet objectif pourrait être atteint par des expérimentations associant deux outils développés au cours de cette thèse : la « méthode croissance-ration » qui permet de quantifier les besoins énergétiques et nutritionnels des animaux et la « méthode cages flottantes » qui permet d'expérimenter dans des conditions réelles d'élevage.

#### I.4.3. Problèmes sanitaires de la filière calédonienne: deux vibrioses saisonnières

La filière crevette de Nouvelle-Calédonie est indemne de toutes les grandes pathologies virales touchant les élevages de crevettes dans le monde. Le parvovirus IHNV est cependant présent sur le territoire, mais la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* SPR43, domestiquée à Tahiti et transférée en Nouvelle-Calédonie, y est résistante (Weppe *et al.*, 1993).

Il n'en est pas de même pour les pathologies bactériennes qui affectent la filière calédonienne. La première crise est apparue au cours de la saison fraîche 1993 où une pathologie



saisonnière, à caractère épizootique, a fait son apparition. Cette maladie, qui a reçu le nom de « Syndrome 93 » a été attribuée à la présence systématique d'une bactérie pathogène, *Vibrio penaeicida* (Costa *et al.*, 1998; Mermoud *et al.*, 1998 ; Lemonier, 2006). Cette maladie s'est vite répandue, touchant ainsi l'ensemble des fermes du territoire, et a conduit à l'abandon des élevages en saison fraîche (de mai à octobre) comme principale parade sanitaire. En 1997, au cours de la saison chaude, apparaissait sur une ferme de production (Sea-farm) une seconde pathologie bactérienne, à caractère épizootique. Cette maladie, baptisée « syndrome d'été », est aussi une vibriose, à caractère septicémique, dont l'agent étiologique est *V. nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006a et b ; Lemonier, 2006 , Reynaud, 2008). Depuis, deux autres fermes, une en 2003, l'autre en 2006, ont observé des épisodes de mortalité du même type.

#### I.4.4. Programme de recherche IFREMER

Des études préliminaires ont permis d'entrevoir une cause multifactorielle à ces deux maladies répondant au schéma théorique proposé par Snieszko (1973). Le développement de ces deux maladies résulterait de l'interaction de différents facteurs concernant à la fois les conditions environnementales du bassin (découlant des pratiques culturelles, de la saison et de la météo), la présence et la virulence des pathogènes, et l'état physiologique des crevettes (Herbland et Harache, 2008).

Un programme multidisciplinaire à 4 ans a donc été mis en place par l'IFREMER en 2002. Il s'agit du programme DESANS, pour Défi Santé Stylirostris, au cours duquel des actions de recherche croisées ont été menées dans les différents compartiments impliqués : écosystème bassin – hôte - pathogène (Herbland et Harache, 2008).

##### **Le programme DESANS s'est organisé autour de deux grands volets :**

- compréhension des processus à l'origine des maladies: il s'agissait ici de construire des scénarii de l'enchaînement des interactions conduisant au déclenchement des deux maladies,
- proposition de solutions concrètes qui, appliquées en interaction selon une certaine hiérarchisation, devaient permettre d'éviter le déclenchement des syndromes, et donc d'améliorer les performances des élevages tout en assurant leur durabilité.

C'est dans le cadre de ce deuxième volet dit de « sortie de crise » que ce travail de thèse a été réalisé. En effet, depuis quelques années, une stratégie prometteuse, et aujourd'hui de plus en plus répandue en élevage de crevettes, consiste en l'utilisation de microorganismes probiotiques afin d'améliorer la santé des animaux et de fait leurs performances zootechniques (Farzanfar, 2006). La définition du concept probiotique, les différentes utilisations de ces microorganismes en aquaculture et les modes d'action mis en jeu par ce type de traitement sont détaillés dans le chapitre suivant.

## **II Revue des travaux réalisés sur l'utilisation des probiotiques chez les crevettes d'élevage**

Le rapide développement de l'aquaculture, son intensification, et l'apparition de crises sanitaires sur les élevages ont, comme mentionné précédemment, encouragé la recherche à développer des solutions, alternatives aux antibiotiques, afin d'enrayer les maladies. C'est dans ce cadre que l'utilisation des probiotique, qui concernaient originellement l'homme et les animaux d'élevage terrestres, s'est, dès le début des années 1980, élargies aux animaux aquatiques. Les premières études chez les poissons ont montré des résultats prometteurs qui ont entraîné de nombreuses recherches sur le sujet. Ces recherches ont généralement eu pour objet de sélectionner des souches probiotiques à partir du milieu d'élevage et d'évaluer leur bienfaits sur la survie et la croissance des animaux cibles. Parallèlement à ces recherches, de nombreuses applications, plus ou moins empiriques, du concept probiotique ont été réalisées, ce qui a notamment permis de faire connaître très largement ce concept en aquaculture.

L'objectif de ce chapitre, présenté sous la forme d'un article de synthèse destiné à être publié, est de faire un état des lieux des travaux de recherche et des applications des probiotiques en aquaculture et particulièrement en élevage des crevettes marines. Il est à noter que cette synthèse bibliographique a été réalisée en fin de thèse et intègre donc les résultats des recherches les plus récentes, et notamment deux publications de nos travaux accomplis dans le cadre de ce doctorat.

## **Shrimp and probiotics: a review**

Mathieu Castex,

Key words: shrimp, probiotic, aquaculture, biocontrol, growth

### **Abstract**

Shrimp aquaculture is today facing challenges in order to increase production yield and sustain its development. With increasing demand for environmental friendly aquaculture, new solutions involving technologies and sciences such as biotechnology and microbiology are currently being developed to reach this goal. The use of probiotics in aquaculture has shown promising results and is now widely accepted as a complementary tool for an alternative management of disease and an improvement in nutrition of aquatic animals. This review presents a summary of research towards probiotics in shrimp aquaculture with special references to applications and investigated modes of action. Limits and future perspectives are also addressed. Conclusions highlight that the probiotic concept is still controversial in aquaculture and that more in-depth studies, especially to increase our knowledge of the mechanisms of action involved and of the intestinal microbiology of the hosts, are essential to optimize and develop future applications.

## **II.1.Introduction**

Today aquaculture represents a significant source for world aquatic products, representing a market value estimated to US\$78 billion. Furthermore, the diminution of natural stocks of aquatic species and the current increase in demand for aquatic products will directly favour the development of the aquaculture sector. The remarkable development achieved in the aquaculture industry over the last 30 years has been made possible thanks to intensification and globalization of the seafood trade. However, the increase in productivity has been accompanied by increased exposure of the farm animals to stressful conditions together with the emergence of ecological impact. The problems related to diseases and to the deterioration of the environmental conditions are today major concerns within the aquaculture industry and represents key challenges for the future of this sector.

Emergence and development of diseases have been considered as the main limiting factors in the aquaculture sector with economic losses estimated to US\$3 billion (Subasinghe et al., 2001). The control and the prevention of diseases, especially those of bacterial origin, were done through the use of veterinary products such as antimicrobial agents. Antibiotic products were also used as growth promoting agents. However, behind the lack of sustainability and the sanitary concerns over the use of such chemicals largely highlighted by the scientific communities, restriction of their use is today more and more adopted by governments and farmers organisations. According to the World Health Organisation, it is of urgent need to reduce the overuse and the inappropriate use of antimicrobials. As a consequence, the European Union (EU) has implemented in 2005 a ban on the use of all non-therapeutic antimicrobials in animal production, and the US would probably adopt similar regulations (Anadón, 2006).

From this statement, the development of modern technologies based on biotechnology and microbiology in order to propose alternative solutions to limit disease losses and to sustain high productivity levels within aquaculture systems is of central importance, especially for shrimp farming. Several solutions, based on genetic selection, development of vaccines, or improved nutrition, have been proposed or are currently under evaluation for the aquacultured species. These solutions are complementary and their combination would offer promising perspectives. An edifying example is the eradication of antibiotic use within the Norwegian

salmon industry, with a drop from 50 metric tones to less than 1 tonne annually from 1987 to 1997 while the salmon production increased more than 10-fold over the same period. This result being mainly due to the development of effective vaccine in association with other improvements in farming practices, genetics and nutrition (Lunestad, 1998). The use of probiotics as “biofriendly agents” which control and prevent pathogens, and/or favour growth through a variety of mechanisms, is viewed as one of these solutions.

## **II.2. Probiotic definition**

The term probiotic literally means “for life”, originating from the Greek words “pro-bios”. Even if the original idea was concerned by the Russian Nobel Prize winner Metchnikoff (1907), the first probiotic concept has been referred to substances secreted by one microorganism which stimulates the growth of another (Lilley and Stillweel, 1965). Later, Parker (1974) formulated the modern concept of probiotic defined as “organisms and substances which contribute to intestinal microbial balance”. Since then, this definition has been challenged by many others, and there is still debate and controversies around the most accurate definition.

The most referred to definition is the one given by Fuller in 1989 who defined probiotic as “a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal balance”. According to this definition, probiotics can be only strictly classified as feed additives. However, other authors successively modified the definition, sometimes motivated by the extension of the probiotic concept to aquatic species. Then, according to these authors, probiotics are not necessarily associated with feed (Gram et al., 1999) and not necessarily living or entire microorganisms (Salminen et al., 1999). Moriarty (1999) also extended the probiotic concept to microbial “water additive” based on the fact that, in aquaculture systems, the immediate ambient environment has a large influence on the health status and microbial communities of the cultured animals. In other words, in aquaculture the intestinal microbiota does not exist as entity by itself, but there is a constant interaction with the environment and the host functions. This interaction between the culture environment and the host implies that many probiotics may be obtained from the culture environment (Verschuere et al., 2000a). Then, according Moriarty (1999), there is no requisite for the probiotic to be acting in the gastrointestinal tract as stated by Fuller (1989). However,

Gatesoupe (1999) suggested the following alternative definition: “microbial cells that are administrated in such a way as to enter the gastrointestinal tract and to be kept alive, with the aim of improving health”. This author distinguished the probiotic concept from the biocontrol (antagonism to pathogens) and the bioremediation (improvement of water and sediment quality) concepts and emphasized that the extension of the probiotic concept proposed by Moriarty is pertinent when the administrated microbes are ingested and survive within the gastrointestinal tract. Indeed when administrated as biocontrol agent to the culture water, it is likely that some microorganisms may be ingested and display a probiotic effect on the host. Then Verschuere et al. (2000a) proposed the most complete definition of the probiotic concept for aquaculture in a broad sense: “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”. Finally, a shorter version of this definition, including non living microbial preparation, has been proposed by Irianto and Austin (2002): “a probiotic is an entire or component(s) of a microorganism that is beneficial to the health of the host”.

Today it is apparent that there are still different interpretations of the term probiotic. The definition of Irianto and Austin (2002) includes all microbial components and we can question about the interest of a so large concept. Moreover, beyond academic concerns, this probiotic definition may lead to some difficulties in the legislation as it is the case in some countries for the classification of aquaculture dedicated microbial products as veterinary or zootechnical additives. In this review, the definition of Gatesoupe (1999) will be used as it focuses on the probiotics ability to improve health status of the host as a result of its presence in the digestive tract. Nevertheless, as extensive applications exist in shrimp farming, several references will be made to microorganisms used as bioremediation agents.

### **II.3. Probiotic applications for shrimp**

The beneficial effect of probiotic preparations in human, pig, cattle and poultry nutrition has been well documented (Fuller, 1992; Ouwehand et al., 2002; Parvez et al., 2006). They are generally used as “functional foods” acting on human and animal health (Mulder et al., 1997) as well as growth supplements for animal nutrition (Abe et al., 1995). For instance an extensive literature exists reporting the effect of live microorganisms, especially bacteria

belonging to Lactic Acid Bacteria (LAB), to enhance human health. The Table 1.3 presents the main bacteria used as probiotics in human clinical trials and their various therapeutic or prophylactic properties. Then probiotics have been used to modulate immunity, prevent cancer, lower cholesterol, treat rheumatoid arthritis, improve lactose intolerance, prevent and reduce the effects of atopic dermatitis, Crohn's disease, diarrhea, constipation and candidiasis, and urinary tract infection (Reid, 1999). The main strains tested for human are *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus* sp.. Beyond human applications, LABs are also the main microorganisms used as probiotics for terrestrial animals (Guerra et al., 2007). The use of probiotics as farm animal supplements dates back to the 1970s and they were originally incorporated into feeds in order to promote animal's growth and to increase their resistance to disease.

Concerning the applications in aquaculture, Yasuda and Taga (1980) were the first to suggest that bacteria would be acting as food supply and biological controllers of fish disease. However, the first studies concerning fish applications of probiotics were published in the late 80's (Kosaza, 1986; Gatesoupe et al., 1989). Generally, commercial probiotic preparations, already conceived and used for terrestrial animal, were used. The success of these first trials were modest but encouraged the scientists to pursue in this way. Since, experiments continued in the 1990s, and an increased interest of the probiotic concept for aquatic species rapidly emerged.

Then the constantly increasing number of published studies dealing with probiotics makes it possible to achieve reviews of the scientific literature on the subject. Indeed several reviews (Gatesoupe, 1999; Vershuere et al., 2000a; Gomez-Gil et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Vine et al., 2006; Farzanfar, 2006; Balcazar et al., 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Wang, 2008) detail the various developments made in the use of probiotics in aquatic cultured species, including shrimp. Most of the probiotics proposed in aquaculture belong to LABs (Nikoskelainen et al., 2001; Gatesoupe, 2002a; Panigrahi et al., 2004; Picchietti et al., 2008), among which *Bacillus* species are well represented (Moriarty, 1998; Rengpipat et al., 1998). The genus *Vibrio* has also received attention (Garriques and Arevalo, 1995; Austin et al., 1995; Rodriguez et al., 2007), and other genera have been marginally studied (Scholz et al., 1999; Irinato and Austin, 2002; Reyes-Becceiril et al., 2008; Li et al., 2006).



**Table 1.3.** Various special therapeutic or prophylactic properties of specific probiotics used in human clinical trials (Ouwehand et al., 2002 with modifications)

| Genus                              | Species        | Health benefit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lactobacillus                      |                | Administration of multiple organisms, predominantly Lactobacillus strains shown to be effective in ameliorating pouchitis<br>Lactose digestion improved, decreased diarrhoea and symptoms of intolerance in lactose intolerant individuals, children with diarrhoea, Microbial interference therapy – the use of nonpathogenic bacteria to eliminate pathogens and as an adjunct to antibiotics<br>Improved mucosal immune function, mucin secretion and prevention of disease |
|                                    | acidophilus    | Reduced antibiotic associated diarrhoea<br>Decreased polyps, adenomas and colon cancer in experimental animals<br>Prevented urogenital infection with subsequent exposure to three uropathogens<br>Lowered serum cholesterol levels                                                                                                                                                                                                                                            |
|                                    | casei          | Shortening rotavirus diarrhoea<br>Reduced recurrence of superficial bladder cancer<br>Immune modulation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                    | crispatus      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                    | fermentum      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                    | johnsonii      | Improved oral Link-Amster vaccination<br>Reduced colonisation by Helicobacter pylori                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                    | paracasei      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                    | plantarum      | Relief of irritable bowel syndrome<br>Reduction of LDL-cholesterol<br>Reduced incidence of diarrhoea                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                    | reuteri        | Shortening of rotavirus diarrhoea<br>Shortened the duration of acute gastroenteritis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                    | rhamnosus      | Shortening of rotavirus diarrhoea<br>Immune modulation<br>Relief of inflammatory bowel disease<br>Treatment and prevention of allergy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                    | salivarius     | Reduced symptoms of inflammatory bowel disease                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Bifidobacterium                    |                | Reduced incidence of neonatal necrotizing enterocolitis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                    | breve          | Reduced symptoms of irritable bowel disease                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                                    | longum         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                    | lactis         | Treatment of allergy<br>Shortening of rotavirus diarrhoea<br>Reduced incidence of Black travellers diarrhoea<br>Improved oral vaccination                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Propionibacterium                  | freudenreichii |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Bacillus                           | subtilis       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                    | cereus         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Escherichia                        | coli           | Fewer relapses of inflammatory bowel disease                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Enterococcus faecium               |                | Decreased duration of acute diarrhoea from gastroenteritis                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Saccharomyces cerevisiae boulardii |                | Fewer relapses of inflammatory bowel disease<br>Reduced recurrence of Clostridium difficile diarrhoea<br>Effects on C. difficile and Klebsiella oxytoca resulted in decreased risk and/or shortened duration of antibiotic-associated diarrhoea<br>Shortened the duration of acute gastroenteritis                                                                                                                                                                             |

The use of probiotic bacteria is now commonly accepted in shrimp farming. The Table 1.4 presents an overview of the *in vivo* studies carried out with shrimp and published in peer reviewed journals. The main probiotic bacteria documented in shrimp belong to *Bacillus* sp. (Moriarty, 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006; Vaseeharan and Ramasamy, 2003), to Gram-negative bacteria strains (Garriques and Arevalo, 1995; Chythanya et al., 2002; Alavandi et al., 2004; Vijayan et al., 2006) and to LABs (Venkat et al., 2004; Chiu et al., 2007; Castex et al., 2008). It is interesting to emphasize that based on the extended probiotic definition proposed by Vershuere et al. (2000) several ways to deliver microbial products have been proposed: (i) application *via* the feed, (ii) or directly into the culture water and/or the pond sediment.

### **II.3.1. Probiotics for shrimp larvae and early post larvae stages**

Maeda and Liao (1992) were the first to report the beneficial effect of bacterial strains on Penaeid shrimp. In their study they showed that a soil bacterial strain (*Thalassobacter utilis* PM-4), with *in vitro* inhibitory activity against *V. anguillarum*, was able to increase larvae survival and to promote growth of *P. monodon* nauplii. However, since then very few in-depth studies have been published on the subject. As a result little scientific information on the use of bacteria as probiotics in shrimp larviculture systems is available today.

Some works, initiated by farmers, have been achieved in South America hatcheries in order to improve the level of beneficial vibrios, basically the sucrose fermentor bacteria, in their systems (Garriques and Wyban, 1993). Then, the first successful application of probiotic has been reported in Ecuadorian hatcheries by Griffith (1995). Further, Garriques and Arevalo (1995) isolated *Vibrio alginolyticus* strains from sea water and used it to completely eliminate larvae mortality when challenged with *V. parahaemolyticus*. Other trials achieved by the same authors confirmed the improvement in survival and also showed a growth promoting effect, though statistical analysis of their results carried out later by Gomez-Gil et al. (2000) indicated no statistical difference in survival and weight gain between treated and control groups. Nevertheless, since 1995 broad applications of *V. alginolyticus* (Ili strain) probiotic have been used in commercial Penaeid hatcheries have been achieved in Ecuador. The main application of this probiotic was to control larval diseases, and it resulted in a large reduction

in the use of antimicrobial products during larval rearing (Garriques and Arevalo, 1995). The work reported by these authors suggested that *V. alginolyticus* may confer some degree of protection against disease even if a lack of scientific explanation was evident. According to Rodriguez et al. (2007), the Ili strain of *V. alginolyticus* isolated from healthy shrimp larviculture is currently used in CENAIM's larvae production protocols. The strain is administered at the Nauplii 5 stage and successfully mitigated what is commonly referred to as “bolitas” syndrome or Zoea 2 syndrome (Vandenberghe et al., 1999).

Some studies also evaluated the effect of *Bacillus* on shrimp larvae or early post larvae. Ravi et al. (2007) isolated three strains from the marine sediment according to their antagonistic activity against *Vibrio* sp.. These strains were identified as *Paenibacillus* spp., *Bacillus cereus* and *Paenibacillus polymyxa*. The inoculation of these putative probiotics separately in the larval rearing tanks of *Penaeus monodon* postlarvae, challenged with pathogenic *Vibrio harveyi* and other *Vibrio* sp., resulted in increased survival rates. Moreover Decamps et al. (2008) recently reviewed field data concerning the use of a commercial probiotic containing mixed *Bacillus* sp. strains, based on data from Thai and Brazilian hatcheries, with respectively *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. When administrated in the tank larvae, the *Bacillus* sp. strains, which were selected from over 70 strains of *Bacillus* according to their *in vitro* antagonism toward pathogenic *Vibrio* species, showed production results similar to those obtained with antimicrobial products.

Other authors also reported the beneficial effect of enriched probiotic diets containing *Lactobacillus* sp. (Venkat et al., 2004; Viera et al., 2007) or a mixture of several bacterial and yeast strains (Uma et al., 1999) on growth and survival of early post larvae

Besides, several authors have argued that probiotic treatments might have better effect when applied at early stages, particularly before the larvae open the mouth, in order to allow the bacteria to invade the animals. Rodriguez et al. (2007) assessed the Ili probiotic strain on *L. vannamei* challenged with WSSV and reported that, when administrated during larviculture, it confers a better level of protection to shrimp and contributes to modulate the immune response. Similarly, in their study, Ziaei-Nejad et al. (2006) examined the effects of a commercial *Bacillus* probiotic on digestive enzyme activity, survival and growth of *Fenneropenaeus indicus* from Nauplii to post-larvae stages. Interestingly, the improvements

in growth parameters were significant only in post-larval shrimps that had received the probiotic during both hatchery and farming stages. Interestingly these last authors also demonstrated that shrimp fed probiotic-enriched *Artemia* had significantly higher *Bacillus* counts than did shrimp administered probiotic in the water. However, the two modes of administration did not lead to significant differences in growth and survival. Similarly, Venkat et al. (2004) did not show significant differences in the effect of *L. sporogenes* on *M. rosenbergii* post-larvae when delivered via *Artemia* or via dry feed.

*Artemia* nauplii are widely recognized as the best natural live feed available, and are widely used in marine finfish and crustacean hatcheries around the world. *Artemia* is also often used as a model organism to study the host–microbe interactions, and to evaluate probiotic bacteria before testing on target organisms (Marques et al., 2006). In this framework Gomez-Gil et al. (1998) showed a survival rate improvement of *Artemia* nauplii challenged with pathogenic *V. parahaemolyticus* when *V. alginolyticus* C14 was added in the culture tank. Similar results have been obtained by Patra and Mohamed (2003) using *S. Boulardii*.

*Artemia* have also been used extensively as a way for the delivery of materials, such as nutrients, antimicrobial agents, vaccines, and probiotics (Gatesoupe 1994). Then several studies have been carried out on the assessment of probiotic strains on *Artemia franciscana* nauplii aiming to bioencapsulate the probiotic as a way to deliver it to fish or shrimp larvae (Gomez-Gil et al., 1998; Verschueren et al., 2000b; Gatesoupe, 2002a; Patra and Mohamed, 2003). As an example Gatesoupe (2002a) tested the effect of two commercial probiotics containing respectively *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae* on *Artemia* nauplii used as food for the pollack *Pollachius pollachius*. He highlighted the growth promoting effect of *P. acidilactici* on fish larvae and questioned a possible synergy with the yeast *S. cerevisiae*. Immanuel et al. (2007) recently studied the delivery of bioencapsulated probiotics within *Artemia* as a means to enhance the growth and survival in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. They showed that post-larvae fed *Artemia* enriched with commercial capsule containing either *Lactobacillus acidophilus* or *S. cerevisiae* strains exhibited higher weight gain and higher specific growth rate. Additionally, the authors reported an increase in survival of post-larvae subjected to *Vibrio harveyi* infection, associated to a decrease in the pathogen load in muscle and digestive gland of animals.

Besides, *Artemia* like other live feed can be a source of pathogenic bacteria in hatchery environments (Vaseeharan and Ramasamy, 20003) and probiotics have been proposed as a solution to reduce the risks of contamination (Menpol et al., 2003).

Finally, the use of probiotics for broodstock animals has never been documented but does merit some interest. Indeed, it has been demonstrated that broodstock conditioning has a great influence on reproductive performances and larval quality (Racotta et al., 2003). Then probiotic effects, especially at the nutritional level, could have beneficial consequences on reproductive performances of broodstock animals and larvae quality as shown for other feed supplements (Paibulkichakul et al., 2008)

### **II.3.2. Probiotic applications during grow-out stages**

A review of 47 published papers about *in vivo* studies of probiotics in shrimp aquaculture is presented in table 1.4. The range of probiotics examined for use in shrimp aquaculture has encompassed Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts and microalgae (Irianto and Austin, 2002). However our table summarizes only bacterial and yeast applications. Interestingly almost the same number of studies relate to probiotic administrated *via* the diet (23) or added directly into the water (24). Besides, most of the trials carried out on post-larvae, juveniles and adults shrimps have been carried out with the main cultured shrimp species *P. monodon* (20) and *L. vannamei* (19). A few other studies concerned *F. indicus* (4), *L. stylirostris* (2) *P. chinensis* (1), or *Macrobrachium rosenbergii* (1).

The most studied probiotics belong to *Bacillus* bacterial strains. Generally, *Bacillus* strains tested in shrimp culture have been selected according to their antimicrobial activities toward pathogenic *Vibrio* sp. based on *in vitro* antagonism assays. *Bacillus* sp. are saprophytic Gram positive spore forming bacteria naturally present in a wide range of environmental conditions (in air, water, dust, soil and sediment), and are considered as allochthonous, entering the gut *via* the food. Moriarty (1998) emphasized that several reasons exist for the use of *Bacillus* rather than antibiotics: the *Bacillus* strains naturally produce many different antibiotic compounds, secrete many enzymes, compete for nutrients and surface, and hence are able to inhibit other bacteria. Furthermore the robustness of these spore forming bacteria is often

viewed as a great advantage as they may enable passage across the gastric barrier and they will offer a better stability during feed processing and shelf life/storage.

Then the large interest for *Bacillus* strains in shrimp aquaculture can be explained by their characteristics but also because one of the first reports of a successful use of probiotic in shrimp pond culture concerned *Bacillus* strains (Moriarty, 1998). This author compared results from different farms in Philippines, and concluded that the addition of several *Bacillus* sp. in the pond water, at a concentration of  $10^4$  to  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>, allowed culturing shrimps over 160 days without luminescent vibrio disease while control ponds were affected by the pathology before 80 days of culture. The author also demonstrated that the probiotic treatment modified the bacterial species composition of the pond water and sediment with a particular reduction in the number of luminous vibrios. Among *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* is the most recurrent species. This species is currently used for aquaculture, terrestrial animals and human consumption with claim of bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders (Farzanfar, 2006). In addition, the beneficial *in vitro* and *in vivo* effects of *B. subtilis* on immune modulation, under a variety of human and animal disease conditions, have been well documented (Green et al., 1999).

In shrimp, Vaseeharan and Ramasamy (2003) reported the beneficial effect of *Bacillus subtilis*, isolated from shrimp culture ponds, on survival of black tiger shrimp juveniles challenged with *V. harveyi*, when delivered in the culture water at a density of  $10^6$ - $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Furthermore these authors showed under *in vitro* and *in vivo* conditions that the probiotic strain was able to control the growth of *V. harveyi*. Balcázar et al. (2007) also evaluated a *B. subtilis* strain (UTM 126) on juvenile white shrimp survival after immersion challenge with *V. parahaemolyticus*. The strain was initially isolated from adult *L. vannamei* digestive tract according to its antimicrobial activity against *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio fluvialis* strains. Results from their study also indicated that the probiotic strain exhibited *in vitro* antagonism toward *V. parahaemolyticus* and showed a significant increase in survival rate, weight gain and feed conversion ratio when fed to juveniles at  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> of diet for 28 days.

Other *Bacillus* strains have also received much attention as a probiotic for shrimp. Rengpipat et al. (1998) isolated a *Bacillus* S11 strain from the gut of healthy *P. monodon*, according to its antimicrobial properties against *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*, and assessed it as a dietary probiotic for shrimp culture.

**Table 1.4.** Summary of in vivo studies published towards probiotics for shrimp aquaculture

| Host              | Probiotic strain(s) used                                                                                                           | Development stage                                      | Origin                             | Method of application     | Probiotic dose (when reported)            | Parameters measured                                                                                                                                                    | Experimental installation         | Challenge with pathogen         | Reference                     |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <i>P. monodon</i> | <i>T. subtilis</i> PM-4                                                                                                            | Nauplii stage                                          | soil bacteria                      | Addition to culture water |                                           | Survival<br>Growth<br>In vitro antagonism toward <i>V. anguillarum</i>                                                                                                 | Experimental tanks                |                                 | Maeda and Liao, 1992          |
|                   | <i>Bacillus</i> sp.                                                                                                                | All grow out stage                                     | Commercial product (DMS)           | Addition to culture water | $10^4$ to $10^5$ /ml                      | Survival<br>Growth<br>Microbiological analysis (pond sediment and water)                                                                                               | Commercial earthen ponds          |                                 | Moriarty, 1998                |
|                   | <i>Bacillus</i> S11                                                                                                                | Juveniles: PL30, 0.7-0.8g                              | <i>P. monodon</i> gut (broodstock) | Addition to diet          | $10^{10}$ CFU/g                           | Survival<br>Growth<br>Microbiological analysis (gut (intestine and digestive gland), tank water, feces)                                                                | Experimental tanks<br>Aquaria     | <i>V. harveyi</i> D331          | Rengpipat et al., 1998        |
|                   | <i>Bacillus</i> S11                                                                                                                | Juveniles: PL60, 6-7g; and Post larvae: PL10, 0.1-0.3g | <i>P. monodon</i> gut (broodstock) | Addition to diet          | $10^{10}$ CFU/g                           | Survival<br>Growth<br>Immune parameters (THC phagocytosis and phagocytic index, PO, antibacterial activity)<br>Microbiological analysis (tank water, intestine, feces) | Experimental tanks                | <i>V. harveyi</i> D331 and 1526 | Rengpipat et al., 2000        |
|                   |                                                                                                                                    | All grow out stage                                     | Commercial product                 | Addition to culture water |                                           | Survival<br>FCR<br>Final shrimp production<br>Microbiological analysis (pond water and sediment)<br>Pond water and sediment quality                                    | Commercial earthen ponds          |                                 | Shariff et al., 2001          |
|                   | <i>Bacillus</i> spp.                                                                                                               | All grow out stage                                     | Commercial product                 | Addition to culture water |                                           | Survival<br>Growth<br>Microbiological analysis (pond sediment and water)<br>Water quality                                                                              | Earthen pond                      |                                 | Dalmin et al., 2001           |
|                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                                                                      | Post Larvae: PL18                                      | Estuarine water                    | Addition to culture water | $10^6$ , $10^5$ , $10^4$ et $10^3$ CFU/ml | Antagonism toward: <i>Vibrio harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. damsela</i> and <i>V. fluvialis</i>                               | 1L beaker                         |                                 | Chythanya et al., 2002        |
|                   | 1: <i>Bacillus</i> sp. and <i>Saccharomyces</i> sp.<br>2: <i>Bacillus</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., and <i>Nitrobacter</i> sp. | All grow out stage                                     | Commercial product                 | Addition to culture water |                                           | Survival<br>Shrimp final production<br>Survival<br>Growth<br>FCR<br>Economic analysis                                                                                  | Commercial earthen ponds          |                                 | Devaraja et al., 2002         |
|                   | 1: <i>Bacillus</i> sp. and <i>Saccharomyces</i> sp.<br>2: <i>Bacillus</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., and <i>Nitrobacter</i> sp. | All grow out stage                                     | Commercial product                 | Addition to culture water |                                           | Growth<br>FCR<br>Shrimp final production<br>Pond water and sediment quality                                                                                            | Commercial earthen ponds          |                                 | Matias et al., 2002           |
|                   | <i>Bacillus</i> S11                                                                                                                | Juveniles: 0.6-0.9g                                    | <i>Penaeus monodon</i> gut         | Addition to diet          | $10^{10}$ CFU/g                           | Survival<br>Growth<br>Microbiological analysis (intestine)                                                                                                             | Cages in earthen ponds<br>Aquaria | <i>V. harveyi</i> 1526          | Rengpipat et al., 2003        |
|                   | <i>Bacillus subtilis</i> BT23                                                                                                      | Juveniles: 5-6g                                        | Shrimp culture pond                | Addition to culture water | $10^5$ - $10^8$ CFU/ml                    | Mortality after challenge<br>In vitro antagonism assay                                                                                                                 | Experimental tanks                | <i>V. harveyi</i>               | Vaseeharan and Ramasamy, 2003 |
|                   | <i>Bacillus</i> S11                                                                                                                | Juveniles: 6-8g                                        | Rengpipat et al., 1998             | Addition to diet          | $10^{10}$ CFU/g                           | Survival<br>Microbiological analysis (water and intestine)                                                                                                             | Experimental tanks                | <i>V. harveyi</i>               | Meunpol et al., 2003          |

Table 1.4.. (continued)

| Host                        | Probiotic strain(s) used                                                                          | Development stage           | Origin                                                            | Method of application     | Probiotic dose (when reported)                  | Parameters measured                                                                                                                       | Experimental Challenge with pathogen Installation | Reference                            |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>P. monodon</i>           | <i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Vibrio fluvialis</i>                                                | Sub-adult: 14 to 22 g       | <i>P. monodon</i> gut                                             | Addition to culture water | 10 <sup>3</sup> CFU/ml                          | Immune parameters (THC, PO, antibacterial activity)                                                                                       | Experimental tanks                                | Alavandi et al., 2004                |
|                             | Not reported                                                                                      | All grow out stage          | Commercial product (Team Aqua and ARDA-TEK Bio-Management system) | Addition to culture water |                                                 | Microbiological analysis (pond water and sediment, <i>Lisoneila anguillarum</i> in gills, stomach, intestine, muscle and digestive gland) | Commercial earthen ponds                          | Vaseeharan et al., 2004              |
|                             | <i>Streptomyces</i> sp.                                                                           | Juveniles: PL20, 1g         | Sediment from estuary of the southeast coast of India             | Addition to diet          | 2.5, 5.0, 7.5, or 10.0 g of dry mat per kg feed | Survival<br>Growth<br>Water quality                                                                                                       | Experimental tanks                                | Das et al., 2006                     |
|                             | <i>Bacillus cereus</i> , <i>Paenibacillus</i> spp., <i>Paenibacillus polymyxa</i>                 | Early post larvae           | Sea water, sediment and marine fish gut                           | Addition to culture water | 10 <sup>4</sup> and 10 <sup>5</sup> CFU/ml      | Mortality<br>In vitro antagonism toward <i>Vibrio</i> species                                                                             | Troughs                                           | Ravi et al., 2007                    |
|                             | <i>Lactobacillus acidophilus</i>                                                                  | Post Larvae: PL15           | Commercial product                                                | Addition to Artemia       |                                                 | Growth<br>Survival                                                                                                                        | Experimental tanks                                | Immanuel et al., 2007                |
|                             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                                                   | Post larvae: PL24, 0.3-0.4g | <i>Penaeus monodon</i> gut (broodstock)                           | Addition to diet          | 10 <sup>5</sup> CFU/g                           | Microbial analysis (digestive gland and muscle)<br>Mortality after salinity stress                                                        | Experimental tanks                                | Rengipat et al., 2008                |
|                             | <i>Bacillus</i> S11                                                                               | Nauplii                     | Commercial product: SANOLIFE MIC (INVE)                           | Addition to culture water |                                                 | Growth<br>Water quality<br>Probiotic monitoring in the shrimp digestive tract using green fluorescent protein marker                      | Commercial hatcheries in Thailand                 | Decamp et al., 2008                  |
|                             | Various <i>Bacillus</i> sp. strains                                                               | All grow out stage          | Commercial product: Environ-AC                                    | Addition to culture water |                                                 | Survival<br>Microbiological analysis (water)<br>In vitro antagonism                                                                       | Commercial earthen pond                           | Lakshmanan and Soundarapandian, 2008 |
| <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>Vibrio alginolyticus</i>                                                                       | Larvae                      | Isolated from sea water in Ecuador                                | Addition to culture water | 2.10 <sup>3</sup> CFU/ml                        | Survival<br>Growth<br>Microbiological analysis (competitive exclusion with <i>V. parahaemolyticus</i> in shrimp microbiota)               | Experimental tanks                                | Gariques and Arevalo, 1995           |
|                             | Red yeast and fungi                                                                               | Larvae                      | Sea water                                                         | Addition to culture water |                                                 | Growth                                                                                                                                    | Experimental tanks                                | Inriago et al., 1998                 |
|                             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Saccharomyces exiguis</i> (HPPR1) | Juveniles: 0.4-0.5g         | Commercial product                                                | Addition to diet          |                                                 | Survival<br>Growth<br>FCR<br>Phenoloxidase activity<br>Bacterial clearance                                                                | Fiber glass tanks                                 | Scholz et al., 1999                  |



Table 1.4.. (continued)

| Host                        | Probiotic strain(s) used                                                                            | Development stage                       | Origin                                                          | Method of application     | Probiotic dose (when reported)                                                     | Parameters measured                                                                                                                                                                                                                  | Experimental installation             | Challenge with pathogen    | Reference                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <i>Litopenaeus vannamei</i> | <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. polymyxa</i>                                      | Post larvae: 1.69g                      | Shrimp Commercial product: BioStart™ HB-1                       | Addition to culture water |                                                                                    | Survival<br>Growth<br>FCR                                                                                                                                                                                                            | Outdoor tanks                         |                            | McIntosh et al., 2000         |
|                             | <i>B. licheniformis</i>                                                                             |                                         | BioStart™ HB-2                                                  |                           |                                                                                    | Water and sediment quality                                                                                                                                                                                                           |                                       |                            |                               |
|                             | <i>Vibrio hepatarius</i> ,<br><i>Vibrio</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.                                | Post larvae                             | <i>L. vannamei</i>                                              | Addition to diet          |                                                                                    | Survival                                                                                                                                                                                                                             | Experimental tanks                    | <i>V. harveyi</i>          | Balcazar, 2003                |
|                             |                                                                                                     |                                         |                                                                 |                           |                                                                                    | Growth<br>Immune parameters (phagocytosis and antibacterial activity)                                                                                                                                                                |                                       | WSSV                       |                               |
|                             | <i>Vibrio</i> P62, P63,<br><i>Bacillus</i> P64                                                      | Juveniles: 1g                           | Digestive gland of healthy wild shrimp                          | Addition to culture water | 10 <sup>7</sup> CFU/ml                                                             | Growth<br>Immune parameters (THC, PO, ROIs, plasma protein concentration, antibacterial activity, global immune index)<br>Colonisation of the digestive gland by the probiotics<br>Competitive interaction with <i>V. harveyi</i> S2 | Aquaria                               | <i>V. harveyi</i> S2       | Gullian et al., 2004          |
|                             | <i>Bacillus</i> sp.                                                                                 | Sub-adult: 11.5g                        | Commercial product                                              | Addition to diet          | 5.10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 3.10 <sup>6</sup> , 5.106 CFU/g              | Apparent digestibility coefficients                                                                                                                                                                                                  | Experimental tanks                    |                            | Lin et al., 2004              |
|                             | Not reported                                                                                        | All grow out stage                      | Commercial product                                              | Addition to culture water |                                                                                    | Water quality<br>Microbiological analysis (water)<br>Final shrimp production                                                                                                                                                         | Earthen ponds                         |                            | Wang et al., 2005             |
|                             | <i>Rhodobacter sphaeroides</i><br><i>B. coagulans</i>                                               | Juvenile: 0.66g                         | Carp pond                                                       | Addition to diet          | Around 10 <sup>9</sup> , 5.10 <sup>9</sup> and 10 <sup>10</sup> CFU per kg of feed | Growth<br>Digestive enzymes activities (Protease, Lipase, Amylase, cellulase)                                                                                                                                                        | Aquarium                              |                            | Wang, 2007                    |
|                             | <i>Vibrio alginolyticus</i>                                                                         | Various larvae stage and grow out stage | Ili strain isolated from healthy shrimp larviculture in Ecuador | Addition to culture water | 10 <sup>5</sup> CFU/ml                                                             | Survival<br>Immune parameters (THC, plasmatic protein, superoxide anion, antibacterial activity)<br>WSSV prevalence                                                                                                                  | Experimental Commercial earthen ponds | WSSV                       | Rodriguez et al., 2007        |
|                             | <i>Bacillus licheniformis</i>                                                                       | Juveniles: 5-6g                         | Shrimp's pond sediment                                          | Addition to culture water | 10 <sup>3</sup> , 10 <sup>4</sup> and 10 <sup>5</sup> CFU/ml                       | Immune parameters (THC, SOD, PO)                                                                                                                                                                                                     | Experimental tanks                    |                            | Li et al., 2007               |
|                             | <i>Vibrio alginolyticus</i><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Roseobacter</i><br><i>Pseudomonas</i> | Juveniles: 1.6g                         | Adult <i>L. vannamei</i> digestive tract                        | Addition to diet          | 10 <sup>5</sup> CFU/g                                                              | Survival<br>Growth<br>FCR<br>In vitro antagonism toward <i>V. parahaemolyticus</i>                                                                                                                                                   | Experimental tanks                    | <i>V. parahaemolyticus</i> | Balcazar et al., 2007         |
|                             | <i>Bacillus subtilis</i>                                                                            | Juveniles: 1.2g                         | Shrimp culture pond                                             | Addition to diet          | 10 <sup>5</sup> CFU/g                                                              | Mortality<br>Antibacterial activity toward <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> strains                                                                                                          | Experimental tanks                    | <i>V. harveyi</i> TR51     | Balcazar and Rojas-Luna, 2007 |
|                             | Unidentified Lactic acid bacteria (C2 and B6)                                                       | Nauplii to PL1                          | Juvenile <i>L. vannamei</i> digestive tract                     | Addition to culture water | 10 <sup>8</sup> CFU/ml                                                             | Survival<br>Microbiological analysis (water, larvae)                                                                                                                                                                                 | Experimental tanks                    | <i>V. harveyi</i>          | Viera et al., 2007            |
|                             | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                                                      | Juveniles                               | home-made-                                                      | Addition to diet          | 10 <sup>4</sup> and 10 <sup>7</sup> CFU.g <sub>-1</sub>                            | Survival<br>Immune parameters (THC, PO, RB, SOD, clearance efficiency, probPO and PE mRNA expression)                                                                                                                                | Experimental tanks                    | <i>V. alginolyticus</i>    | Chiu et al., 2007             |
|                             | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                                                      | Juveniles: 10g                          | Broodstock ( <i>L. vannamei</i> )                               | Addition to diet          | 1.5±0.7 x 10 <sup>8</sup> CFU/g                                                    | Microbiological analysis (digestive tract)<br>Immune parameters( THC, PO)                                                                                                                                                            |                                       | <i>V. harveyi</i>          | Viera et al., 2008            |

Table 1.4.. (continued)

| Host                          | Probiotic strain(s) used                                                                                               | Development stage                                                  | Origin                                      | Method of application     | Probiotic dose (when reported)                                                              | Parameters measured                                                                                                                                      | Experimental installation       | Challenge with pathogen                                                 | Reference                |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Litopenaeus vannamei</i>   | <i>Arthrobacter</i> XE-7                                                                                               | Juveniles: 1.75g                                                   | culture water of <i>P. chinensis</i>        | Addition to diet          | $10^6$ , $10^8$ and $10^{10}$ CFU/g                                                         | Survival<br>Immune parameters (THC, PO, RB activity, percentage phagocytosis)<br>Microbiological analysis (intestine)<br>Water quality                   | Experimental tanks              | <i>V. parahaemolyticus</i>                                              | Li, 2008                 |
|                               | <i>Bacillus</i> sp.                                                                                                    | Post larvae: 0.68g                                                 |                                             | Addition to diet          |                                                                                             | Survival<br>Growth<br>Digestive enzyme activities (protease, amylase)<br>Serum biochemical parameters (glucose, protein, cholesterol, triacylglyceride)  | Experimental tanks              |                                                                         | Yu et al., 2008          |
|                               | Various <i>Bacillus</i> sp. strains                                                                                    | Nauplii                                                            | Commercial product: SANOLIFE MIC (INVE)     |                           |                                                                                             | Survival<br>Microbiological analysis (water)<br>In vitro antagonism                                                                                      | Commercial hatcheries in Brazil |                                                                         | Decamp et al., 2008      |
| <i>Fenneropenaeus indicus</i> | <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i>                              | Post larvae: 0.15 to 0.2g                                          | Commercial product (Lacto-sacc)             | Addition to diet          | $>10^{10}$ CFU/g                                                                            | Survival<br>Growth<br>Food consumption<br>FCR<br>Gross growth and net growth efficiency                                                                  | Experimental tanks              | <i>V. alginolyticus</i>                                                 | Uma et al., 1999         |
|                               | <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , 2 strains of <i>Lactobacillus bulgaricus</i>        | Post larvae: 1g                                                    |                                             | Addition to diet          | 5.106 CFU/g of each strain                                                                  | Survival<br>In vitro antagonism toward <i>V. alginolyticus</i>                                                                                           | Experimental tanks              | <i>V. alginolyticus</i>                                                 | Ajitha et al., 2004      |
|                               | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. circulans</i> | Nauplius(1-2) to Zoe(3), Mysids(1) to PL14, PL30 to Aquatech PL120 | Commercial product (Protexin culture water) | Addition to diet          | Trial 1 & 2 : $7.3 \pm 0.2 \times 10^6$ CFU/ml<br>Trial 3: $1.0 \pm 0.3 \times 10^7$ CFU/ml | Survival<br>Growth                                                                                                                                       | Experimental tanks              |                                                                         | Ziaei-Nejad et al., 2006 |
|                               |                                                                                                                        |                                                                    |                                             | Addition to Artemia       | Artemia enrichment: $2.2 \pm 0.1 \times 10^7$ CFU/ml                                        | FCR<br>Digestive enzymes activities (Amylase, protease and lipase)                                                                                       | Earthen ponds                   |                                                                         |                          |
|                               | Marine yeast <i>Candida sake</i> S165                                                                                  | Juveniles: 15.6 g                                                  | Coastal water                               | Addition to diet          | inclusion rate: 1, 10, 20%                                                                  | Microbiological analysis (gut and water)<br>Survival<br>Immune parameters (THC, PO, Superoxide anion)                                                    | Experimental tanks              | WSSV                                                                    | Sajeevan et al., 2006    |
| <i>Penaeus chinensis</i>      | <i>Arthrobacter</i> XE-7                                                                                               | Post larvae                                                        | <i>P. chinensis</i> culture water           | Addition to culture water | $10^6$ CFU/ml                                                                               | Survival<br>In vitro antagonism assay toward <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> and <i>V. nereis</i><br>Microbiological analysis (water) | Experimental tanks              | <i>V. parahaemolyticus</i><br><i>V. nereis</i><br><i>V. anguillarum</i> | Li et al., 2006          |

Table 1.4.. (continued)

| Host                             | Probiotic strain(s) used                                              | Development stage     | Origin         | Method of application | Probiotic dose (when reported) | Parameters measured                                                                                                                                                             | Experimental installation | Challenge with pathogen | Reference                |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Litopenaeus stylirostris</i>  | <i>Pediococcus acidilactici</i>                                       | All grow out stage    | Graminea       | Addition to diet      | 10 <sup>7</sup> CFU/g          | Survival<br>Growth<br>FCR<br><br>Microbiological analysis (Intestine, detection of <i>V. nigrilulchritudo</i> in haemolymph)<br>Digestive enzymes activities (amylase, trypsin) | Cages in earthen ponds    |                         | Castex et al., 2008a     |
|                                  | <i>Pediococcus acidilactici</i>                                       | Juveniles: 5g and 10g | Graminea       | Addition to diet      | 10 <sup>7</sup> CFU/g          | Survival<br>Microbiological analysis ( detection of <i>V. nigrilulchritudo</i> in haemolymph)<br>Antioxidant defences<br>Oxidative stress biomarkers                            | Experimental tanks        |                         | Castex et al., submitted |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,<br><i>Lactobacillus sporogenes</i> | Post larvae: 0.1g     | Medical stores | Addition to diet      |                                | Survival<br>Growth<br>FCR, protein efficiency ratio                                                                                                                             | Experimental tanks        |                         | Venkat et al., 2004      |
|                                  |                                                                       |                       |                | Addition to Artemia   |                                | Antagonism toward gut microbiota                                                                                                                                                |                           |                         |                          |

FCR= Food conversion ratio, THC= Total Haemocyte Count, PO= Phenoloxidase, DGGE= Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, RB= Respiratory Burst, SOD= Superoxide Dismutase, WSSV= White Spot Syndrome Virus, ROI= Reactive Oxygen Intermediates, ProPO=ProPhenoloxidase, PE=Peronectin  
*P.* = *Penaeus*, *L.* = *Litopenaeus*, *V.* = *Vibrio*, *B.* = *Bacillus*

In several studies, and in various experimental conditions (Rengpipat et al., 1998, 2000, 2003, 2008), they showed that the probiotic strain, when administrated as fresh cells at a concentration of  $10^9$  to  $10^{10}$  CFU.g<sup>-1</sup> of diet, allowed to (i) increase the growth and survival of *P. monodon* in pond and tanks, (ii) increase their resistance to pathogenic *V. harveyi* strains, (iii) and may activate both cellular and humoral immune defences as well as (iv) providing competitive exclusion in the shrimp gut. Meunpol et al. (2003) confirmed those results and reported, in association with an ozone treatment, the beneficial effect conferred by *Bacillus* S11 on the survival of *P. monodon* juveniles concomitantly to a reduction in *V. harveyi* concentration in the culture water.

Other researches applied the bioremediation concept by adding selected *Bacillus* sp strains (Moriarty, 1998), eventually coupled with other bacterial strains (Devaraja et al., 2002; Matias et al., 2002) into the pond's water with the aim to increase water quality and mineralization of the organic matter. Indeed, bacterial species belonging to genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas*, *Rhodoseudomonas*, *Aerobacter*, *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* are known to help in mineralization of organic wastes (Thomas et al., 1992). For instance *Nitrosomonas* sp. will help in oxidation of ammonia while *Nitrobacter* sp. will oxidize nitrites. Then bacterial amendments have been recommended for use in aquaculture ponds. Some of the benefits of using such bacterial products include the reduction of blue green algal populations, nitrate, nitrite, ammonia and phosphate levels, the increase of dissolved oxygen concentrations and the promotion of organic matter decomposition (Boyd, 1995). However, reliable studies on the positive benefits of applying such bacterial products in aquaculture systems are still scarce (Shariff et al., 2001, Devaraja et al., 2002).

Beyond *Bacillus* strains, Gram negative bacteria have also been tested as probiotic. For instance, Alavandi et al. (2004) isolated *Pseudomonas* sp. and *Vibrio fluvialis* strains from the gut of adult farmed *P. monodon* according several properties such predominance in the gut microenvironment, ability to secrete extra-cellular macromolecules and digesting enzymes, and to produce iron sequestering compounds like siderophores. However, the authors concluded that the selection criterion that they had used did not bring the desirable effect as they did not measure any effect on the immune indicators of *P. monodon* shrimp (haemocyte counts, phenoloxidase activity and antibacterial activity in the haemolymph). Other attempts were more successful, as demonstrated by the works of Chythanya et al. (2002), Gullian (2004), Balcázar (2003) and Balcázar et al. (2007). The former selected *Pseudomonas*

*aeruginosa* strain from sea water and showed its inhibitory activity toward several pathogenic *Vibrio* strains. They concluded that *Pseudomonas* I-2 strain could be used as a biocontrol agent in shrimp hatcheries and farms. However, to our knowledge, no application of such probiotic to shrimp has been published yet. Balcázar et al. (2007) evaluated the effect of *V. alginolyticus* and *Pseudomonas aestumarina* for potential use as dietary probiotic for shrimp *L. vannamei* juveniles and showed similar positive results as the one previously reported with *B. subtilis*.

However the use of *Vibrio* as probiotic remains today controversial since some strains have been described to be pathogenic for shrimp, as is the case for *V. alginolyticus* (Lightner, 1993). Then concerns must be expressed on the use of taxa considered pathogenic for aquatic animals before considering wider applications. Indeed, harmless bacteria might acquire virulence or be pathogenic for other species (Irianto and Austin, 2002). Moreover since current regulations make it mandatory to obtain authorisation for zootechnical application of living microorganisms, the use of already identified bacteria will tend to be increasingly extended to aquaculture (Gatesoupe, 2002b) as the licensing of new probiotic strains is relatively expensive (Hong et al., 2005). As an example, the European Union, through the European Food Safety Authority (EFSA), regulates the authorization, marketing and use of feed additives. A feed additive must then be authorized in accordance with the Directive 70/524/EEC, which requires the preparation of a dossier with data and studies demonstrating efficacy and safety of the product for animals, consumer and environment. A list of microorganisms authorized as probiotics in feeding-stuffs under the Council Directive 70/524/EEC is presented in Table 1.5. Interestingly, only Gram positive bacteria and yeasts are included in this list, and some of them have already been evaluated as probiotics for shrimp.

A more and more popular approach consists indeed of testing proven human and terrestrial animal probiotics such as LABs and yeasts. Because LABs are the most commonly applied probiotics in terrestrial animal nutrition, their use as probiotics has been proposed for aquatic species (Ringø and Gatesoupe, 1998). LABs potentially have several probiotic properties: they may stimulate the growth of preferred microorganisms, outcompete harmful bacteria, and reinforce the organism's natural defence mechanisms (Villamil et al., 2002). Studies showing such effects on aquatic species have generally assessed strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Carnobacterium divergens* sp.,

*Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* (Strøm and Ringø, 1993; Gatesoupe et al., 1989; Gatesoupe, 1991, 2002a; Gildberg et al., 1995, 1997; Nikoskelainen et al., 2001; Planas et al., 2004; Aubin et al., 2005).

According to Reid (1999) and Vázquez et al. (2005), Lactobacilli have the ability to: adhere to cells, exclude or reduce pathogen adherence, compete for nutrients, stimulate immunity, display antioxidant activity, persist and multiply, produce acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, be safe, co-aggregate and form a normal balanced flora.

The approach in aquaculture consists of either testing LABs isolated from the intestinal tract of aquatic animals, or already developed probiotics. It is commonly accepted that lactic bacteria are naturally present in the digestive tract of fish (Ringø and Gatesoupe, 1998). LABs are often viewed as non dominant bacteria in the normal intestine of fish but some strains can colonize it. However, new molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) indicated that LABs might be predominant bacteria in the gut of Atlantic salmon (Hovda et al., 2007).

**Table 1.5.** List of microorganism authorized as probiotics in feedingstuffs under Council Directive 70/524/EEC (From Balcazar et al., 2006).  
[http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/registeradditives\\_en.htm](http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/registeradditives_en.htm)

| Probiotics                              |
|-----------------------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> var <i>toyoi</i> |
| <i>Bacillus licheniformis</i>           |
| <i>Bacillus subtilis</i>                |
| <i>Enterococcus faecium</i>             |
| <i>Lactobacillus casei</i>              |
| <i>Lactobacillus farciminis</i>         |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>          |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>          |
| <i>Pediococcus acidilactici</i>         |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         |
| <i>Streptococcus infantarius</i>        |

In shrimps and more largely in crustaceans, most of the studies on the intestinal microflora do not report the presence of lactic bacteria in their digestive tract (Dempsey et al., 1989; Harris, 1993; Oxley et al., 2002; Venkat et al., 2004), but very few used molecular tools (Jonhson et al., 2008). However, Viera et al. (2007) isolated two LABs from *L. vannamei* digestive tract, and one of them was further identified as *L. plantarum*. When using *L. plantarum* as probiotic

for shrimp juveniles, six days after shifting from the probiotic enriched diet to a control diet, total LAB count in the gut was low (10 CFU/g of fresh gut) and not significantly different from control shrimp. Cai et al. (1999) also reported the presence of LABs (*Lactococcus garvieae*, *P. acidilactici*, and *Enterococcus faecium*) in the gut of the freshwater shrimp *M. rosenbergii*.

Recently promising results have been obtained with dietary LAB probiotics on survival improvement following challenges with pathogenic vibrios (Viera et al., 2007; Castex et al., 2008) and on growth and feed utilisation improvements (Uma et al., 1999; Venkat et al., 2004; Castex et al., submitted) of several shrimp species. Nevertheless, at this stage, the use of LABs can be considered but more studies are needed in order to state about their significant efficacy as probiotics for shrimp farming.

Finally, some applications of yeasts, mainly strains belonging to the *S. cerevisiae* species, have also been studied. For instance, Scholz et al., (1999) showed that diet supplementation by cells and  $\beta$ -glucan of *S. cerevisiae*, or an isolate of *S. exiguous* and *Phaffia rhodozyma*, were able to improve resistance of juveniles *L. vannamei* to vibriosis. Finally, a marine yeast (*Candida sake*) was also assessed in *F. indicus* sub-adults as a source of immunostimulant (Sajeevan et al., 2006). Interestingly a ten per cent inclusion of *C. sake* in the diet supported an optimal immune response in the shrimps and increased their survival after a white spot syndrome virus challenge.

### **II.3.3. In vivo studies under pond conditions**

In probiotics studies, small scale experiments units (fiber glass tanks and aquaria) have been generally used (34 out of the 47 studies), with almost 50 % of the studies including infection challenge with pathogens in tanks or aquaria. A fewer number of published studies (12) has been carried out in commercial hatcheries or under pond conditions.

It appears obvious that the efficiency of probiotics at a commercial scale will require "in situ" validation, ideally in ponds, to highlight their true value for the farmers. People having worked on the evaluation of probiotics in ponds know that such work is often complex because it has to take into account numerous factors, often very variable (different pond sizes and configurations, zootechnical practices, date and density of seeding, origin and quality of

post-larvae...). To compare treatments and to determine precisely whether a probiotic has an effect or not (statistical power), it is thus essential to standardize as much as possible these variables for every pond and ideally to realize numerous replicates (Chim et al., 2008). For instance, in their study, Devaraja et al. (2002) used three replicate 0.5 ha ponds in order to evaluate two commercial bioremediation products, but they did not show significant differences among the treatments in the average production at the end of the culture period, even though one treatment seemed to give better results. The authors finally advised the use of larger sample size for further studies to show the potential benefits of using microbial products in commercial aquaculture farms. Indeed, too small sample size very often leads to difficulties of interpretation, misleading results and inevitably to hazardous conclusions. It is frequent for a farmer to observe large differences in the final survival rate between ponds of the same farm, while no specific treatments were applied. Chim et al. (2008) illustrated, for semi-intensive conditions, the within-farm variability among the ponds, and confirmed that the specific characteristics of each pond from the same farm make it difficult to use them as experimental units. Then, they proposed the use of floating cages in shrimp culture ponds as an economical, powerful and sensitive experimental tool for shrimp culture studies. Rengpipat et al. (2003) and Castex et al. (2008) used such experimental design to assess respectively the effect of *Bacillus* S11 and *P. acidilactici* dietary supplementation on *P. monodon* and *L. stylirostris*. The latter used sample size of 5 replicate cages per treatment, repeated in two ponds, and after 3 months, showed significant improvement in survival and FCR, with a statistical power superior of 80 %.

Finally, most of the studies have been conducted over a quite short period. However long-term effects should be studied, this being particularly true for challenge studies. A good example is the study of Gildberg and Mikkelsen (1998), showing that even if the mortality of Atlantic cod was reduced by *Carnobacterium divergens* 12 days after an infection by *V. anguillarum*, no significant difference in the final survival was recorded with the control treatment two weeks later.

## **II.4. Studied parameters and investigated modes of action**

Several studies on probiotics have been published over the last decade. However the ones conducted with cultured aquatic animals have mostly centred on survival and growth



parameters of the host. This is particularly the case in juvenile shrimp studies for which half did not measure any biological parameters (22 out of the 47 studies presented in table 1.4). Therefore it appears obvious that the available information concerning the putative mode of action of such microbial supplement on shrimp biology is limited. Nevertheless, based on the work and concepts developed for human, terrestrial animals and fish, especially with regard to LABs, several modes of action have been proposed to explain the benefits conferred by the use of probiotics in aquatic species (Vershuere et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Balcazar et al., 2006; Tinh et al., 2007; Kesarcodi-Watson et al., 2008), and can be classified as follows:

- Competitive exclusion: antagonism against pathogenic bacteria *via*:
  - production of inhibitory compounds
  - competition for nutrients (or energy sources), space or oxygen
- Interference with quorum sensing
- Stimulation of the immunity of the host
- Stimulation of growth and improved nutrition of the host
  - Source of macro- and micro-nutrients
  - Contribution to nutrition by modifying the gut microflora
  - Enzymatic contribution to digestion
  - Detoxification of potential harmful compounds in feeds
- Improvement of water quality (bioremediation)

The specific action mechanisms, both in animals and for human applications, are probably of a very diverse nature and the effects are unlikely to arise from independent mechanisms. However such combination of several action mechanisms makes their *in vivo* demonstration harder (Gatesoupe, 1999), especially when probiotics with more than one strain are studied. In this section we will focus mainly on the current knowledge concerning the mechanisms of action of probiotics investigated in shrimp, especially from the perspective of the digestive tract.

#### **II.4.1. Competitive exclusion**

Competitive exclusion is a mechanism of action widely invoked in the literature, but the modalities by which it occurs have been poorly investigated in shrimp.

In their study of the probiotic *Bacillus* S11, Rengpipat et al. (2000) assumed competitive exclusion in the shrimp's gut as they observed a reduction of *V. harveyi* concentration in the gut of *P. monodon* fed the probiotic while challenged with the pathogenic bacteria. However, no information was provided by the authors according how the probiotic may compete with the pathogen, even if the production of inhibitory substances may be assumed since the bacteria have been selected on its *in vitro* antimicrobial activity against *Vibrio* sp..

### **Production of inhibitory substances**

The antagonism against pathogens, especially by the production of inhibitory substances, is probably the mode of action the most frequently suggested in the literature. This can be explained by the fact that screening of probiotics has been driven by the activity of the tested strains against identified pathogens. All the methods employed are based on the capacity of the bacteria to produce some extra-cellular substances that inhibit other bacterial strains (Van Hai et al., 2007). Rengpipat et al. (1998) selected a *Bacillus* S11 strain, over 377 isolates from samples of mud, water and black tiger shrimp, based on its greatest antimicrobial performance against pathogenic *V. Harveyi* and *V. parahaemolyticus*. Decamp et al. (2008) used a similar approach in order to select several *Bacillus* sp. strains included in a commercial probiotic.

Antimicrobial effects of bacteria generally come from the following substances released alone or in combination: antibiotics, bacteriocins, siderophores, lysozymes, proteases, hydrogen peroxide or organic acids reducing the pH of the medium, and ammonia (Verschuere et al., 2000). Various authors have stated that among extra cellular substances produced by probiotics, bacteriocins would be the most important (Gildberg et al., 1997). For instance, antimicrobial activities of *Bacillus* sp. have been linked to polymyxin, bacitracin and gramicidin antibiotic production (Chitta et al., 2002 cited by Gullian et al., 2004). However, in the case of LABs, it is commonly accepted that the primary effects would be a reduction of pH *via* organic acid production and removal of carbohydrates (Daeshel, 1989). Vázquez et al. (2005) showed that lactic and acetic acids are responsible for the effects of nine potential lactic acid bacteria probiotics tested for their inhibitory effects on four common pathogens of turbot. Nevertheless, it is also accepted that the probiotic effects of many LABs are based on the production of diverse antibacterial metabolites (bacteriocins in particular). Besides, as emphasized by Aubin et al. (2005), assessing the effect of *P. acidilactici* on Rainbow trout,

the probiotic effect could be either direct, because of bacteriostatic properties, or indirect, by stimulating favourable intestinal microbiota.

Beyond *in vitro* assays, *in vivo* trials have been carried out with shrimp species in order (i) to verify if the *in vitro* antagonist properties of a strain can be observed *in vivo* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003); (ii) to assess its eventual pathogenicity to the host (Chythanya et al., 2002) and (iii) to evaluate the degree of protection it may confer during a challenge with a pathogen; (Rengpipat et al., 1998; Ajitha et al., 2004; Gullian et al., 2004; Balcazar et al., 2007). For instance, Vaseeharan and Ramasamy (2003) showed inhibitory effects of cell-free extracts of *Bacillus subtilis* BT23 against *V. harveyi* and then confirmed *in vivo* that this strain, when administrated at  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml for 6 days, confers a 90 % reduction in accumulated mortality of *P. monodon* challenged with *V. harveyi*. Chythanya et al. (2002) also reported the inhibitory activity of cell free extract of *P. aeruginosa* I2 and showed that the extract, when applied at 20 mg/ml, was able to level off *V. harveyi* concentration in rearing water by over a log unit but did not improve *P. monodon* post-larvae survival. This effect was associated to the inhibitory effect of the chloroform extract of *Pseudomonas* I-2 cell free supernatant, and the author suggested that pyocyanine could be the antibacterial agent responsible for the inhibition of the *vibrio*.

However, as emphasized by Kesarcodi-Watson et al. (2008), the *in vitro* screening for production of inhibitory substances presents two major limitations: (i) it excludes the potential probiotics with other modes of action, undetected by the agar plate methods; and (ii) there is obviously an absence of a direct link between *in vitro* and *in vivo* assays as previously reported by Gram et al. (2001) with the probiotic *P. fluorescens* AH2. Moreover, bacteria, such as vibrios, might develop resistance if the production of growth -inhibitory compounds is the only mode of action. Based on this statement, the E.U. and the EFSA stated that micro-organisms intended for use as probiotics should not be able to produce any antimicrobial substances used as antibiotics in humans or animals (Anadón, 2006).

### **Competition for nutrients and adhesion sites**

Other studies suggest competitive exclusion of the probiotic strains by competition for nutrients or adhesion sites. The latter has been often invoked but little evidence to

demonstrate it under *in vivo* conditions can be found in the literature (Lee et al., 2000). Adhesion and colonisation of the mucosal surfaces by the probiotic bacteria could prevent attachment of pathogens or favour their removal from the infected digestive tract. Vine et al. (2004) demonstrated that the addition of five candidate probiotics, isolated from the clownfish (*Amphiprion percula*) mucus, were able to inhibit the attachment of one of the pathogens tested. In their study, Gullian et al. (2004) showed colonisation of the digestive gland of *L. vannamei* by several probiotic strains and highlighted competitive interaction of these strains with pathogenic *V. harveyi* strain using RAPDs and monoclonal antibodies. As an example, the probiotic strain *Vibrio* P62 was able to reduce the colonization of *V. harveyi* S2 by 60 %, besides displacing the indigenous microflora of the digestive gland. However, as indicated by Vershuere et al. (2000), the adhesion of a probiotic to the gut wall does not necessarily imply competition for adhesion sites as the only mode of action involved. Indeed, Balcázar et al. (2007) showed *in vitro* that a strain of *Lactosoccus lactis subsp. cremoris* exhibited a competitive adhesion toward the fish pathogen *A. salmonicida* in fish mucus as well as displaying a antimicrobial activity.

Studies on this subject are limited as little is known about the colonisation of the crustacean gut by bacteria and the existence of specific attachment sites (Harris et al., 1993). It is accepted that crustaceans have a much less developed gut microflora than fish. Besides, this microflora would be mostly transient in the foregut and the hindgut regions, and bacterial concentration and composition would be influenced by a variety of parameters, such as temperature, feeding, molting, intestinal transit and defecation. Ringø and Gatesoupe (1998) reported that lactic acid bacteria ingested *via* food may be transient in fish as they do not colonize the intestinal mucous and are lost during the intestinal transit within a few days of their ingestion. While most research has focused on bacteria that are able to attach to intestinal mucous, transient bacteria have also been demonstrated to exert beneficial effects (Isolauri et al., 2004; Aubin et al., 2005). According to Ouwehand et al. (2002), it is not necessary that a probiotic induces changes in intestinal microbiota, or a so-called colonization, to exert a local effect during transient passage through the gastrointestinal system. In fact, the variation in the microbiota in fish is substantial and fluctuates strongly on a daily basis (Panigrahi et al. 2004). In this case, regular administration of probiotic *via* the feed can be a means to artificially sustain their presence in the digestive tract.

Several studies also suggest competition for nutrients or energy sources (Rico-Mora et al., 1998; Verschuere et al., 1999). However the *in vivo* demonstration of such mechanism has never been reported in shrimp studies. Rico-Mora et al. (1998) showed that a probiotic strain, isolated for its high capacity to grow in organic-poor substrates, was able to prevent the establishment of *V. alginolyticus* in a diatom culture, whereas no inhibitory effect of the strain was detected toward other vibrios. Others also suggest the competition for iron as a possible mechanism. Iron is necessary for the growth of a majority of micro-organisms, but is generally available in limited amounts and in an insoluble form. Siderophores are ferric ion chelating agents, with low molecular weight, that can dissolve precipitated iron and make it available for microbial growth (Verschuere et al., 1999). It is therefore a mechanism identified in some pathogens (Gram et al., 1999) as it confers a selective advantage for these bacteria. Non-pathogenic bacteria producing siderophores could be so used as probiotics to limit, even exclude, bacteria for which pathogenicity is due to iron competition. Hence, Gram et al. (1999) showed that sterile-filtered culture supernatants from iron-limited *P. fluorescens* AH2 inhibited the growth of *V. anguillarum*. Interestingly, this *in vitro* result was successfully repeated *in vivo* with treated Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) showing a 46 % reduction of accumulated mortality after challenge with *V. anguillarum*.

#### **II.4.2. Inhibition of virulence**

Another mode of action concerns the virulence inhibition of some pathogenic bacteria *via* interference of quorum sensing. “Quorum sensing” is the process by which bacteria communicate and coordinate the expression of certain genes in response to signal molecules. These quorum sensing signal molecules were found to be involved in the regulation of virulence factors in many pathogenic bacteria, including the fish and shrimp pathogen *V. harveyi*. Recently, Defroidt et al. (2005) and Tinh et al. (2007) were able to demonstrate respectively that the *V. harveyi* quorum-sensing system regulated the virulence of the bacterium towards gnotobiotic *A. franciscana* and *Brachionis plicatilis*. Then the use of quorum sensing disrupting compounds has been suggested as a promising strategy in order to inhibit the virulence of pathogenic bacteria in aquaculture (Defroidt et al., 2004). For instance, when added at optimal concentration, halogenated furanones, produced by a marine red algae and previously shown to disrupt quorum sensing signal molecules, protected *Artemia* from several pathogenic vibrios (Defroidt et al. 2006). Interestingly, quorum sensing

disrupting compounds affect virulence of pathogenic vibrios but do not affect their growth, and then limit the risk for resistance development compared to antibiotics. Hence, the search for new probiotic bacteria which can act as signal molecule inactivating bacteria is a future challenge in aquaculture systems.

### **II.4.3. Stimulating the immunity of the host**

There are many reports that bacterial compounds act as immunostimulants in fish and shrimp (Swain et al., 2008; Smith et al., 2003). Some probiotic bacteria could contribute to stimulate the non-specific immune system of fish, resulting sometimes in an enhancement of their resistance to bacterial infection (Abdel-Tawwab et al., 2008; Aly et al., 2008; Wang et al., 2008). It has been demonstrated that probiotic supplementation enhances immune function, such as phagocytosis by neutrophils and macrophages isolated from the head kidney (Villamil et al., 2002; Panigrahi et al., 2005). Indeed, when orally administered for 7 days to turbot, *L. lactis* significantly increased the chemiluminescent response of kidney head macrophages and the serum Nitrite Oxide (NO) concentration (Villamil et al., 2002). Besides, it was found that viable forms of the LAB *Lactobacillus rhamnosus* when fed to juvenile rainbow trout induced better phagocytic activity and complement activity compared to that of the non-viable heat killed forms (Panigrahi et al., 2005). More recently, Aly et al. (2008), by looking at the respiratory burst activity, the neutrophil adherence and the lysosyme activity in blood and plasma, reported an enhancement of the immune response in Nile tilapia fed with a diet enriched with a mixture of *B. subtilis* and *L. acidophilus*. Interestingly these results were associated with an elevation in the relative level of protection of fish from challenge infections by *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*.

The putative improvement in the immunity of shrimp by probiotics has also received some attention (Rengpipat et al., 2000; Gullian et al., 2004; Alavandi et al., 2004; Rodriguez et al., 2007; Chiu et al., 2007; Li, 2008). Rengpipat et al. (2000) mentioned that *Bacillus* S11 provided disease protection by activating both cellular and humoral defences in tiger shrimp. Balcázar et al. (2003) related the protective effect of a mixture of *Vibrio* sp. and *Bacillus* sp. against *V. harveyi* and WSSV to a stimulation of the phagocytosis and the antibacterial activity in the haemolymph. Li (2008) recently showed the positive effect of the probiotic bacteria *Arthrobacter* XE-7 on the resistance of *L. vannamei* juveniles challenged with

*V. parahaemolyticus* and concluded to an immunostimulation. Indeed all the immune parameters measured (total hemocyte counts, percentage phagocytosis, respiratory burst activity, and serum phenoloxidase activity) were increased in shrimps fed the probiotic. Interestingly, Balcázar *et al.* (2006) emphasized that bacteria that did not colonize the gut would not help in improving the immune system of shrimp. This seems to be in accordance with the results of Gullian *et al.* (2004) who associated the enhancement of the global immunity index conferred by *Vibrio* (P62 and P63) and *Bacillus* probiotic strains in shrimps to their degree of colonization.

Finally, a recent result also merits some attention. Chiu *et al.* (2007) reported that *Lactobacillus plantarum* administrated at  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed was able to enhance immune ability of *L. vannamei*, increasing its resistance to *V. alginolyticus*. The authors suggested that *L. plantarum* may also enhance antioxidant status of the shrimp based on increased superoxide dismutase activity and peroxinectin mRNA transcription levels. A similar suggestion has been made by Castex *et al.* (submitted) in *L. stylirostris* fed probiotic *Pediococcus acidilactici*, who observed an increase in the total antioxidant status (TAS) of the shrimp.

#### **II.4.4. Stimulation of growth and improvement of the nutrition of the host**

As mentioned by Verschuere *et al.* (2000a) it is often unclear whether a probiotic effect is attributed to biocontrol or if it is a consequence of the nutritional effects of the probiont, acting as food source or contributing to the digestion. Then it is obvious that interaction may exist in some cases between both effects. This is where confusion can be made between zootechnical additives, acting mainly in keeping organism's health and favour growth, and veterinary additives acting strictly as biocontrol agents. A combination of nutritional contribution and disease control will probably yield the best probiotic effect.

Several studies report that probiotic bacteria are good candidate for improving the digestion of nutrients and growth of aquatic organisms (Lara-Flores *et al.*, 2003; Venkat *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Wang, 2007; Suzer *et al.*, 2008). From the studies in Table 1.4 only 14 reported growth improvement and 9 feed conversion reduction due to probiotic

supplementation. Interestingly in 85% of the cases, growth improvement was reported when the probiotic was administrated via the feed or when colonisation of the gut by the probiont was observed (Gullian et al., 2004).

Even if little is known about the role of the intestinal microbiota on nutritional process in marine invertebrates (Harris, 1993), the microbiota may serve as a supplementary source of food, and microbial activity in the digestive tract and may be a source of vitamins, such biotin and exogenous enzymes or essential amino acids (Dall and Moriarty, 1983). For instance Erasmus et al. (1997) showed that enteric bacteria play an integral role in abalone nutrition by hydrolysing complex polysaccharide components of macroalgae to simple polymers and smaller units which are rapidly assimilated by the host. Indeed they reported that abalone enteric bacteria produced enzymes able to degrade agar, carrageenan, laminarin and alginate and that 70–90% of enzyme activity was extracellular suggesting that bacterial enzymes are secreted into the lumen of the gut. From these statements, it is accepted that probiotics may improve digestive activity by synthesis of vitamins, cofactors or improve enzymatic activity (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999). For instance, Gorospe et al. (1996) explained the nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture by the bacteria being an additional source of protein. Yu et al. (1998) showed that vitamin B12 producing bacteria can be use as a nutritive complement for rotifer *brachionus plicatilis*. Bairagi et al. (2002) determined that strains isolated from the digestive tract of freshwater fish were able to produce digestive enzymes facilitating feed utilization and digestion by the host. In another study with two dietary *Bacillus* strains, these authors attributed the beneficial effect on the growth of rohu to extracellular cellulolytic and amylolytic enzymes produced by the bacteria (Bairagi et al., 2004).

More generally, probiotics may favour growth by a number of mechanisms alone or in interaction:

- increase the pool of digestive enzymes in the gastrointestinal tract or stimulating digestive enzymes production in the host,
- increase nutrients available to the organism for absorption in the gastrointestinal tract (for example by pre-digesting some elements of the feed),
- use of the bacterial supplement as an additional nutrient source.



Doeschate and Coyne (2008) showed that abalone (*Haliotis midae*), fed a kelp diet supplemented with *Pseudoalteromonas* sp. strain C4, exhibited an increased growth rate compared to abalone fed standard kelp. They suggested three actions of the probiotic in the nutrition of farmed abalone by: (i) pre-digestion of alginate in kelp-based feed, (ii) increased alginate lyase activity in the abalone digestive tract and (iii) utilisation of strain C4 as a protein source. In this case the probiotic effect can be explained by an increase in feed digestibility and an additional source of nutrients.

However in the case of shrimp, the production of enzymes contributing to digestion and/or the stimulation of digestive enzymes activities of the host by the probiont have been almost exclusively documented. In their paper entitled “The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds”, Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006) selected three *Bacillus* strains and showed their high proteases, carbohydrases and lipases activities. They suggested that such strains could be used as probiotic in order to increase feed utilisation by the shrimp. In their study, Ziaei-Nejad et al. (2006) associated the growth improvement of the *F. indicus* shrimp, cultured with mixed *Bacillus* probiotics, to an increase in the specific amylase, lipase and protease activities in their digestive tract. However, based on the low colonisation rate of the *Bacillus* strain in the digestive tract of the shrimps, the authors suggested that the exogenous enzymes produced by the probiotics strains may account for only a small proportion of total enzyme activity. Therefore, in order to explain the better growth rate and FCR recorded in the probiotic treatments, the authors assumed that the probiotic might either stimulate in some way endogenous enzymes produced by the shrimp. Other studies concluded to the same hypothesis (Wang, 2007; Castex et al., 2008). Wang (2007) also showed that probiotics effect was not improved by increasing their concentration, suggesting that the enzymes activity induced by the probiotic strains reached an upper limit in the shrimp intestine.

In conclusion, the exact mechanism by which probiotics operate has not been determined. It is possible that other phenomenon than those mentioned previously are involved such as the detoxification of potentially harmful compounds, the denaturing of potentially indigestible nutrients in feeds, or a modification of the gut microflora leading to (i) a substitution of depressive microbial agents which hinder growth and/or (ii) a production of substances favouring growth (growth factors or essential nutrients). Substantial efforts would be needed

in order to get more insights into those mechanisms, especially in shrimp for which little information is available today.

## **II.5. Conclusions and perspectives**

Based on all the research presented above, several properties of probiotics have been proposed in order to develop effective and safe products. In this sense, probiotics must:

- not be harmful to the host,
- be ingested and persist in the host (*via* colonisation and replication, or regular addition),
- reach the location where the effect is expected,
- work *in vivo*,
- be safe (not pathogenic to the host, absence of resistance gene, safety for human consumption).

To this list we can add that, in order to be used at a large scale and eventually marketed, a probiotic may:

- require technological properties making possible its use for industrial production,
- satisfy current regulations.

Safety considerations are today taken into account for the development of marketed probiotics. As mentioned by Wang et al. (2008), new species and specific strains identified as potential probiotic for aquatic species do not share the historical safety of traditional or widely tested strains such as LABs (Adams, 1999). However, scientists working on the subject are generally agreeing that strains isolated from the immediate environment of the host will display a more effective activity than strains isolated from human or agricultural systems (Garriques and Arevalo, 1995; Balcázar et al., 2007). Moreover the use of “home made” probiotics, bacterial strains, isolated from the direct or close culture environment and cultivated on site, would be particularly well developed in shrimp hatcheries even if data on the subject have not been published (Autrand, pers. Com.). For example, the use of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries and farms has received a great interest over the last years and is today a well established means to control diseases and sustain a high level of production (Cedeño, 2007). A survey conducted by the CENAIM in Ecuador, in the North part of the

Manabi province over 56 farms, showed that 89% were using probiotics with more than 20 products identified, and that in 56.9% of the cases the bacterial strains used were of local origin. There are also many products being sold to aquaculture farmers as probiotic which do not specify the bacterial species or the concentration used, and for which the safety and the standardisation of the production process can be questioned. It is obvious that, prior to their application at the production scale, more attention should be paid to evaluate these strains with regard to safety (for the host, for human, and for the environment), and not only for their efficacy,. Probiotic manufacturers should particularly apply modern molecular techniques to ensure the identity of the strains used, for quality assurance and safety.

From a commercial point of view, a compromise should be addressed: probiotics already developed for terrestrial species (i.e. LABs), as they offer several advantages (efficiency, technological properties, industrial production, registration...), and have been found, in some cases, as useful in aquatic animals as in terrestrial animals (Kozasa, 1986; Gatesoupe, 2002b), should be compared to autochthonous strains before to reject their potential interest. In 2002, Gatesoupe suggested that already developed probiotics were, with no doubt, the best solution in a short term to allow the development of probiotics for the aquaculture market. In the view of the current knowledge and of the regulation considerations, it seems to be still the case today. Moreover, such probiotic strains, beyond the fact that they would be more rapidly authorized and marketed, once their beneficial effect had been demonstrated, could be used as positive control for future studies in order to develop more specific and efficient probiotics. Besides, confusion still remains over the meaning of the term probiotics in aquaculture, making it sometimes difficult to classify probiotics as zootechnical additives or veterinary products. Today, regulations on the use of additives in feed products have been revised and consolidated in many countries. For the European Union and the European Food Safety Authority, probiotics are part of this category, and as reported earlier few microorganisms have been already authorised or are currently under examination for use as probiotic in feedingstuffs. The authorised products are for specific applications and there are still no probiotic that are specifically authorised for aquatic species. Then, at least for grow-out systems, it seems that a definition of probiotics restricted to “live microbial agents administrated in such a way as to enter and survive in the gastrointestinal tract improving animal health and favouring growth”, will offer an interesting compromise in order to facilitate their authorisation and development.

However, beyond regulatory considerations, there are also technological issues to the incorporation of dietary probiotics in the pelleted feed. In order to exert their effects, probiotics must be active once on their site of action, meaning that the microorganisms must survive the stressful conditions of feed processing, storage and the digestive process of the host animal. This is of particular concern in aquaculture since feed processing conditions are very harsh (for instance, temperature around 90°C for several minutes). Then probiotic incorporation in aqua feeds can be seen as a drawback to the use of probiotics at industrial levels compared to other, more stable, feed additives. Novel approaches in application are required. Providing probiotic living cells in a protected form with a physical barrier against adverse environmental conditions is therefore a technique currently receiving considerable interest. For instance, microencapsulation of probiotic bacterial cells has been developed at this end and microencapsulated bacteria or yeasts are today available (Kailasapathy, 2002; patent-pending microencapsulation technology, PROBIOCAP®, Lallemand). In a pelleting trial achieved to compare a standard and an encapsulated form of the commercial probiotic Levucell SC (*S. cerevisiae*, Lallemand), it was showed that at 70°C, around  $8.10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> could be recovered with the encapsulated form, against  $7.10^3$  CFU.g<sup>-1</sup> for the unprotected product (Feed Tech 9.7 2005, [www.AgriWorld.nl](http://www.AgriWorld.nl)). At 80°C the figures were  $6.10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> and  $1.10^3$  CFU.g<sup>-1</sup> respectively. Other trials also showed the very small differences between measured and expected recovery of such encapsulated probiotics in feedingstuffs under different pelleting conditions and in different diets. However in some cases, as in shrimp feed, this technology is not sufficient to protect the microorganism and other technologies have to be developed with the feed manufacturers, depending on their own process and equipment. Post-pelleting spraying in oil or water is generally proposed and this procedure has shown efficient results in term of homogeneity and conformity to the expected dosage at both laboratory and industrial levels (Lallemand, unpub.results).

To conclude it is obvious that the probiotic concept is still controversial in aquaculture, and that more in-depth studies are essential, especially in order to highlight and further investigate their mode of action. These future studies should focus on the microbial interactions within aquaculture systems and more precisely within the host gastrointestinal tract, and will need the use of molecular and microbial ecology's techniques. Findings from such research will definitely be of importance in order to select and develop new probiotics and to investigate new modes of action. Additionally, the use of (i) initial small scale *in vivo* studies to select

new probiotics acting by any mode of action (Kesarcodi\_Watson et al., 2008) and of (ii) new *in vivo* screening models (such as gnotobiotic *Artemia* (Tinh et al., 2007)) to gain insights into the mechanisms of action involved, should be preferred for research and development of future efficient probiotics for aquatic species.

Finally, toward applications of probiotics at commercial scale in shrimp farms, it is of importance to bear in mind that, as postulated by Decamps et al. (2008), minimizing the risk of vibriosis will not be obtained by moving only one parameter, but requires a multi-disciplinary approach including the use of additives such as probiotics associated with good hygiene and sanitary measures, together with an optimal farm management.

## II.6. References

- Anadón, A. 2006. The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety, in Workshop III: 2006 EU ban on antibiotics as feed additives: consequences and perspectives, J. vet. Pharmacol. Therap 29 (Suppl 1), 41-46.
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael Nahla E.M., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 280, 185-189.
- Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology 68, 171-178.
- Abe, F., Ishibashi, N., Shimamura, S., 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. J. Dairy Sci. 78, 2838-2846.
- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 17, 115-120.
- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ahlam Abdel-Aziz Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology 25, 128-136.
- Ajitha, S., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I.S.B., Varghese, V., 2004. Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio Alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). Asian Fisheries Science 17, 71-80.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac. Res. 36, 758-767.
- Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Effendi, I., Griffith, D., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18, 93-96.
- Bairagi, A., Sakar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10, 109-121.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. Aquaculture Research 35, 436-446.
- Balcázar, J.L., 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Mu'zquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114, 173-186.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D.P., 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology 96, 147-150.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Curr Microbiol 55, 409-412.
- Boyd, C.E. 1995. Chemistry and efficacy of amendments used to treat water and soil quality imbalances in shrimp ponds. In: Swimming through troubled waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture 1995. (eds. C.L. Browdy and J.S. Hopkins), pp. 166-188. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y., 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. J. Gen. Appl. Microbiol, 45, 177-184.

- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojouis, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275: 182-193.
- Cedeño, R., 2007. Probióticos y su aplicación en el cultivo de camarón en la zona norte de la provincia de Manabí. CENAIM INFORMA, Boletín Informativo 143.
- Chim, L., Castex, M., Pham, D., Brun, P., Lemaire, P., Wabete, N., Schmidely, P., Mariojouis, C., 2008. Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. *Aquaculture* 279, 63-6.
- Chitta, R., Rempel, D.L., Gross, R.L., 2002. Probing peptide/peptide interactions using H/D exchange, MS/MS and ESI-MS: structure and metal ion binding of gramicidin dimer. *Proceedings of the 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, Florida.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1-10.
- Daeshel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43, 164-167.
- Dall, W., Moriarty, D.J.W., 1983. General anatomy. In: GIANGUZZA A. (ed?), *The biology of Crustacea: Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation*, 215-261.
- Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 939-942.
- Das, S., Lyla, P.S., Ajmal Khan, S., 2006. Application of *Streptomyces* as a Probiotic in the Laboratory Culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah* 58, 198-204.
- Decamp, O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P., 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research* 39, 334-338.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Bossier, and W. Verstraete. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240, 69-88.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environ Microbiol* 7, 1239-1247
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T.K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2006. Quorum sensing—disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl Environ Microbiol* 72, 6419-6423.
- Dempsey, A.C., Kitting, C.L., Rosson, R.A., 1989. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* 56, 267-278.
- Devaraja, T.N., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture* 206, 245-256.
- Doeschate ten, K.I., Coyne, V.E., 2008. Improved growth rate in farmed *Halotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174-179.
- Erasmus, J.H., Cook, P.A., Coyne, V.E., 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Halotis midae*. *Aquaculture* 155, 377-386
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48, 149-158.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66, 365-378.
- Fuller, R., 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics: The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London, pp. 1-8.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La, pp. 53-59.

- Garriques, D., Wyban, J., 1993. Up to date advances on *Penaeus fannamei* maturation, nauplii and postlarvae production. Associacao Brasileira de Aquicultura. IV simpo'sio brasileiro sobre cultivo de camarao, 22–27 November, Brasil. pp. 217-235.
- Gatesoupe, F.J., Arakawa, T., Watanabe, T., 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 83, 39-44.
- Gatesoupe, F.J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 96, 335-342.
- Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic. *Vibrio*. Aquat. Living Resour. 7, 277-282.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147-165.
- Gatesoupe, F.J., 2002a. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. Aquaculture 21, 347-360.
- Gatesoupe, F.J., 2002b. Les probiotiques pour poissons: “sur mesure” ou “prêt-à-traiter” ? In: 7ème Bordeaux Aquaculture, 4ème Journée de la Nutrition, 20 September 2002, pp. 13–16.
- Gildberg, A., Johansen, A., Bogwald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138, 23-34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E., 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. Hydrobiologia 352, 279-285.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., 1998. Effect of supplementing the feed of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture 167, 103-113.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M., Abreu-Grobois, F., Roque, A., 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). Appl. Environ. Microbiol. 64, 2318-2322.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191, 259–270.
- Gorospe, J., Nakamura, K., Abe, M., Higashi, S., 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in artemia culture. Fish Sci 62, 914-918.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 969-973.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., Spanggaard, B., 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture 199, 1-11.
- Green, D., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. Appl Environ Microbiol 65: 4288-4291.
- Griffith, D.R.W., 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: Lavens, P., Jaspers, E., Roelands, I. Eds., Larvi '91-fish and crustacean larviculture symposium. European Aquaculture Society, Gent, p. 478, Special publication no. 24.
- Guerra, N.P., Fajardo Bernárde, P., Méndez, J., Cachaldora, P., Pastrana Castro, L., 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. Animal Feed Science and Technology 134, 89-107.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodri'guez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233, 1-14.
- Harris, J.M., 1993. The Presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microb Ecol. 25, 195-231.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews 29, 813-835.



- Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., Rosnes, J.T., 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272, 581-588.
- Immanuel, G., Citarasu, T., Sivaram, V., Michael Babu, M., Palavesam A., 2007. Delivery of HUFA, probiotics and biomedicine through bioencapsulated *Artemia* as a means to enhance the growth and survival and reduce the pathogenesis in shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquacult Int* 15, 137-152.
- Intriago, P., Krauss, E., Barniol, R., 1998. The use of yeast and fungi as probiotics in *Penaeus íannamei* larviculture. *Aquaculture* 98. World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 263.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Review probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633-642.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2004. Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 18, 299-313.
- Johnson, C.N., Barnes, S., Ogle, J., Grimes, 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, 251-258.
- Kailasapathy, K., 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol* 3, 39-48.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, J., Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14
- Kozasa, M., 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promoter for animal feeding. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 4, 121-135.
- Lakshmanan, R., Soundarapandian, P., 2008. Effect of commercial probiotics on large scale culture of Black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricus). *Research Journal of Microbiology* 3, 198-203.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193-201.
- Lee, Y.K., Lim, C.Y., Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Salminen, S., 2000. Quantitative Approach in the Study of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3692-3697.
- Li, J., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Xu, W., Liufu, Z., Ma, H., 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture* 253, 140-147.
- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuang, J., Zhang, G., Hong, H., 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.* 29, 525-530.
- Li, J., 2008. Immune Responses and Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* Induced by Probiotic Bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journam of the World Aquaculture Society* 39, 477-489.
- Lightner, D.V., 1993. Diseases of cultured penaeid shrimps. In: McVey, J.P. Ed., *CRC Handbook of Mariculture*. CRC Press, Boca Raton, pp. 393-486.
- Lilley, D.M., Stillwell, R.J., 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* 147, 747-748.
- Lin, H.Z., Guo1, Z., Yang, Y., Zheng, W., Li, Z.J., 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone *Aquaculture Research* 35, 1441-1447
- Lunestad, B. T. 1998. Impact of farmed fish on the environment, presentation by representative of Norway. In *Notes of the Workshop on Aquaculture/Environment Interactions: impacts on microbial ecology*. Canadian Aquaculture Society, Halifax, Nova Scotia, Canada.
- Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006. Gnotobiotically grown aquatic animals opportunities to investigate host-microbe interactions. *J Appl Microbiol* 100, 903-918.

- Maeda, M., and I. C. Liao., 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 21, 25-29.
- Matias, H.B., Yusoff, F.M., Shariff, M., Azhari, O., 2002. Effects of Commercial Microbial Products on Water Quality in Tropical Shrimp Culture Ponds. Asian Fisheries Science 15, 239-248.
- 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. Aquaculture Engineering 21, 215-227.
- Metchnikoff, E., 1907. The Prolongation of Life. Optimistic Studies. William Heinemann, London.
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K., Menasveta, P., 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 220, 437-448.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351-358.
- Moriarty, D.J.W., 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.), Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Mulder, R.W., Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H., 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman and Hall, London, pp. 187-207.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198, 229-236.
- Ochoa-Solano, J.L., Olmos-Soto, J., 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. Food Microbiology 23, 519-525.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek 82, 279-289.
- 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.
- Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menasveta, P., 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture 282, 83-89.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H., 2004. Immune response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology 102, 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 243, 241-254.
- Parker, R.B., 1974; Probiotics, the other half of the antibiotics story. Anim. Nutr. Health. 29, 4-8.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.-Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology 100, 1171-1185.
- Patra, S.K., Mohamed, K.S., 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. Aquaculture International 11, 505-514.
- Picchietti, S., Mazzini, M., Taddei, A.R., Renna, R., Fausto, A.M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A., Abelli, L., 2008. Effects of administration of probiotic strains on GALToF larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. Fish & Shellfish Immunology 22, 57-67.
- Planas, M., Vázquez, J.A., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M.P., Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer (*Branchionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture 240, 313-329.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. Aquaculture 227, 107-130.

- Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandian, S.K., 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x
- Reid, G., 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3763-3766.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 1998. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191, 271-288
- Rengpipat S, Tunyamum A, Fast AW, Piyatiratitivoraku S & Menasveta P., 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis. Aquat. Org.* 55, 169-173.
- Rengpipat, S., Wongtangprasert, N., Palaga, T., 2008. The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00594.x.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., Barbosa-Solomieu, V., 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* 280, 39-44.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., Villaescusa-Celaya, J.A., 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* 19, 1-6.
- Ringø, E., Gatesoupe, F-J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177–203.
- Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405-415.
- Sajeevan, T.P., Rosamma Philip, Bright Singh, I.S., 2006. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 257, 150-155.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K., 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10, 107-110.
- Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L.E., Vargas- Albores, F., Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176, 271-283.
- Shariff, M., Yusoff, F. M., Devaraja, T.N, Srinivasa Rao, P.S., 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. *Aquaculture Research* 32, 181-187.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection ? *Fish and Shellfish Immunology* 15, 71-90.
- Strøm, E., Ringø, E., 1993. Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* \_L..., larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water. In: Walther, B., Fyhn, H.J. Eds., *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development*. Univ. of Bergen. ISBN 82-992402-0-4, pp. 226-228.
- Subasinghe, R.P., M.B. Bondad-Reantaso and S.E. McGladdery. 2001. Aquaculture development, health and wealth, pp. 167-191. In: R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery and J.R. Arthur (Eds.) *Aquaculture in the Third Millennium*. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 Feb 2000. p. 471.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, S., Firat, K., Otgucuoglu, O., Küçüksari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140-145.
- Swain, P., Nayak, S.K., Nanda, P.K., Dash S., 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide(endotoxin) in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 191-201.
- Thomas, G.M., Ward, C.H., Raymond, R.L., Wilson, J.T., Loehr, R.C., 1992. Bioremediation. In: Leperberg, J. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 369-385.

- Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier P., 2007. Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. Marine biotechnology. DOI: 10.1007/s10126-007-9054-9.
- Uma, A., Abraham, T.J., Sundararaj, V., 1999. Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. Indian J. Fish. 46, 367-373.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 36, 83-87.
- Vaseeharan, B., Lin, J., Ramasamy, P., 2004. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonella anguillarum* like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. Aquaculture 241, 77-91.
- Van Hai, N., Fotadar, R., Buller, N., 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). Aquaculture 272, 231-239.
- Vandenberghe, J., Verdonick, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J., 1999. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. Applied and Environmental microbiology 65, 2592-2597.
- Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture 245, 149-161.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research 35, 501-507.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 1999. Microbial Control of the Culture of Artemia Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. Applied and environmental microbiology 65, 2527-2533.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000a. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 655-671.
- Vershuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000b. Selected bacterial strains protect Artemia spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. Applied and Environmental Microbiology 66, 1139-1146.
- Vieira, F.D.P., Pedrotti, S.F., Buglione Neto C.C., Pedreira Mouriño J.L., Beltrame, E., Laterça Martins, M., Ramirez, C., Vinatea, L.A., Arana, 2007. Lactic acid bacteria increase the survival of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Oceanography 55, 251-255.
- Vieira, F.D.P., Buglione Neto, C.C., Pedreira Mouriño, J.L., Jatobá, A., Ramirez, C., Laterça Martins, M., Barracco, M.A.A.A., Vinatea, L.A., 2008. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. Pesq. agropec. bras., Brasília 43, 763-769.
- Vijayan, K.K., Singh, I.S.B., Jayaprakash, N.S., Alavandi, S.V., Pai, S.S., Preetha, R., Rajan, J.J.S., Santiago, T.C., 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture 251, 192-200.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B., 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 1318-1323.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T., 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. J. Fish Dis. 27, 319-326.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 30, 404-427.
- Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S., 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. Fisheries Science 71, 1036-1041.
- Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 269, 259-264.
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture 281, 1-4.

- Yasuda, K., and N. Taga. 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer* 18, 53-62.
- Yu, J., Hino, R., Hirano, R., Hirayama, K., 1998. Vitamin B12-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54,1873-1880.
- Yu, M.C., Li, Z.L., Lin, H.Z., Wen, G.L., Ma, S., 2008. Effects of dietary *Bacillus* and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity, and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.* 16, 471-480.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516-524.

### **III Les modèles biologiques**

#### **III.1. Les crevettes pénéides**

Une nouvelle taxonomie des crevettes marines a été proposée par Pérez Farfante and Kensley (1997). Celle-ci reconnaît désormais sept familles et 56 genres de crevettes Penaeoidea et Sergestoidea. Un des changements importants concerne les espèces *Penaeus vannamei* et *P. stylirostris* qui sont désormais regroupées dans le genre *Litopenaeus*. Cette nouvelle classification ne fait cependant pas l'unanimité (Flegel, 2007a, a écrit un article intitulé “The right to refuse revision in the genus *Penaeus*”) et certains éditeurs conseillent l'utilisation du genre *Penaeus* (Alderman *et al.*, 2007).

Dans ce manuscrit nous utiliserons le nom de genre *Litopenaeus* afin de rester cohérent avec la dénomination utilisée par le Laboratoire Ifremer.

Il existe près de 2500 espèces de crevettes dans le Monde, cependant seules 12 d'entre elles font l'objet d'élevage. Ces dernières appartiennent toutes à la famille des Penaeidae, et parmi elles, deux espèces représentent 90 à 95 % de la production crevette mondiale: *Litopenaeus vannamei* et *Penaeus monodon*. Cela s'explique par le fait que ces deux espèces, dont la reproduction est bien maîtrisée, présentent un potentiel de croissance élevé et tolèrent bien des conditions d'élevage intensifiées (Jory & Cabrera, 2003). Ces dernières années, la production de *L. vannamei* a fortement augmenté, représentant près de 70 % de la production mondiale, et a dépassé celle de *P. monodon*, restée très longtemps l'espèce la plus importante.

### III.1.1. Présentation de l'espèce étudiée : *Litopenaeus stylirostris*

#### **Taxonomie**

La crevette *L. stylirostris*, communément appelée "crevette bleue", appartient à l'embranchement des Arthropodes, ordre des Décapodes, famille des Pénéides:

**Phylum** : Arthropoda

**Sous-phylum** : Crustacea

**Classe**: Malacostraca

**Sous-Classe** : Eumalacostraca

**Super-Ordre** : Eucarida

**Ordre**: Decapoda

**Sous ordre**: Dendrobranchiata

**Super-Famille**: Penaeoidea

**Famille** : Penaeidae

**Genre**: *Litopenaeus* (Perez Farfante, 1997)

**Espèce** : *Litopenaeus stylirostris*

#### **Origine et distribution**

Les crevettes péneides vivent par faibles profondeurs (0 à 25 m) et leur distribution est limitée à une zone déterminée par les isothermes de surface de 20°C en été, ce qui correspond à environ 40 degrés de latitude Nord et Sud. L'espèce *Litopenaeus stylirostris* est originaire d'Amérique centrale et du sud, son aire de répartition se situe essentiellement à la hauteur de la ceinture tropicale, plus particulièrement étendue entre le golfe de Californie et le sud du Pérou. *L. stylirostris* a une croissance plus rapide et tolère de plus faibles températures que *L. vannamei*.

*L. stylirostris* était couramment élevée dans plusieurs pays d'Amérique latine jusque dans les années 1980, date à laquelle est apparu le virus IHHNV auquel cette espèce est particulièrement sensible. Certaines souches domestiquées, comme celle présente en Nouvelle-Calédonie, ont développé une certaine tolérance à ce virus (Flegel, 2007b). Sur le

marché américain, *L. vannamei* et *L. stylirostris* sont commercialisées sous l'appellation «western white shrimp».

### Morphologie externe

Comme tous les Crustacés, les crevettes pénéides sont caractérisées par une métamérisation du corps, divisé en trois parties : tête (ou acron), thorax (ou péréion) et abdomen (ou pléion) terminé par le telson (Figure 1.7). Chez les Crustacés Décapodes, la tête et le thorax soudés forment le céphalothorax. Les crevettes de la famille des Penaeidae 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 ».

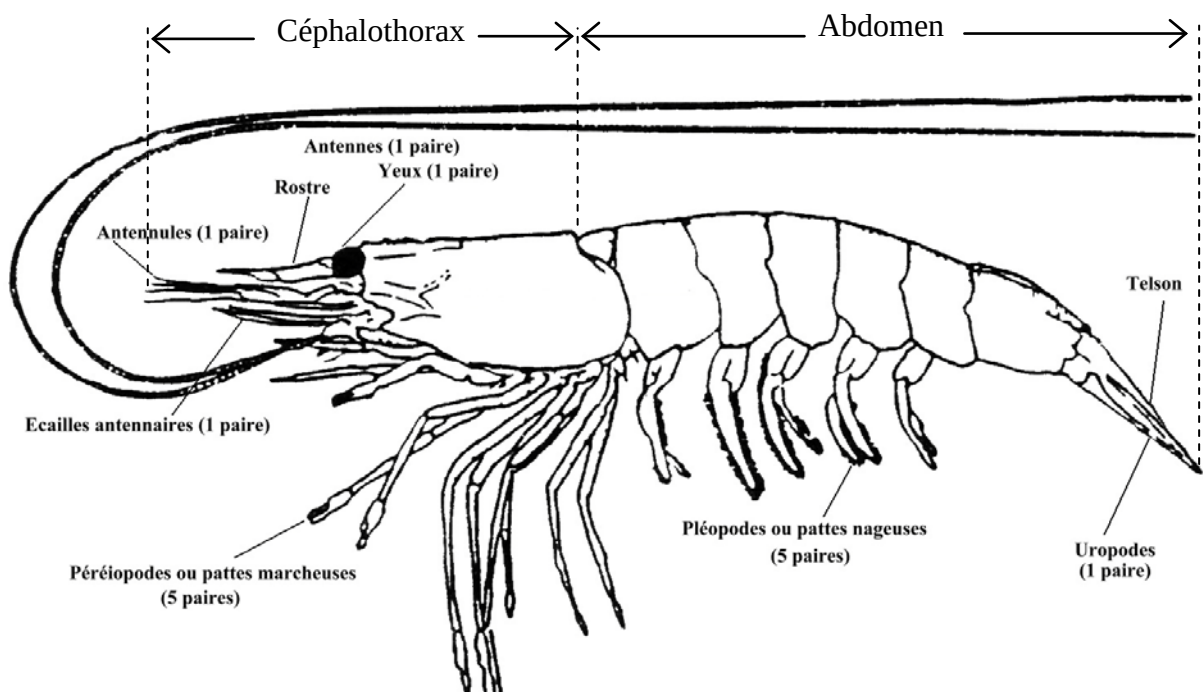


**Figure 1.7 :** Morphologie externe d'une crevette pénéide.



### III.1.2. Cycle biologique

Le cycle biologique des crevettes pénéides (Figure 1.8) comprend généralement trois phases, caractérisées par des changements successifs d'habitat pour les différents stades du développement :

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

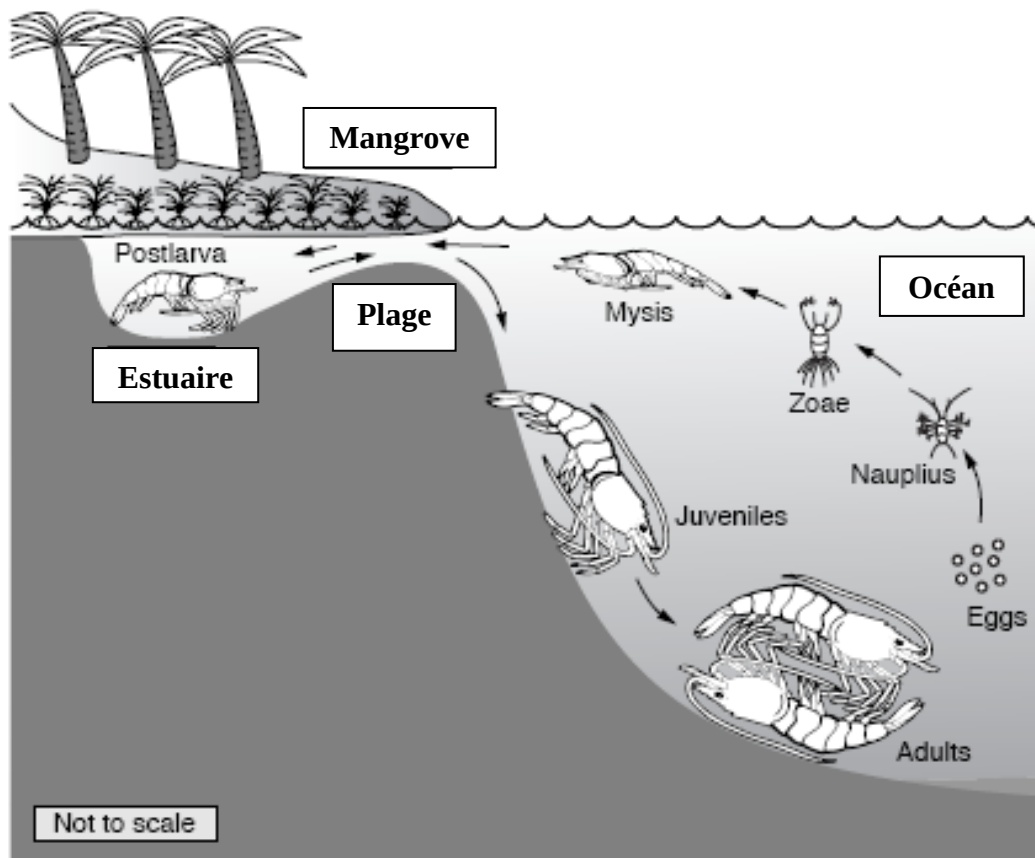


**Figure 1.8** : Cycle biologique des crevettes de mer (Rosenberry *et al.*, 2001)

L'accouplement ainsi que la ponte ont donc lieu en mer à quelques dizaines de mètres de profondeur. La fécondation est externe, les ovules étant fécondés au moment de leur expulsion. Les œufs sont d'abord pélagiques puis benthiques. Après 10 à 12 h de

développement embryonnaire, l'éclosion se produit et les nauplii sont libérés. Ce premier stade de développement est vitellotrophe, et est suivi de six stades naupliens successifs. Le dernier stade Nauplius donne alors naissance à la larve Zoé (3 stades) se nourrissant exclusivement d'algues phytoplanctoniques. La dernière forme Zoé (Zoé 3) se métamorphose ensuite en larve Mysis (3 stades) qui est strictement carnivore. La dernière métamorphose aboutit au stade post-larve (PL). L'animal présente alors la plupart des caractéristiques morphologiques de l'adulte. Les PL passent en quelques jours (10 à 20) d'une vie pélagique à benthique. Elles se concentrent généralement près des côtes, dans les estuaires ou les lagunes. Finalement, un mois et demi à deux mois sont nécessaires après l'éclosion pour que les animaux acquièrent l'ensemble des caractéristiques morphologiques de l'animal adulte. Après une période de croissance rapide de quelques semaines en lagune, où la production biologique est élevée et la nourriture abondante, les crevettes, mesurant alors 8 à 12 cm de longueur, quittent les lagunes pour retrouver la bande côtière. Une fois en mer, les crevettes vont poursuivre leur croissance pendant 8 à 12 mois avant de se reproduire. A l'état sauvage, le cycle prend une quinzaine de mois environ, alors qu'en élevage, un géniteur est obtenu en 9 à 10 mois.

### III.1.3. Cycle de mue

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 C), et la pré-mue (D0, 1, 2, 3, 4). *L'inter-mue* (stade C 4), ou intermue, est un état de stabilité physiologique, et pour cette raison, retenu et recherché pour les mesures effectuées dans le cadre de travaux expérimentaux. Des informations complémentaires sur les différents stades de mue sont présentées en Annexe 1.

### III.1.4. Nutrition

#### III.1.4.1. Quelques éléments d'anatomie

Les descriptions anatomiques de l'appareil digestif des crustacés remontent au 19<sup>ème</sup> siècle (Mocquar, 1883), cependant ces études n'apportaient pas d'informations sur la physiologie digestive. Au cours des dernières décennies, le développement de l'aquaculture a rendu nécessaire une meilleure compréhension des relations entre l'anatomie et les fonctions digestives des Décapodes, particulièrement chez les crevettes pénéides. Néanmoins, relativement peu de travaux ont été consacrés à l'enzymologie et à la physiologie digestive (Guillaume *et al.*, 1999).

Les principales particularités des Crustacés vis-à-vis des Vertébrés, commentées par Guillaume *et al.* (1999), peuvent être résumées de la façon suivante :

- l'existence de mues impliquant une croissance discontinue et des périodes de jeûne, et la nécessité d'un système performant de mise en réserve et d'utilisation des nutriments,
- le renouvellement de la paroi de l'intestin antérieur et postérieur au cours des mues, du fait de leur origine ectodermique,
- l'originalité des organes de mastication et d'absorption,
- l'implication de la glande digestive dans des fonctions variées, la digestion enzymatique mais aussi l'absorption, ainsi que le stockage des nutriments,
- l'existence d'enzymes spécifiques, à côté d'enzymes proches de celles des Vertébrés.

Plusieurs revues décrivant l'anatomie du tractus digestif existent (Dall et Moriarty, 1983 ; Ceccaldi, 1994), une version particulièrement synthétique étant proposée par Ceccaldi (1997). 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. Malgré l'usage de termes analogues, le l'estomac et la glande digestive des Crustacés sont des organes très différents, anatomiquement et par leurs fonctions, de l'estomac, 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 musculueux chez les crevettes péneides, 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 (Figure 1.9).

**L'estomac** est constitué d'une chambre cardiale et d'une chambre pylorique séparées par une sorte de valvule. Chez les crevettes péneides, la partie antéro-ventrale de la chambre cardiale comprend une crête garnie d'une rangée de 14 ossicules calcifiés et articulés.

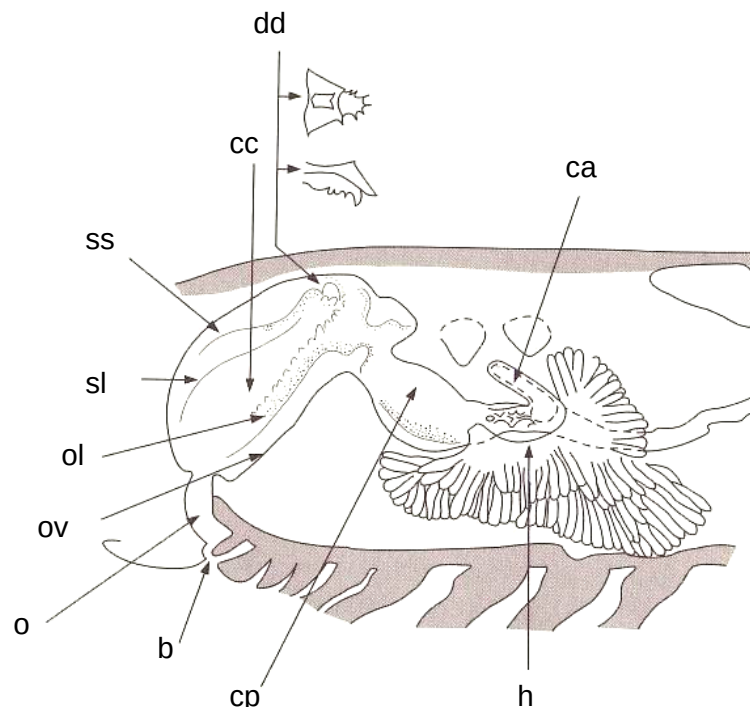


**Figure 1.9** : Appareil digestif d'une crevette péneide. (D'après Ceccaldi 1997). b, bouche ; ca, caecum antérieur ; cc, chambre cardiale ; cp, chambre pylorique ; dd, dent dorsale ; h, hépatopancréas ; o, œsophage ; ol, ossicules latéraux ; ov, ossicules ventraux ; sl, sillon latéral ; sv, sillon ventral

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'oesophage 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.

**La glande digestive** est l'organe majeur chez les Crustacés Décapodes et a de nombreuses fonctions physiologiques, comme souligné plus haut. Au plan anatomique, c'est un organe massif (2 à 6 % de la masse corporelle) constitué de deux lobes symétriques enveloppés de tissu conjonctif (Figure 1.9). 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 (Figure 1.10). Le diagramme schématisant d'un tubule, montrant les fonctions des cellules épithéliales pendant les différentes phases du cycle digestif, est présenté en Figure 1.11. 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 (Figure 1.10). Des études histologiques ont montrés quatre types cellulaires constitutifs de l'épithélium de ces tubules.

Ces cellules sont réparties en trois zones (Al-Mohanna & Nott, 1986):

- la zone distale où se produit la différenciation cellulaire à partir de cellules souches (cellules E),
- la zone intermédiaire fonctionnelle constituée de cellules stockant les produits finaux de la digestion (cellules R et M) et les cellules sécrétrices d'enzymes (cellules F et B),
- la zone proximale où les cellules dégénèrent et sont rejetées dans la lumière du tube digestif.

Précisons que les cellules F seraient les précurseurs des cellules B. La transition entre ces deux types cellulaires se ferait rapidement et pourrait être induite par la prise de nourriture (Lehnert & Johnson, 2002). Les cellules B interviennent dans la digestion intracellulaire (endocytose). Cependant, leur rôle dans la sécrétion des enzymes digestives n'avait pas été clairement établi, jusqu'à des travaux récents qui ont montré l'absence d'expression des gènes des enzymes digestives au niveau des cellules B et suggéré qu'elles sont impliquées dans la sécrétion des enzymes digestives, synthétisées au préalable au cours de la phase cellules F (Lehnert & Johnson, 2002 ; Hu & Leung, 2007). Hu et Leung (2007) ont montré la présence d'ARNm codant pour la Cathepsine L, une cystéine endopeptidase, au niveau des cellules F. De plus, ils ont observé une activité de cette enzyme au niveau des cellules B ainsi que dans le lumen de l'hépatopancréas et de l'estomac, démontrant ainsi la fonction sécrétrice des cellules B. Les enzymes digestives sécrétées par les cellules F et B permettent la digestion extracellulaire.

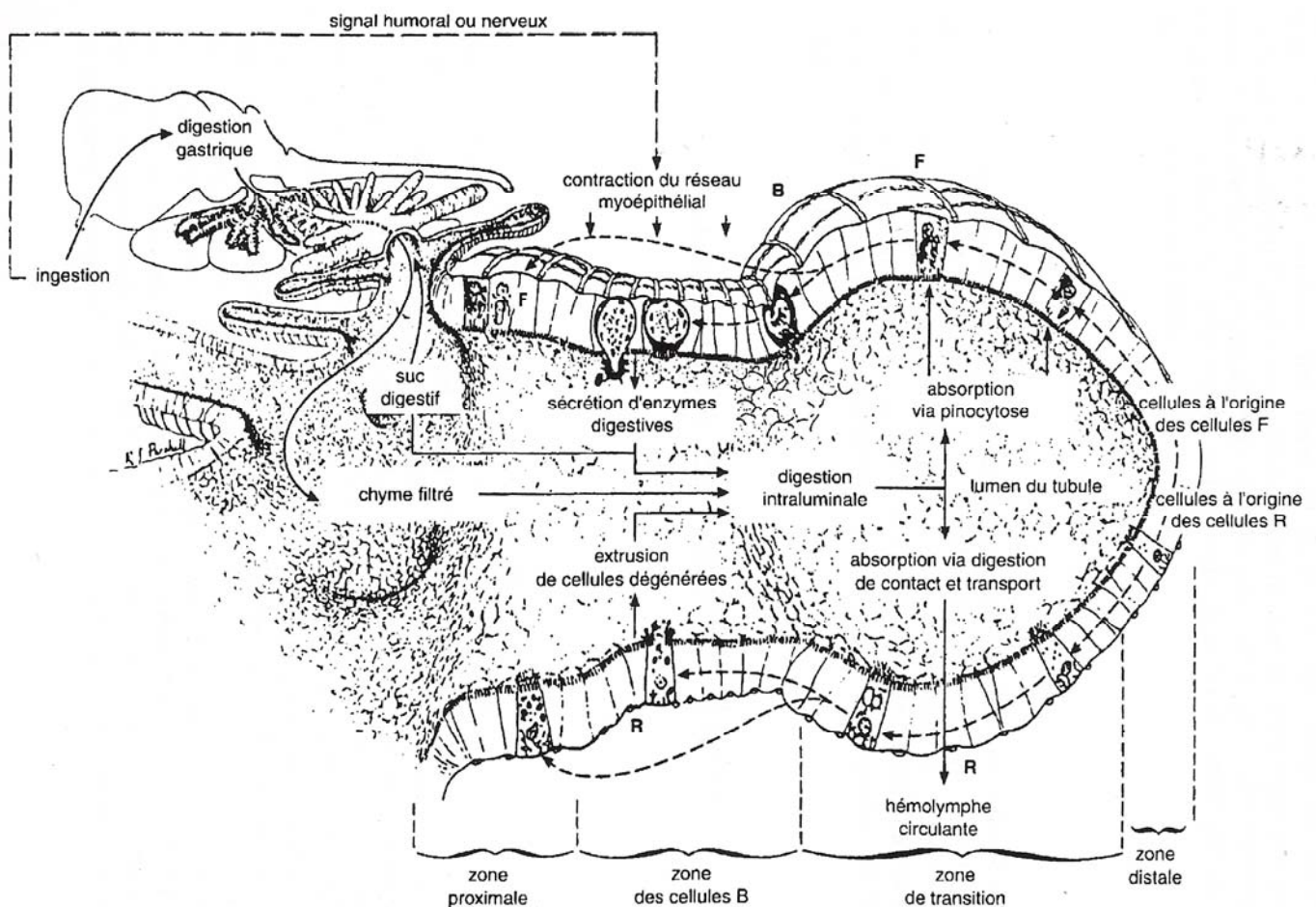


**Figure 1.10** : Représentation détaillée d'un tubule de l'hépatopancréas de crevette pénéides (d'après Ceccaldi, 1997).

Les produits de la digestion sont vraisemblablement absorbés par transport passif, actif ou diffusion facilitée (Figure 1.11). Bien que peu d'informations existent, cette absorption serait réalisée par l'ensemble des cellules épithéliales (à l'exclusion des cellules embryonnaires), cependant la structure des cellules M et R semble indiquer une certaine spécialisation dans cette fonction; les cellules R assurant aussi le stockage des réserves.

**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.

#### **III.1.4.2. Prise de nourriture et 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 :

1. La trituration et le broyage de l'aliment sont assurés par les appendices péri-buccaux 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.

2. 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 péneïdes 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.



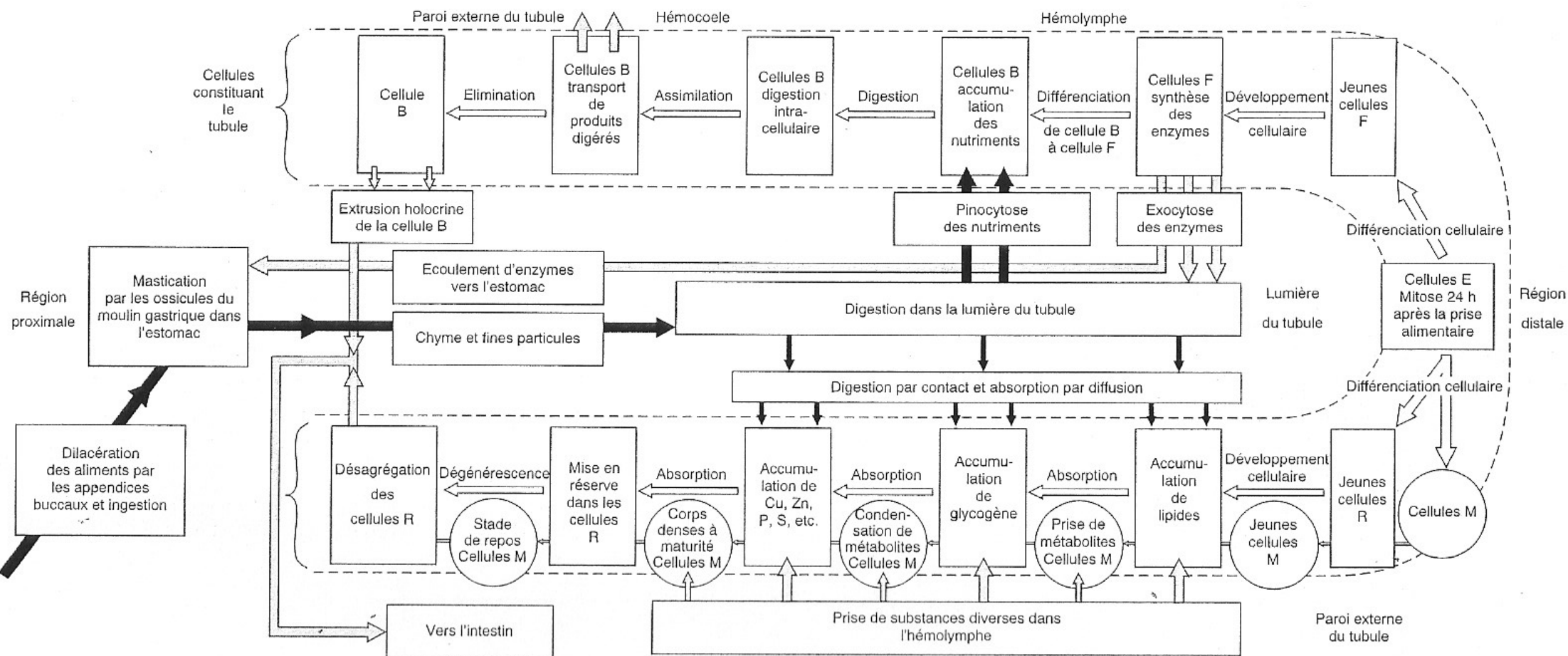


**Figure 1.11 :** Diagramme schématisé d'un tubule de l'hépatopancréas de *Penaeus semisulcatus*, indiquant les fonctions des cellules épithéliales pendant les différentes phases du cycle digestif (d'après Grassé, 1994).

### III.1.4.3. Les enzymes digestives

#### Les enzymes présentes

Les enzymes digestives chez les Crustacés sont produites par la glande digestive. Elles n'ont pas encore été totalement inventoriées, mais la liste des principales enzymes connues est présentée dans le tableau 1.6:

- les enzymes protéolytiques : parmi les protéases, la trypsine est la principale enzyme protéolytique. Sainz *et al.* (2005) ont démontré l'existence de 3 isoenzymes (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  $\alpha$ -1-3 (laminarinases) et  $\beta$ 1-4 (cellulases).

Certains auteurs se sont particulièrement intéressés à l' $\alpha$  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). Comme nous le verrons ci-après, 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 laminarinases sont assez mal connues mais seraient présentes, permettant l'hydrolyse de la laminarine des algues.

Les  $\beta$  glucanases interviendront également dans la dégradation des glucanes présents dans les parois de nombreux micro-organismes (Wigglesworth & Griffith, 1994).

Outre l' $\alpha$  glucosidase, d'autres enzymes hydrolysant les dimères glucidiques ont été répertoriées, avec notamment : la  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase (chitobiase), les  $\beta$ -glucosidases, les cellulases, saccharase, mannosidase. Des glucuronidases 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.

**Tableau 1.6** : Principales enzymes digestives répertoriées chez les crustacés (d'après Ceccaldi *et al.*, 1997, avec modifications)

| Catégorie     | Enzyme               |
|---------------|----------------------|
| Endoprotéases | Trypsine             |
|               | Chymotrypsine        |
|               | Astacine             |
| Exoprotéase   | Carboxypeptidase     |
|               | Aminopeptidase       |
|               | Dipeptidase          |
| Glucidases    | Amylase              |
|               | Chitinase            |
|               | Laminarinase         |
|               | cellulase            |
|               | glucuronidases       |
| Glucosidases  | Malatse              |
|               | Chitobiase           |
|               | Laminaribiase        |
| Lipase        | Lipases pancréatique |
|               | Estérases            |
| Diverses      | Ribonucléases        |
|               | Désoxyribonucléase   |
|               | Phosphatase          |

Ainsi, de nombreux travaux de caractérisation des enzymes digestives chez les Crustacés ont été réalisés (Galgani, 1983, 1984 ; García Carreño, 1994 ; Hernandez-Cortes, 1997), mais peu d'études quantitatives (Lee & Lawrence, 1982 ; Lee *et al.*, 1980, 1984 ; Hernandez-Cortes *et al.*, 1999). En ce qui concerne les crevettes pénéides, l'étude des enzymes digestives est

apparue comme une étape importante dans la compréhension des mécanismes de la digestion afin d'améliorer la formulation des aliments composés et la gestion de l'alimentation.

### **Les variations de l'activité enzymatique**

D'une manière générale, la nature et les activités des enzymes digestives seraient liées au comportement alimentaire de l'animal. De plus, pour une espèce donnée, les activités enzymatiques varieraient en fonction de la composition, de la quantité d'aliment ingéré (Van Wormhoudt, 1980 ; Le Moullac *et al.*, 1996 ; Guzman *et al.*, 2001 ; Lopez-Lopez *et al.*, 2005), et d'autres facteurs, biotiques et abiotiques:

- Les facteurs abiotiques
  - Le pH, la zone de pH optimal se situant entre 5,5 et 9 (García-Carreño *et al.*, 1994)
  - La température (Galgani, 1985)
  - La salinité (Li *et al.*, 2008)
- Les facteurs biotiques:
  - Le stade de développement (Lovett & Felder, 1990 ; Ribeiro & Jones, 2000)
  - Le stade de mue (Van Wormhoudt, 1972 ; Fernandez, 1997 ; Muhlia-Almazán, & García-Carreño, 2002)
  - La taille et le poids des animaux (Lee *et al.*, 1984 ; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003 )
  - Le comportement alimentaire (Lemos *et al.*, 1999)
  - La composition du régime alimentaire (Van Wormhoudt *et al.*, 1980)
  - Le jeûne (Muhlia-Almazán & García-Carreño, 2002 ; Comoglio, 2004)
  - Les conditions d'élevage (Moss, 2001)

Nous nous attacherons ici à détailler principalement l'effet de quelques facteurs alimentaires sur l'activité des principales enzymes digestives chez les crevettes sub-adultes, en faisant abstraction de l'effet des facteurs abiotiques et du stade de développement (Lovett & Felder, 1990). Notons, d'une part, la rareté des travaux réalisés sur la régulation de la synthèse et de l'activité des enzymes digestives et, d'autre part, la diversité des approches expérimentales

utilisées (Lee *et al.*, 1980). La littérature dans ce domaine présente donc des résultats souvent contradictoires, mais quelques grandes tendances peuvent être définies.

Les premiers travaux réalisés ont mis en évidence l'existence d'un rythme circadien dans l'activité des principales enzymes digestives. Ainsi Van Wormhoudt *et al.* (1972) ont montré chez *P. kerathurus* pour les protéases -dont la trypsine et la chymiotrypsine- et les amylases, deux pics d'activité, à la tombée de la nuit (21 h) et plusieurs heures après la prise de nourriture (9 h). Ces auteurs ont de plus montré que ce rythme circadien, bien que moins marqué, semblait se maintenir lors du jeûne, invoquant un possible contrôle hormonal de la sécrétion enzymatique. Ces observations ont également été rapportées par Hernandez-Cortes *et al.* (1999) chez *L. vannamei*. Trellu et Ceccaldi (1977) ont émis l'hypothèse d'un contrôle hormonal des sécrétions enzymatiques, lié à une stimulation par la lumière.

Ces mêmes auteurs (Trellu & Ceccaldi, 1976) se sont également intéressés aux variations des activités des enzymes digestives au cours du cycle de mue. Ils ont ainsi montré en prémue une augmentation des activités de 19 enzymes digestives, avec l'élévation des réserves énergétiques, comme le glycogène, dans la glande digestive. Klein *et al.* (1996) ont montré une forte augmentation de l'activité tryptique et de la concentration en ARN messagers codant pour la trypsine, dans la glande digestive de *L. vannamei* en prémue. Fernandez *et al.* (1997) ont également rapporté des variations d'activité de la trypsine et de l'amylase chez *P. notialis* au cours du cycle de mue et à différents niveaux de maturité ovarienne. Ces auteurs ont montré des maxima d'activité de ces enzymes en intermue et aux premiers stades de prémue, qu'ils ont reliés à une plus grande prise de nourriture des animaux à ces stades. Ce lien entre activité digestive et prise de nourriture a également été démontré chez *L. vannamei* par Hernandez-Cortes *et al.* (1999).

La composition du régime alimentaire, et le jeûne, semblent également être deux facteurs influençant significativement l'activité des enzymes digestives. Chez *L. vannamei*, un stress alimentaire comme le jeûne modifie grandement l'activité de la trypsine (Mulhia-Almazán & García-Carreño, 2002). De façon générale, le jeûne conduit à une diminution des activités totales des enzymes digestives mesurées (Lee *et al.*, 1984 ; Mulhia-Almazán *et al.*, 2002 ; Comoglio *et al.*, 2004). Lee *et al.* (1984) ont montré chez *L. vannamei* à jeun depuis 30 jours une diminution des activités totales des enzymes protéasiques bien que leurs activités spécifiques n'aient pas été modifiées. Ces auteurs ont noté cependant une diminution des

protéines solubles ayant pu maintenir artificiellement les niveaux d'activités enzymatiques spécifiques. De leur côté, Cuzon *et al.* (1980) ont montré une chute de ces activités spécifiques lors d'un jeûne prolongé, chute qui pourrait s'expliquer par les modifications cellulaires observées dans la glande digestive après un jeûne prolongé (Vogt *et al.*, 1985). Par ailleurs, Mulhia-Almazán et García-Carreño (2002) ont montré une diminution progressive du poids de la glande digestive et des activités de la trypsine et de la chymotrypsine chez *L. vannamei* au cours d'un jeûne de 120 heures. Ces baisses d'activités enzymatiques peuvent être reliées à l'absence de nourriture ou à une baisse des réserves en acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines. Cependant, Lehnert et Johnson (2002) ont montré, chez *P. monodon* maintenu à jeun, que les cellules F de la glande digestive restaient actives transcriptionnellement. Pour leur part, Sanchez-Paz *et al.* (2003) ont montré, dans les 24 heures suivant le début du jeûne, une élévation des concentrations en ARN messagers codant pour la trypsine suivi d'une forte chute. Ce phénomène serait lié à un mécanisme adaptatif des animaux qui, habitués à recevoir leur nourriture à intervalle de temps plus ou moins réguliers, se prépareraient à la digestion. La chute subséquente de la concentration en transcrit serait une stratégie en vue de diminuer l'énergie allouée à la synthèse protéique.

Certains auteurs se sont intéressés à l'effet de la composition centésimale de l'aliment composé sur l'activité des principales protéases et amylases. Rappelons cependant que Van Wormhoudt *et al.* (1980) ont proposé de relier les activités des enzymes digestives à la quantité d'aliment ingérée afin de raisonner ces activités selon la quantité des principaux constituants du régime (protéines, lipides, glucides) plutôt que leur teneur, généralement exprimée en % du régime. Cependant ce principe n'a été que très peu utilisé lors de travaux ultérieurs. La majorité des travaux ont visé à évaluer l'effet de la teneur en protéines et en carbohydrates sur l'activité des principales enzymes digestives. Ainsi, les activités de ces enzymes seraient d'autant plus fortes que les substrats considérés seraient plus représentés dans l'aliment (Cox, 1981). Une corrélation positive entre la teneur en protéines de l'aliment et l'activité des protéases a été montrée chez différentes espèces de Crustacés: *Palaemon serratus*, *Homarus gammarus*, *L. vannamei*, *Cherax quadricarinatus* (Van Wormhoudt *et al.*, 1980 ; Lucien-Brun *et al.*, 1985 ; Le Moullac *et al.*, 1994, 1996 ; Lopez-Lopez *et al.*, 2005). En étudiant différents teneurs en protéines et en carbohydrates dans l'aliment, Van Wormhoudt *et al.* (1980), ont observé, chez *P. serratus*, que les activités enzymatiques semblaient être liées au ratio des teneurs en protéines sur carbohydrates. Ces auteurs ont ainsi déterminé les ratios protéines:carbohydrates conduisant aux maxima d'activités amylasiques et protéasiques. Ils ont par ailleurs montré un lien entre le niveau des activités des enzymes

digestives et la croissance des animaux. Cependant ce ratio protéines sur glucides ne peut à lui seul expliquer les variations des activités enzymatiques et des croissances. Des interactions avec d'autres nutriments (acides aminés, sucres, acides gras, sels minéraux, oligoéléments, vitamines...) doivent être considérées. La relation positive liant le taux de protéines dans l'aliment et la croissance a été également montrée chez *L. vannamei* par Le Moullac *et al.* (1996) en utilisant la caséine comme source de protéines. Cependant l'utilisation d'autres sources de protéines (gélatine, farine de calmar) par les mêmes auteurs n'a pas permis de confirmer cette relation. De la même façon, Guzman *et al.* (2001) ont montré chez des post-larves de *L. setiferus* une relation claire entre la croissance et le pic d'activité des protéinases totales, de la trypsine et de l' $\alpha$  amylase pour un aliment à 400g.kg<sup>-1</sup> de protéines, bien que les corrélations mesurées n'étaient significatives qu'entre le gain de poids et l'activité amylasique.

A l'inverse des résultats précédents, Lee et Lawrence (1985) avaient montré chez *L. setiferus* qu'une augmentation de la teneur en protéines de l'aliment entraînait une diminution de l'activité protéasique. Ces résultats suggèrent un mécanisme d'adaptation des animaux à des faibles niveaux de protéines dans l'aliment (Moss *et al.*, 2001). Dans une autre étude, Lee *et al.* (1984) ne montrèrent pas de corrélation entre les activités des protéases digestives et la croissance des animaux. Ces résultats contradictoires suggèrent, comme nous le verrons par la suite, l'implication d'autres facteurs influençant la variation des activités des enzymes digestives. Par exemple, au-delà de l'effet quantitatif des protéines de l'aliment, Lee *et al.* (1984) ont montré un effet de l'origine des protéines utilisées (animales ou végétales) sur l'activité des protéases digestives et sur la croissance de *L. vannamei*. Cet effet est exacerbé chez les petits animaux (9-11 g) comparativement aux animaux plus gros (20,8 g) suggérant une plus grande capacité à utiliser les protéines chez les premiers.

L'activité de l' $\alpha$  amylase semble également être fonction de la quantité et de la qualité des carbohydrates apportés par l'aliment (Cousin *et al.*, 1996; Rosas *et al.*, 2000). Guzman *et al.* (2001) ont ainsi rapporté des activités  $\alpha$  amylasique significativement plus faibles chez des crevettes d'élevage comparées aux animaux sauvages; cette différence pouvant être liée à un apport plus important de carbohydrates dans l'alimentation naturelle de ces derniers. Le Moullac *et al.* (1996) et Guzman *et al.* (2001) ont suggéré un contrôle de l'activité amylasique par le contenu énergétique de l'aliment.

Les ratios des activités amylases sur protéases (A/P) ou sur trypsine (A/T) ont été utilisés comme indicateurs du changement de régime alimentaire. Gamboa-Delgado *et al.* (2003) ont

ainsi montré chez *L. vannamei* une élévation de ces ratios avec le poids des animaux, suggérant un changement de régime alimentaire des animaux après 2 g. Cependant les valeurs de ces ratios sont parfois difficiles à interpréter sans apports d'informations complémentaires (Guzman *et al.*, 2001).

D'autres nutriments présents dans l'aliment peuvent également venir moduler l'activité digestive. Notons l'effet stimulant de l'acide ascorbique (vitamine C) sur l'activité amylasique (Maugle *et al.*, 1982) et l'implication de facteurs de croissance (présents dans le calmar) sur l'activité spécifique de l'amylase, de la trypsine et des protéases totales chez la crevette *Marsupenaeus japonicus* (Van Wormhoudt *et al.*, 1986).

Le milieu d'élevage pourrait également influencer les activités des enzymes digestives des crevettes. Ainsi, Moss *et al* (2001) ont montré des activités des enzymes digestives plus hautes chez des crevettes (*L. vannamei*) élevées dans de l'eau provenant de bassins d'élevage que chez celles élevées dans de l'eau pompée directement dans le lagon. L'eau du bassin d'élevage apporterait donc des facteurs capables de stimuler l'activité enzymatique du tractus digestif des crevettes.

En conclusion, les mécanismes de régulation des enzymes digestives chez les crevettes restent très peu connus. Différentes hypothèses ont été proposées et doivent encore faire l'objet de recherches approfondies. Retenons l'hypothèse du contrôle hormonal, via des peptides ayant un rôle équivalent à la cholecystokinine (CCK), (Zambonino Infante & Cahu, 2007) ou des hormones spécifiques des Crustacés tel que la CHH (hormone hyperglycémiant des crustacés) (Keller & Sedlmeier, 1988). Enfin des régulations transcriptionnelles, voire post-transcriptionnelles, de la synthèse des enzymes digestives, sont également probables (Mulhia-Almazán *et al.*, 2003) mais restent à démontrer.

#### **III.1.4.4. Digestibilité et besoins nutritionnels**

Des mesures de digestibilité ont été conduites chez les crevettes pénéides avec des aliments complets ou des ingrédients entrant couramment dans la composition de ces derniers (Lee & Lawrence, 1997; Brunson *et al.*, 1997). D'une manière générale, ces mesures ont été conduites par la méthode indirecte reposant sur l'utilisation d'un marqueur inerte et la détermination de sa concentration dans les fèces (Smith & Tabrett, 2004). Les coefficients



d'utilisation digestive (CUD) sont généralement supérieurs à 90 % pour les protéines, autour de 80 % pour les lipides, et compris entre 70 et 94 % dans le cas de l'amidon. Les CUD de ces différents nutriments peuvent varier avec la nature et le traitement technologique des matières premières utilisées. La digestibilité peut également varier en fonction de différents facteurs biotiques comme la taille des animaux, ou abiotiques comme la température. Quoiqu'il en soit, la régulation de la digestibilité chez les crustacés a été peu étudiée et reste un domaine à explorer.

En complément aux études de digestibilité, de nombreux travaux se sont intéressés aux besoins nutritionnels des crevettes pénéides (D'Abramo *et al.*, 1997). Nous nous limiterons ici à présenter les principales informations disponibles sur les besoins en protéines, carbohydrates et lipides.

### **Besoins en protéines et ratio protéines/énergie**

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, 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...). Le tableau 1.7 résume les teneurs optimales en protéines des aliments pour différentes espèces de crevettes d'élevage.

Cependant, très peu d'études ont été menées pour quantifier les besoins en protéines. Parmi celles-ci, notons celle de Kureshy et Davis (2002) qui 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 %.

Au delà du contenu protéique, la valeur énergétique ainsi que le ratio protéines:énergie dans l'aliment a son importance. Dans une revue, Cuzon et Guillaume (1997) proposent d'utiliser le ratio protéines:énergie (P:E) en formulation afin d'optimiser la croissance et l'indice de conversion (FCR). De façon générale, un rapport P:E proche de 20 mg de protéines par KJ semble adéquat chez *L. vannamei* (Cuzon *et al.*, 2004 ; Hu *et al.*, 2008). Des expérimentations ont permis de déterminer des compositions optimales de l'aliment à 40 % de protéines, 17 KJ.g<sup>-1</sup> d'énergie digestible et un ratio P:E de 23 mg de protéines. KJ<sup>-1</sup> (Cuzon *et al.*, 2004).

**Tableau 1.7 :** Teneurs optimales en protéines de l'aliment chez différentes espèces de crevettes pénéides.

| Espèce                 | Stade de développement-poids | Teneurs en proteines étudiés (%) | Teneur optimale (%) | Référence                    |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| <i>P. japonicus</i>    | 4 à 6 g                      | 2-66                             | 52-57               | Deshimaru and Yone, 1978     |
| <i>P. merguensis</i>   | 0.01g                        | 17-51                            | 34-42               | Sedgwick, 1979               |
| <i>P. monodon</i>      | 0.5-1.8                      | 2-62                             | 45-50               | Lee, 1971                    |
|                        | 1.3                          | 25-60                            | 40                  | Alava and Lim, 1983          |
|                        | 0.8                          | -                                | 40                  | Shiau <i>et al.</i> , 1991   |
| <i>P. setiferus</i>    | 4.0                          | 14-52                            | 28-32               | Andrews <i>et al.</i> , 1972 |
|                        | 3.7, 9.8, 14.7               | 22-36                            | 30                  | Lee and Lawrence, 1985       |
| <i>L. stylirostris</i> | 0.05                         | 25-40                            | 35                  | Colvin and Brand, 1977       |
|                        | 4-5                          | 27-44                            | 33                  | Baillet <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>L. vannamei</i>     | 0.03                         | 25-40                            | 30                  | Colvin and Brand, 1977       |
|                        | 4.0, 9.8, 20.8               | 22-36                            | 30-35               | Smith <i>et al.</i> , 1985   |
|                        | 1.7                          | -                                | 30                  | Cousin <i>et al.</i> , 1993  |
|                        | 3.1                          | 30-40                            | 35-40               | Burford <i>et al.</i> , 2004 |

Enfin, dans les aliments commerciaux destinés aux crevettes, les matières premières sources de protéines sont principalement d'origine marine (farine de poisson, farine de calmar). Néanmoins, des résultats semblent indiquer qu'une substitution, du moins partielle, de ces matières premières par des protéines d'origine végétale est possible. Plusieurs travaux récents vont dans ce sens (Davis *et al.*, 2002 ; Amaya *et al.*, 2007) mais des recherches supplémentaires sont plus que jamais nécessaires avant d'envisager une telle substitution à l'échelle industrielle.

## Besoins en carbohydrates

Les carbohydrates (CHO) comprennent les sucres, les amidons, les fibres, et sont essentiellement composés d'éléments carbonés, d'hydrogène et d'oxygène. L'utilisation des carbohydrates comme source de nutriments par les espèces aquatiques est plus faible que chez les animaux terrestres (Shiau, 1997). Cependant, l'utilisation des carbohydrates à des niveaux élevés dans l'aliment composé a plusieurs intérêts : (i) ils présentent des propriétés technologiques intéressantes (rôle texturant important pour la stabilité à l'eau des granulés), (ii) ils permettent une réduction des coûts de l'aliment en réduisant les teneurs en protéines, (iii) et ils permettent de limiter les rejets azotés, réduisant ainsi l'impact environnemental. Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de différents niveaux d'inclusion de CHO dans l'aliment sur la digestion, la croissance et le métabolisme des crevettes pénéides (Cousin, 1995 ; Rosas *et al.*, 2000, 2002). La capacité de différentes espèces de crevettes à utiliser les CHO dépend de leur aptitude à oxyder le glucose et à le stocker sous forme de glycogène ou de lipides (Guo *et al.*, 2006). L'aptitude à digérer les CHO est importante chez des espèces comme *L. vannamei* et *L. stylirostris*, mais dépend de la source et du type de CHO utilisés (Cousin *et al.*, 1996). Parmi les CHO disponibles, les amidons et autres sucres complexes présentent des valeurs de digestibilité élevées, généralement comprises entre 80 et 90 % (Cousin *et al.*, 1996). Les sucres simples ont par contre des effets délétères en terme de croissance (Abdel-Rahman *et al.*, 1979). Ces derniers seraient trop rapidement absorbés au niveau du tractus digestif, conduisant à une élévation anormale de la concentration sanguine en glucose, limitant ainsi son utilisation comme source d'énergie. Dans le cas des sucres complexes comme les amidons, une hydrolyse enzymatique préalable ralentit l'assimilation du glucose et permet une meilleure utilisation (Shiau, 1998). Les carbohydrates, et l'amidon en particulier, sont une bonne source d'énergie pour la crevette et permettent l'économie de protéines, comme cela a été montré chez *P. monodon* (Shiau & Peng, 1992 ; D'Abramo *et al.*, 1997).

La digestion des carbohydrates complexes (amidon) fait intervenir différentes enzymes (Figure 1.12). L' $\alpha$  amylase hydrolyse les liaisons  $\alpha$ 1-4 de l'amidon, produisant des oligosaccharides qui sont alors hydrolysés en glucose sous l'action de la  $\alpha$  glucosidase. Les amylases de crevette sont très efficaces pour digérer l'amidon de blé (Cousin, 1995). Le glucose est ensuite phosphorylé sous l'action d'hexokinases au niveau des cellules de la glande digestive et pourra être utilisé dans différentes voies métaboliques (i) comme substrat énergétique (glycolyse), (ii) pour synthétiser du glycogène, (iii) pour produire du NADPH et

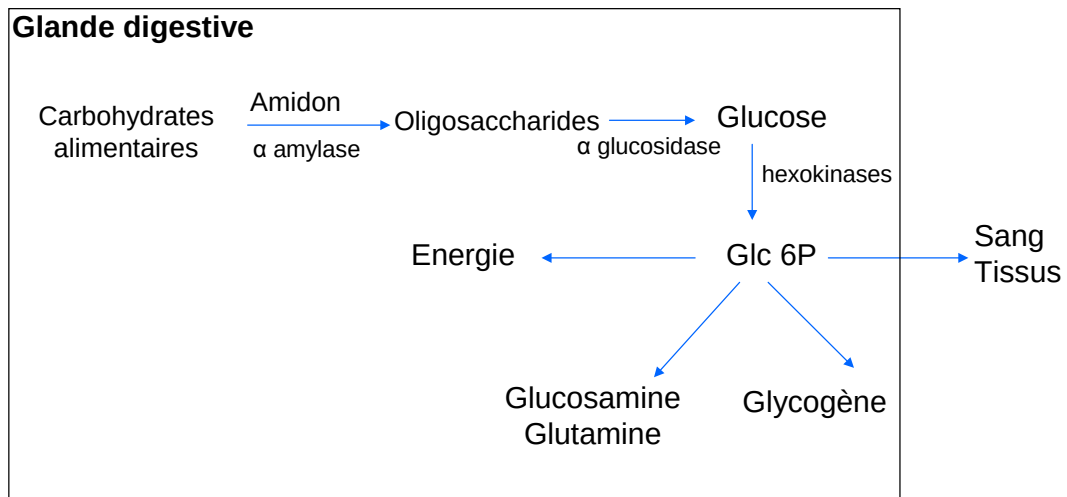
du ribose-5-phosphate via la voie des pentoses (synthèse d'acides nucléiques) (iv) ou comme source de glucosamine ou glutamine entre autres nécessaires à la synthèse de chitine. Rosas *et al.* (2002) ont montré que, pour des niveaux d'inclusion supérieurs à 33 % des CHO dans l'aliment, la capacité amylasique et la saturation en glycogène dans la glande digestive étaient des facteurs contrôlant l'utilisation des carbohydrates. Chez *L. stylirostris*, une élévation de la teneur en CHO dans l'aliment conduit à une stimulation des activités de l'amylase et de l' $\alpha$  glucosidase, mais, pour une teneur supérieure à 21 %, on assiste à une saturation de l'activité amylasique et de la concentration en glycogène dans la glande digestive (Rosas *et al.*, 2000). Ces résultats laissent penser que le niveau maximal de CHO dans l'aliment pourrait être défini sur la base de l'activité amylasique et du seuil de saturation en glycogène dans la glande digestive.

Le glycogène stocké dans la glande digestive est sujet à des variations importantes au cours du cycle de mue, avec une tendance à l'accumulation progressive jusqu'à la mue (Cuzon *et al.*, 2000). Suite à un jeûne, une baisse rapide et significative de la concentration en glucose sanguin et dans la glande digestive, ainsi qu'une forte chute du glycogène dans cet organe, ont été observées (Sanchez-Paz *et al.*, 2007). D'après ces auteurs, chez les animaux à jeun le glucose serait la première source d'énergie mobilisée avant les lipides puis les protéines.

Cuzon *et al.* (2004) rapportent qu'il est difficile d'établir des besoins optimaux en CHO. Cependant, en dessous d'un certain niveau de CHO dans l'aliment, et dans certaines conditions expérimentales (faible salinité), le métabolisme des protéines et la croissance de la crevette pourraient être affectés (Rosas *et al.*, 2000 ; 2001). Rosas *et al.* (2000) suggèrent ainsi que 10 % de CHO dans l'aliment ne seraient pas suffisants pour couvrir les besoins de l'animal, qui compenserait en utilisant les protéines via la voie de la néoglucogenèse. Ainsi le métabolisme des CHO apparaît étroitement lié à celui des protéines. Rosas *et al.* (2002) ont ainsi proposé un modèle énergétique prenant en compte l'adaptation physiologique des animaux en fonction des teneurs en CHO et en protéines de l'aliment.

Enfin, des travaux récents réalisés chez *L. vannamei* et *L. stylirostris* ont montré une baisse de la capacité à utiliser les carbohydrates chez les souches domestiquées depuis plusieurs générations comparées à des crevettes sauvages (Pascual *et al.*, 2004; Gauquelin *et al.*, 2007). Une des explications résiderait dans le fait que la consanguinité chez les animaux d'élevage aurait conduit à une diminution de la fréquence allélique des gènes de l'amylase (Arena *et al.*,

2003). Pascual *et al.* (2004) suggèrent pour leur part que le processus de sélection pourrait avoir conduit à une limitation de la capacité de synthèse de protéines via le processus de trans-amination pour des niveaux élevés de CHO dans l'alimentation, avec des conséquences sur les besoins en protéines des animaux domestiqués.



(D'après Rosas *et al.*, 2002 simplifié)

**Figure 1.12** : Schéma simplifié de l'hydrolyse des sucres complexes chez la crevette *L. vannamei* (d'après Rosas *et al.*, 2002, simplifié).

## Besoins en 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 structurels 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, 1997 ; Teshima *et al.* 1997). 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 variants 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 (AGE) tel que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (HUFA). Ils ont en effet des capacités limitées en terme d'élongation et de désaturation des acides gras linoléique et linolénique. Il a ainsi été montré chez des juvéniles de *L. vannamei* que les HUFAs de la série n-3 tels que l'acide arachidonique (AA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA), et l'acide docosahexaénoïque (DHA) avaient des valeurs nutritionnelles supérieures à celles des HUFA de série n-6 (Gonzalez-Felix *et al.*, 1993). En général les besoins recommandés en acides gras essentiels (AGE) 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).

### **Conclusion sur l'étude des besoins**

La majorité des travaux de nutrition réalisés chez les crevettes pénéides se sont intéressés à définir les niveaux d'inclusion des principaux nutriments dans l'aliment permettant la croissance maximale des animaux. Cependant, comme le souligne Kureshy et Davis (2002), un niveau faible d'un nutriment peut être compensé par une augmentation de la quantité d'aliment ingéré. Dans ces conditions, la valeur optimale d'inclusion d'un nutriment peut être faussée. Ces auteurs ont donc proposé de définir les besoins nutritionnels sur la base de la quantité ingérée du nutriment étudié plutôt que sur celle de sa concentration dans l'aliment. Cela peut être réalisé en mesurant précisément l'ingéré par différentes méthodes : (i) la mesure de la quantité d'aliment en excès ou (ii) la relation croissance-ration définie pour les poissons (Brett, 1979). Cette seconde méthode, couplée à des approches bioénergétiques, permet de prédire la croissance, de quantifier les besoins énergétiques et nutritionnels tout en déterminant précisément l'efficacité d'utilisation de l'aliment comme cela a été réalisé chez la daurade (Lupatsch & Kissil, 1998) et le bar (Lupatsch *et al.*, 2001). La littérature offre peu

d'exemples d'utilisation de méthodologies similaires chez les crevettes pénéides. Sedgwick (1979) a utilisé cette méthode afin d'évaluer l'effet de la fréquence d'alimentation sur la croissance de *Penaeus merguensis*. Plus récemment, Kureshy et Davis (2002) ont utilisé la même approche afin de définir les besoins quantitatifs en protéine nécessaires à l'entretien et à la croissance maximale chez *L. vannamei*. Des travaux préliminaires, conduits par notre équipe chez *L. stylirostris* (Wabete *et al.*, 2006, Chim *et al.*, 2006), ont utilisé la méthode croissance-ration afin d'évaluer l'effet de la fréquence d'alimentation et de l'apport de la productivité naturelle en bassin sur sa croissance.

#### **III.1.4.5. La microflore du tractus digestif des crustacés**

##### **Présence et nature**

Relativement peu d'études détaillées existent sur la microflore intestinale des crevettes pénéides. La plupart se sont intéressées à la présence et à la nature de la microflore mais rarement à son implication sur la physiologie de l'hôte. Ces études ont utilisé des méthodes de microbiologie classique et ne concernaient donc que les bactéries cultivables.

L'importance de la flore bactérienne varie considérablement d'un groupe d'espèces à un autre. En effet, Harris (1993) rapporte que la présence, la nature, et le type d'association entre les Invertébrés aquatiques et leur flore intestinale variera grandement en fonction de l'espèce concernée (ceci étant lié aux différences de structure du tractus intestinal et à la physiologie digestive), de son type d'habitat ou encore de ses habitudes alimentaires. Différents types d'association existent entre les Invertébrés aquatiques et leur flore intestinale. (Figure 1.13). Ainsi, les bactéries ingérées peuvent coloniser ou simplement survivre au passage du tractus intestinal; elles peuvent être lysées et absorbées, et/ou sécréter des substances telles que des enzymes. Les bactéries non résidentes sont éliminées via les fèces après avoir transité plus ou moins longtemps dans le tractus intestinal en fonction de leur capacité à adhérer aux parois intestinales. Ces bactéries, ou les substances qu'elles libèrent, peuvent au cours de leur passage avoir une contribution nutritionnelle et/ou influencer la composition de la flore intestinale. Les bactéries résidentes pourront s'installer de façon durable (flore résidente symbiotique ou commensale) dans la partie postérieure du tractus intestinal ou proliférer dans certaines régions du tractus digestif, constituant alors la population microbienne permanente de l'hôte. Cette colonisation peut avoir lieu au sein d'infractuosités du tractus intestinal, par

attachement au niveau de la paroi intestinale ou, plus transitoirement, au niveau du contenu digestif.

La présence d'une flore intestinale chez les crevettes pénéides a été démontrée à de nombreuses reprises (Dempsey *et al.*, 1989). Cependant peu de travaux se sont intéressés à déterminer le type d'associations et à démontrer l'existence d'une flore résidente. Notons néanmoins le travail de Dempsey *et al.* (1989) qui montrèrent l'existence d'une flore résidente chez *P. aztecus*. Dans la plupart des cas, la présence et la nature de la flore intestinale ont été étudiées à partir d'homogénats d'animaux entiers ou de l'ensemble du tractus intestinal. Cette méthode ne prend pas en compte la répartition variable des populations bactériennes en fonction de la zone (bouche, estomac, glande digestive, intestin moyen et postérieur) du tractus intestinal. Des études semblent démontrer en effet que la partie postérieure du tube digestif des Crustacés constituerait une niche favorable à une forte abondance de microorganismes, alors que les autres parties ne seraient pas colonisées.

Outre la répartition spatiale des bactéries dans le tractus digestif, une autre distinction peut être faite entre les bactéries adhérentes aux parois intestinales et celles associées au contenu digestif ou libre dans le lumen (Harris, 1993). Harris *et al.* (1991) ont ainsi montré chez *Upogebia africana* et *Callinassa kraussi*, deux espèces de crevettes, l'existence de bactéries adhérentes aux parois du tube digestif postérieur, ainsi que la présence de bactéries associées au contenu digestif. Les bactéries attachées au contenu digestif contribuerait davantage à la pré-digestion de l'aliment ingéré mais seraient aussi plus rapidement éliminées que les bactéries adhérentes aux parois intestinales. A ce stade, les informations concernant la colonisation bactérienne du tractus intestinal des Invertébrés aquatiques et les mécanismes par lesquels les bactéries adhèreraient à la paroi intestinale sont quasiment inexistantes et nécessiteraient des investigations à l'aide de méthodologies nouvelles de biologie moléculaire. Des travaux de ce type devraient permettre de comprendre les différents types d'association et leurs implications fonctionnelles.

Les études entreprises en vue de quantifier les bactéries sont difficilement comparables car elles expriment les résultats avec des unités différentes, soit par gramme de tractus intestinal, par gramme d'organe, par gramme d'animal ou encore par unité de volume. Les méthodes de numération reposent généralement sur le comptage des bactéries cultivables après étalement sur boîte de Pétri ou par numération directe par épifluorescence. Yasuda et Kitao (1980) ont



ainsi montré chez *M. japonicus* des concentrations bactériennes intestinales proches de  $10^4$  CFU.ml<sup>-1</sup> d'homogénat d'intestin chez des post-larves. Dempsey *et al.* (1989) ont dénombré chez *P. aztecus* et *L. setiferus* une concentration moyenne de  $7,5 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> d'estomac et  $2,6 \times 10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> d'intestin. Parmi ces bactéries, 10 % étaient attachées aux parois de l'intestin moyen alors que près de 50 % adhérait aux parois de l'intestin postérieur. Ces auteurs ont également rapporté une forte variabilité individuelle de la flore bactérienne des crevettes, qui semblait indépendante de la taille, de l'espèce, de l'habitat et du régime de l'hôte, mais qui pourrait être expliquée par la mue du revêtement intestinal et le renouvellement probable de la flore à cette occasion.

Plus récemment, Gomez-Gil *et al.* (1998) se sont intéressés spécifiquement aux bactéries du genre *Vibrio*, à différents niveaux du tractus intestinal de *L. vannamei*. Ils ont ainsi trouvé des concentrations de  $4,3 \times 10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> dans la glande digestive, de  $2,1 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> dans l'intestin et de  $1,29 \times 10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> dans l'estomac. Oxley *et al.* (2002) ont de même observé, chez *P. merguensis*, des concentrations bactériennes totales et vibrionacées supérieures dans la partie postérieure du tractus intestinal. Cette étude avait également montré que les bactéries du genre *Vibrio* étaient quantitativement dominantes.

Ces résultats confirment l'idée selon laquelle la partie postérieure de l'intestin, par sa structure chitineuse, serait plus favorable à la colonisation bactérienne, notamment par des bactéries pourvues d'une activité chitinolytique telles que les vibrios. La glande digestive serait, quant à elle, la partie du tractus digestif ayant la moins forte abondance de bactéries cultivables (Leano *et al.*, 1998 ; Oxley *et al.*, 2002) avec des concentrations inférieures de 2-3 log, voire plus, à celles mesurées dans l'intestin moyen et postérieur.

Enfin, Moss *et al.* (2000) ont rapporté des concentrations bactériennes totales de l'ordre de  $1,95 \times 10^{10}$  CFU.g<sup>-1</sup> et de  $2,7 \times 10^9$  CFU.g<sup>-1</sup> de tractus intestinal chez *L. vannamei* respectivement élevée avec de l'eau filtrée ou de l'eau provenant de bassins d'élevage. Il a été confirmé par ailleurs que la concentration bactérienne de l'eau d'élevage était nettement inférieure à celle de l'intestin des crevettes (Esiobu & Yamazaki, 2003).

Du point de vue qualitatif, les bactéries appartenant aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Micrococcus* et *Aeromonas* sont les plus généralement recensées dans le tractus digestif des Invertébrés marins (Harris, 1993). Les genres *Vibrio*, *Moraxella* et *Flavobacterium* sont prédominants dans le tractus intestinal de *M. japonicus*

(Sakata & Taruno, 1987). Dempsey *et al* (1989) ont rapporté une abondance majoritaire de bactéries des genre *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Chromobacterium* et *Pseudomonas* dans le tractus intestinal de *P. aztecus* et *L. setiferus*. La plupart des travaux réalisés sont en accord avec ces observations pour les différentes espèces de crevettes pénéides étudiées: *P. chinensis* (Xianghong *et al.*, 2000), *P. merguiensis* (Oxley *et al.*, 2002), *L. vannamei* (Moss *et al.*, 2000), *M. japonicus* (Yasuda & Kitao, 1979), *P. duorarum* (Esiobu & Yamazaki, 2003), *P. monodon* (Leaño *et al.*, 1998 ; Shakila & Saravanakumar, 2006), et *L. setiferus* (Hood & Meyers, 1974).

Les bactéries du genre *Bacillus*, *Plesiomonas*, *Pseudoalteromonas* ont également été isolées à partir de la microflore intestinale chez ces espèces de crevette. Les espèces de *Vibrio* généralement isolées à partir du tractus intestinal de différentes crevettes pénéides sont résumées dans le tableau 1.8.

Les nouvelles techniques d'écologie bactérienne, comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Muyzer *et al.*, 1993), ont rarement été utilisées afin d'étudier la flore digestive des crevettes. A notre connaissance deux articles ont été publiés à ce jour et concernent la crevette *L. vannamei* (Li *et al.*, 2007 ; Jonhson *et al.*, 2008). Ces travaux montrent des profils DGGE relativement simples en comparaison de ceux observés chez les animaux terrestres (Karnati *et al.*, 2007). Ce résultat indiquerait une relativement faible diversité de bactéries dominantes au sein de la flore intestinale de *L. vannamei*. Johnson *et al.* (2008) ont montré par exemple une très faible diversité de la flore intestinale des crevettes comparativement à ce qui est observé dans leur milieu d'élevage (eau). Ce résultat a été relié aux différences physico-chimiques entre les compartiments interne et externe de l'animal. De plus, ces auteurs ont rapporté une plus forte diversité dans la partie antérieure du tractus intestinal, et suggéré une sélection des bactéries au cours du transit intestinal. De façon intéressante leurs résultats confirment le travail de Oxley *et al.* (2002) qui montrait une diversité plus importante d'espèces de *Vibrio* dans la partie postérieure de l'intestin. Outre les *Vibrio*, cette étude a montré la présence de *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, d'alpha proteobacteria (proche de *Rhodobacter* sp.), de gamma proteobacteria et d'algues vertes (Chlorelles...). Enfin, Li *et al.* (2007) ont détecté une majorité de bactéries non identifiables mais proches des bactéries présentes dans les sédiments marins (*Rhodobacter* sp.), dans les biofilms marins (*Roseobacter* sp.), ou dans les tractus intestinaux de Mammifères (*Aquabacterium* sp.).

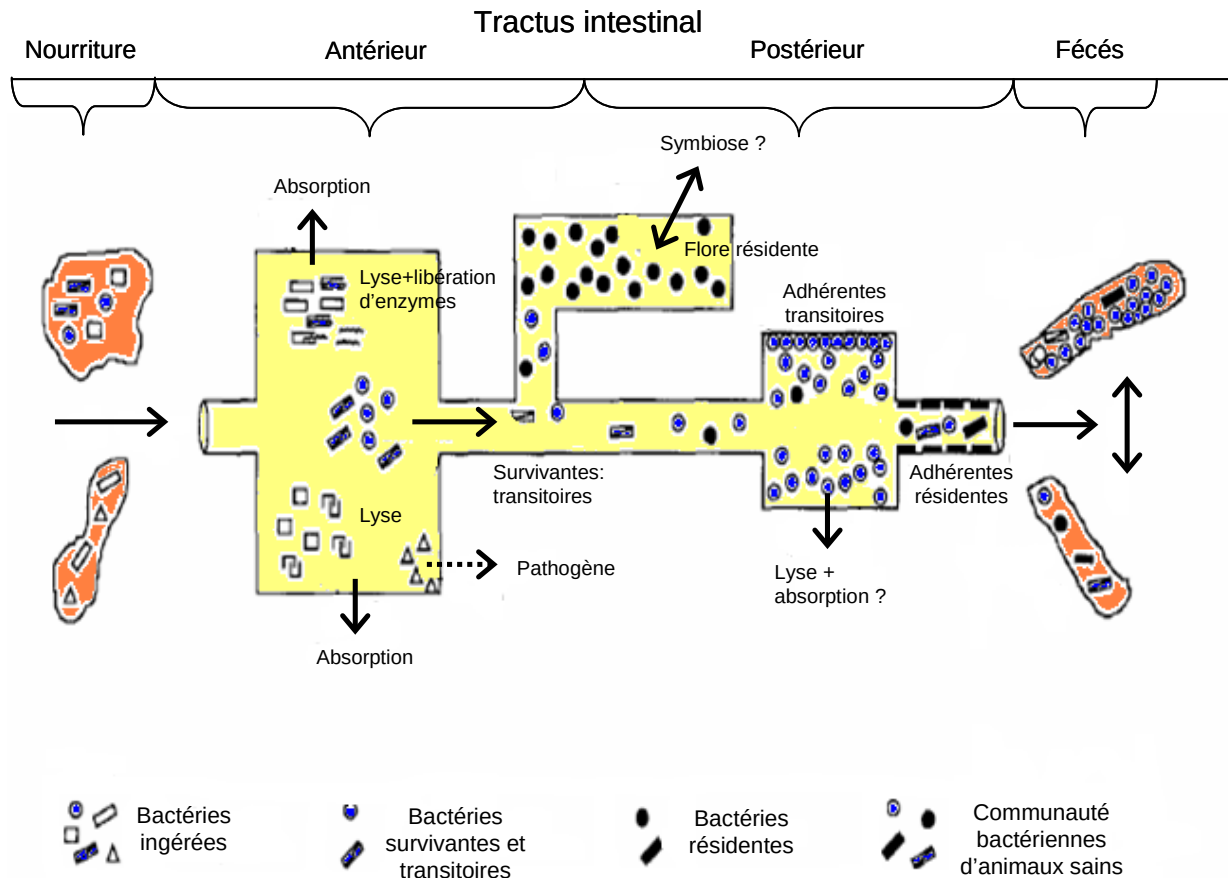


**Figure 1.13 :** Différents types d'association de la flore intestinale au niveau du tractus intestinal des Invertébrés aquatiques. (d'après Harris, 1993).

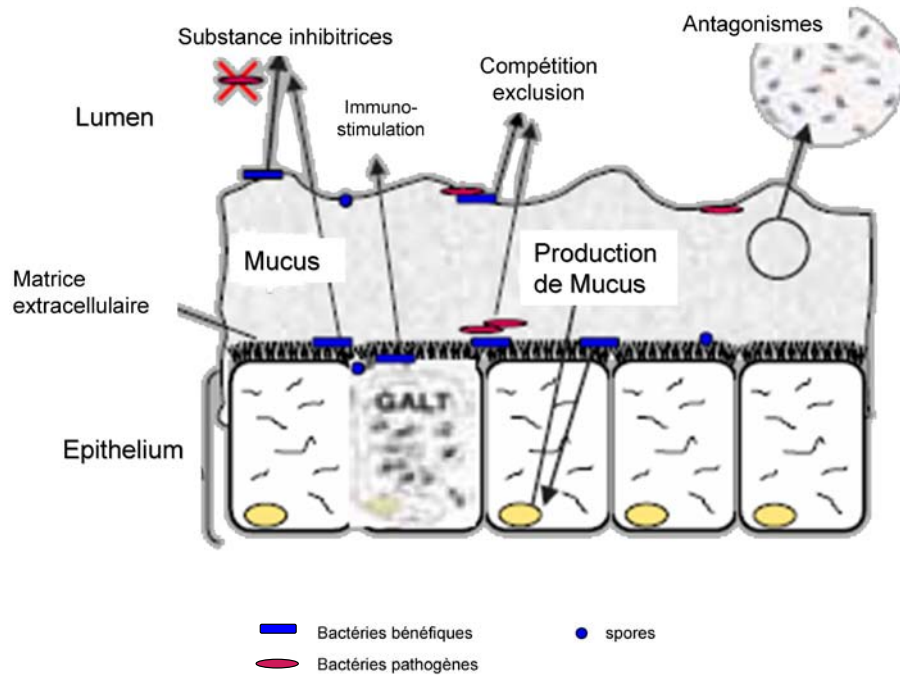


**Figure 1.14 :** Interactions entre microorganismes au niveau du tractus intestinal.

**Tableau 1.8** : Principales espèces de *Vibrio* isolées à partir du tractus intestinal des crevettes pénéides.

| Espèce de <i>Vibrio</i>    | Espèce concernée      | Zone du tractus intestinal | Références                 |
|----------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>V. alginolyticus</i>    | <i>L. vannamei</i>    | GD, ES, IN                 | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
|                            |                       | IN                         | Johnson et al., 2008       |
|                            | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. chinensis</i>   | TDT                        | Xianghong et al., 2000     |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
|                            | <i>P. duorarum</i>    | TDT                        | Esiobu and Yamazaki (2003) |
|                            | <i>L. vannamei</i>    | GD, IN                     | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
| GD                         |                       | Leaño et al. (1998)        |                            |
| <i>P. chinensis</i>        |                       | TDT                        | Xianghong et al., 2000     |
| <i>P. merguiensis</i>      | GD, ES, IN            | Oxley et al. (2002)        |                            |
| <i>V. mimicus</i>          | <i>L. vannamei</i>    | GD, IN                     | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. ordalii</i>          | <i>L. vannamei</i>    | IN                         | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>L. vannamei</i>    | GD, ES, IN                 | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
|                            |                       | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
|                            | <i>P.monodon</i>      | GD, ES, IN                 | Leaño et al. (1998)        |
| <i>P. merguiensis</i>      | GD, ES, IN            | Oxley et al. (2002)        |                            |
|                            | <i>L. vannamei</i>    | GD, ES, IN                 | Gomez-Gil et al. (1998)    |
| <i>V. splendidus</i>       | <i>L. vannamei</i>    | GD, ES, IN                 | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | GD, ES, IN                 | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
|                            | <i>V. tubiashii</i>   | <i>L. vannamei</i>         | GD, ES, IN                 |
| <i>P. merguiensis</i>      |                       | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. vulnificus</i>       | <i>L. vannamei</i>    | GD                         | Gomez-Gil et al. (1998)    |
|                            |                       | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
|                            |                       | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
|                            |                       | IN                         | Johnson et al., 2008       |
|                            | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
|                            | <i>V. logei</i>       | <i>P.monodon</i>           | GD                         |
| <i>P. merguiensis</i>      |                       | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>P. duorarum</i>         |                       | TDT                        | Esiobu and Yamazaki (2003) |
| <i>V. damsela</i>          | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>L. vannamei</i>    | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
| <i>V. campbelli</i>        | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. chinensis</i>   | TDT                        | Xianghong et al., 2000     |
| <i>V. harveyi</i>          | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>L. vannamei</i>    | GD                         | Vandenberghe et al. (1999) |
|                            | <i>P. chinensis</i>   | TDT                        | Xianghong et al., 2000     |
|                            | <i>P. duorarum</i>    | TDT                        | Esiobu and Yamazaki (2003) |
| <i>V. pelagicus</i>        | <i>P.monodon</i>      | GD, ES, IN                 | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. anguillarum</i>      | <i>L. vannamei</i>    | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
|                            | <i>L. vannamei</i>    | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
| <i>V. cholerae</i>         | <i>L. vannamei</i>    | TDT                        | Moss et al. (2000)         |
| <i>V. natriegens</i>       | <i>P. chinensis</i>   | TDT                        | Xianghong et al., 2000     |
| <i>V. mediterranei</i>     | <i>P.monodon</i>      | GD                         | Leaño et al. (1998)        |
|                            | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. diazotrophicus</i>   | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. fluvialis</i>        | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. gazogenes</i>        | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. nereis</i>           | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |
| <i>V. nigripulchritudo</i> | <i>P. merguiensis</i> | GD, ES, IN                 | Oxley et al. (2002)        |

### **Facteurs influençant la composition de la flore intestinale**

Relativement peu d'informations sont disponibles quant aux facteurs pouvant influencer quantitativement et qualitativement la flore intestinale des Pénéides. Chez les Invertébrés terrestres plusieurs études ont montré l'influence de différents facteurs tels que le stade de développement, la structure de l'intestin, la nature de la paroi intestinale, le type d'alimentation, l'état physiologie de l'hôte, ou encore des facteurs environnementaux (Harris, 1993). La structure de l'intestin semble influencer la présence de bactéries chez certains Invertébrés marins. Dans le cas des crevettes où le tube digestif est un simple tube rectiligne, des adaptations spécifiques seraient un prérequis pour les bactéries adhérentes à la paroi intestinale. La nature de la paroi intestinale joue également un rôle, et la nature chitineuse de l'intestin postérieur chez les Crustacés semble favoriser l'attachement et la colonisation des bactéries du genre *Vibrio*, comme évoqué précédemment. Enfin, la mue du revêtement interne du tractus intestinal pourrait aussi affecter la microflore associée qui serait renouvelée à chaque cycle de mue. Cependant, pratiquement aucune information n'est disponible quant à l'évolution de la flore intestinale et à sa recolonisation suite à la mue.

Le régime alimentaire semble également jouer un rôle prépondérant dans la composition et l'activité de la flore intestinale. Il a ainsi été montré, chez *Litopenaeus setiferus*, que les caractéristiques biologiques et biochimiques de l'aliment ingéré déterminaient la nature de la microflore intestinale (Austin & Baker, 1988). Cependant, le manque d'informations sur le sujet ne permet pas de savoir si les différences observées sont liées aux types de bactéries ingérées ou à un effet de la composition du régime sur les bactéries résidentes. Selon Hood *et al.* (1971), chez *L. setiferus*, la microflore du tractus intestinal serait déterminée par les caractéristiques biologiques et biochimiques des particules alimentaires ingérées et par la capacité de certaines bactéries à résister à des pH bas et à l'action mécanique du proventricule de l'estomac.

Les conditions physico-chimiques à l'intérieur du tractus intestinal (pH, salinité, potentiel rédox, oxygène, température, disponibilité en certains nutriments, substances toxiques, bactériocines), probablement influencées par le régime alimentaire, semblent également avoir une influence (Hood & Meyers, 1974 ; Dempsey & Kitting, 1987). Les différences observées au niveau de la flore intestinale d'animaux élevés dans des conditions environnementales différentes en attestent (Moss *et al.*, 2000). Ainsi, Sugita *et al.* (1987) ont montré qu'un

changement de salinité entraînait des modifications de la flore chez *Palaemon paucidens*. D'autres études relativisent l'influence du milieu d'élevage sur la flore du tractus digestif des crevettes. En effet, peu ou pas de différences ont été mesurées entre la microflore intestinale de crevettes sauvages et de crevettes élevées en captivité (Yasuda & Kitao, 1980 ; Oxley *et al.*, 2002).

Le stade et l'état physiologique de l'animal influencent également la microflore intestinale des crevettes. Au cours du développement de *M. japonicus*, une diminution de la densité bactérienne et une modification de la composition de la microflore ont été observées entre les Zoés et les post-larves (Yasuda & Kitao, 1979). Vandenberghe *et al.* (1999) ont montré des modifications des populations de *Vibrio* chez *L. vannamei* en fonction du stade de développement (larves, post-larves, juvéniles et géniteurs), de l'état de santé des animaux (sains ou malades) et du site de prélèvement (écloseries, fermes, et pays différents).

A partir des exemples ci-dessus, il apparaît que plusieurs facteurs, agissant probablement en interaction, contribuent à influencer la nature de la flore intestinale des Crustacés et plus spécifiquement des crevettes pénéides. Cependant, le manque de données ne permet pas aujourd'hui de conclure quant aux principaux facteurs, et à leur poids respectif, pouvant influencer la microflore intestinale des crevettes pénéides.

Il reste enfin un sujet d'intérêt qui concerne les bactéries pathogènes et leur interaction avec la flore bactérienne du tractus digestif et la santé de la crevette. Ainsi une étude réalisée par Leaña *et al.* (1998) a montré une plus forte concentration bactérienne en vibrios luminescents dans la glande digestive de crevettes tigrées (*P. monodon*) élevées dans des bassins affectés par des maladies d'origine bactérienne. Cependant, à ce stade, les voies d'infections des bactéries pathogènes, notamment des vibrios, n'ont pas été clairement élucidées chez les crevettes pénéides.

### **Rôles potentiels**

La plupart des travaux réalisés chez les Invertébrés marins ont été descriptifs et se sont peu intéressés aux interactions entre la flore intestinale et la physiologie de son hôte.

Parmi les effets démontrés de la microflore intestinale sur la physiologie des Invertébrés marins, on peut recenser :

- 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 de surfactant améliorant la digestibilité des tanins,
- 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) (Figure 1.14).

Des travaux complémentaires sont bien entendu nécessaires afin de préciser les rôles de la microflore intestinale chez les crevettes pénéides. Le développement de biotechnologies comme l'utilisation de probiotiques alimentaires pourrait permettre de mieux comprendre les effets de la flore microbienne du tractus digestif sur la physiologie des crevettes et plus particulièrement sur leur nutrition. Cependant il est important de rappeler que ces études nécessiteront au préalable une meilleure connaissance de la microflore intestinale et de sa dynamique.

### **III.1.5. Immunité et mécanismes de défense**

Au cours de l'évolution, deux types de systèmes immunitaires se sont développés, à savoir le système dit de l'immunité innée et le système dit de l'immunité acquise.

L'immunité innée est un système phylogénétiquement plus ancien et est présent chez tous les organismes pluricellulaires. Ce système constitue une première ligne de défense permettant de limiter l'infection à ses premiers stades et repose sur un système de reconnaissance via des motifs moléculaires conservés présents sur les parois et membranes des micro-organismes. Contrairement aux Vertébrés, le système immunitaire des Crustacés se caractérise par une absence de mécanismes de défense acquis basés sur une mémoire immunitaire permettant la reconnaissance spécifique d'agent infectieux ayant été préalablement rencontrés. La réponse immunitaire des Crustacés fait donc appel à un système immunitaire inné impliquant des mécanismes peu spécifiques à médiation humorale et cellulaire. Elle passe tout d'abord par une reconnaissance de l'agent pathogène via certaines molécules du non-soi, comme les lipopolysaccharides (LPS) (au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif), les  $\beta$ -glucanes et les peptidoglycanes des parois bactériennes. Des molécules liant spécifiquement ces éléments exogènes ont été décrites pour nombre de modèles de Crustacés, comme les lectines et les agglutinines liant les LPS et possédant des propriétés d'agglutination, ou d'autres molécules liant les  $\beta$ -1,3-glucanes et induisant l'activation de cellules immunitaires capables à leur tour d'activer des systèmes de défense (le système pro-phénoloxydase (proPO) dans ce cas). Les molécules de reconnaissance interagissent ensuite avec les hémocytes circulants. Ces derniers, véhiculés par l'hémolymphe, sont des cellules immunocompétentes et constituent les effecteurs principaux de l'immunité des Crustacés. On peut les classer en trois types selon 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). Selon leurs caractéristiques, différentes fonctions ont pu être attribuées à ces types cellulaires : la coagulation (hyalinocytes), la phagocytose et l'activation du système proPO associées aux cellules granuleuses et semi-granuleuses. Des approches comme la cytométrie en flux, ou l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques de protéines impliquées dans la réponse immunitaire, devraient permettre de préciser les fonctions attribuables à ces différents types d'hémocytes.

Différents systèmes de défense ont pu ainsi être décrits chez les Crustacés: la coagulation cellulaire et plasmique, le système proPO, la phagocytose, l'encapsulation et les peptides antimicrobiens (AMPs). La coagulation est un phénomène extrêmement rapide chez les Crustacés, permettant de stopper les hémorragies et de limiter la pénétration de micro-organismes. Elle consiste en une coagulation plasmatique et une coagulation cellulaire, selon qu'elle implique la formation d'un gel constitué par la polymérisation sous l'action d'une



transglutaminase (Lee & Soderhall, 2002) d'une protéine du plasma, ou d'un agrégat de protéines issues d'un lysat hémocytaire. Le système proPO s'appuie sur l'action d'une oxydoréductase, la phénoloxydase (PO). Cette enzyme catalyse l'oxydation du phénol en quinones qui conduisent à la formation de mélanine et de composés intermédiaires bactéricides, puis à l'encapsulation et à la phagocytose. Ce phénomène de mélanisation est observé chez les Crustacés suite à des blessures ou des infections, et est notamment essentiel à la cicatrisation. La biosynthèse et le stockage du précurseur de la PO, la proPO, a lieu dans les hémocytes. Ce système est initié par la reconnaissance de lipopolysaccharides, de  $\beta$ -glucanes ou de peptidoglycane bactériens (Lee & Soderhall, 2002).

L'élimination directe d'agents exogènes passe par la phagocytose. Ce processus comprend la reconnaissance de l'agent étranger, son attachement à la surface cellulaire, la formation de pseudopodes, l'internalisation et la fusion phagosomes-lysosomes (organites cytoplasmiques contenant des enzymes lysosomiales: phosphatases acides, estérases,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase) qui aboutira à la dégradation de la particule phagocytée. Cette dégradation peut aussi passer par une autre voie, le choc respiratoire, faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species). Ce choc consiste en la réduction d'une molécule d'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase Oxydase). Les ROS hautement réactifs sont microbicides et participent à la destruction des corps étrangers. L'anion superoxyde est alors converti en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la superoxyde dismutase (SOD) de façon à limiter son accumulation dans l'organisme (Muñoz *et al.*, 2000). Dans le cas où les particules étrangères sont de trop grande taille ou en trop grand nombre pour pouvoir être éliminées par phagocytose, un agrégat d'hémocytes peut se former autour de la particule (nodule). Les bactéries retenues sont alors lysées mais le devenir du nodule reste à élucider. Ce phénomène peut aussi être associé à la libération d'enzymes lysosomiales à la surface de la particule étrangère, on parle alors d'encapsulation.

La réponse immunitaire innée des Crustacés s'appuie d'autre part sur la production de peptides antimicrobiens (AMPs). Les AMPs sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée et sont des effecteurs immunitaires extrêmement répandus dans le règne vivant, constituant l'une des premières lignes de défense contre les agents pathogènes. Plus de 700 de ces molécules ont été décrites à ce jour, dont une majorité chez les Insectes. Chez les crevettes pénéides, deux types de peptides antimicrobiens ont été décrits : les pénaeidines et des peptides dérivés de l'hémocyanine. Les pénaeidines ont été décrites initialement chez *L. vannamei* (Destoumieux *et al.*, 2000), puis chez toutes les espèces de crevette étudiées.

Deux pénaeidines ont notamment été décrites chez *L. stylirostris* appartenant aux sous-groupes Pen2 et Pen3 mises en évidence dans un contexte d'infection à *V. penaeicida* (Muñoz *et al.*, 2004). Les pénaeidines paraissent jouer un rôle primordial dans la défense immunitaire de ces organismes et ont pu être associées à une inhibition de la sporulation de champignons et à des activités antibactériennes le plus souvent dirigées contre les bactéries à Gram+ via des mécanismes d'inhibition. Les pénaeidines ont cependant une action bactéricide directe limitée vis-à-vis des bactéries à Gram-, notamment celles appartenant au genre *Vibrio*. Il s'agirait plutôt de mécanismes d'agglutination et d'opsonisation favorisant la phagocytose. Un modèle d'action hypothétique des pénaeidines a été proposé par Bachere *et al.* (2004) (Figure 1.15). D'autres groupes d'AMPs incluent les facteurs anti-LPS (ALF), lysozyme, crustines, ou encore des peptides dérivés de l'hémocyanine (clivage de l'extrémité C-terminale de l'hémocyanine). Ces derniers ont notamment été mis en évidence dans le plasma de *L. vannamei* et de *L. stylirostris* en réponse à une infection bactérienne mais auraient une action strictement antifongique. Cependant, il a été montré qu'en réponse à une infection bactérienne chez la crevette, la concentration en peptides dérivés de l'hémocyanine augmentait aussi de façon importante (Destoumieux *et al.*, 2001).

Enfin, il existe chez les crevettes pénéides un mécanisme immunitaire reposant sur la voie de l'ARN interférence (Robalino *et al.*, 2005). Le processus de l'ARN interférence repose sur la suppression post-transcriptionnelle d'un gène par des ARN doubles brins détruisant les ARN messagers de séquences homologues de manière spécifique. Ce phénomène de défense naturelle essentiellement dirigé contre les virus a été observé chez les plantes, les Nématodes, les Insectes, et les Mammifères. Il constitue un domaine de recherche qui attire de plus en plus de chercheurs intéressés par les applications possibles à la lutte contre des maladies virales touchant la majorité des élevages de crevettes (Tirasophon *et al.*, 2005 ; Robalino *et al.*, 2007 ; Sarathi *et al.*, 2008).

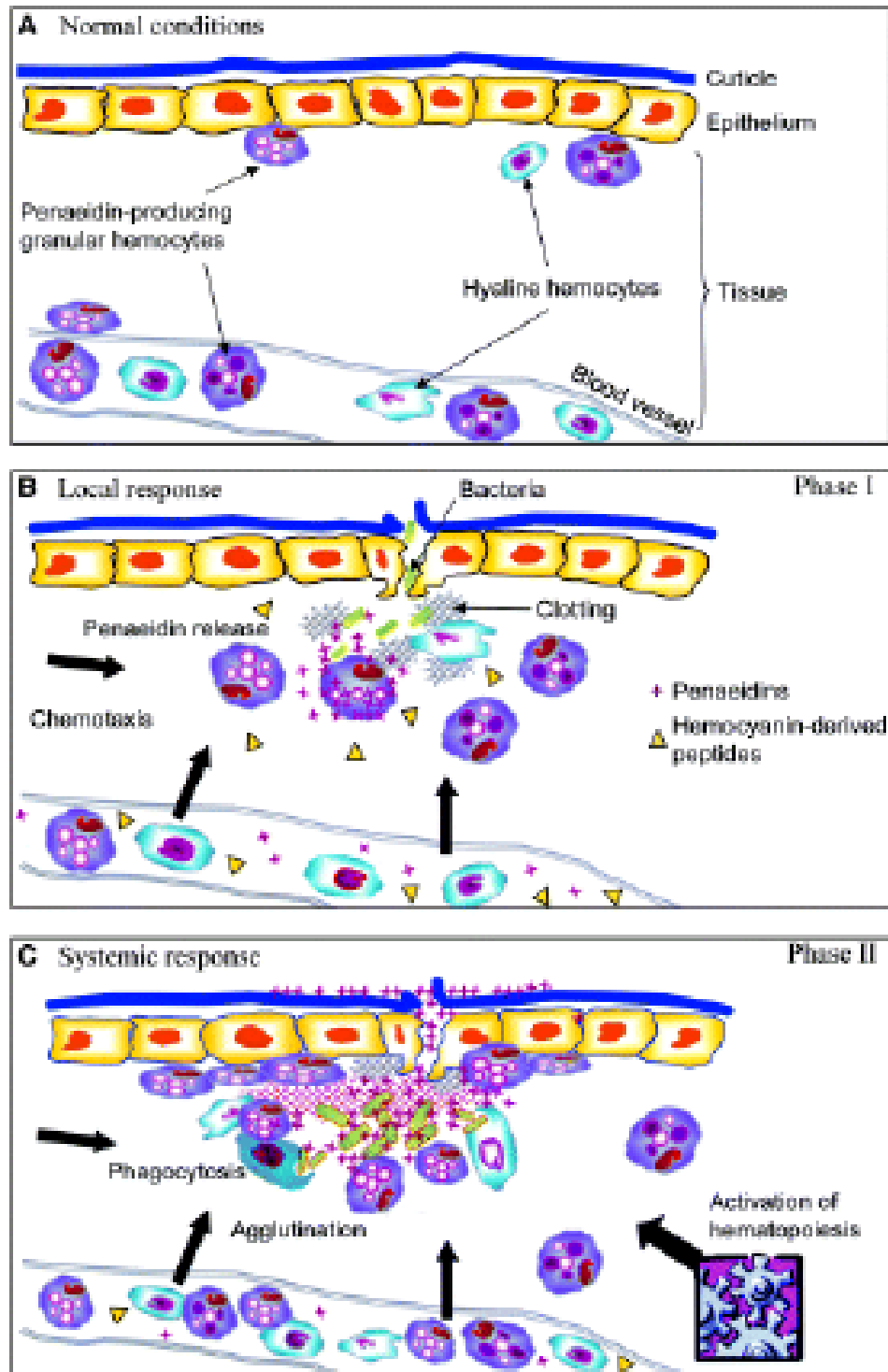


**Figure 1.15 :** Modèle d'action des peptides antimicrobiens chez les crevettes pénéides. A) En conditions normales les hémocytes synthétisant les peptides antimicrobiens sont localisés dans les vaisseaux sanguins ou dans les tissus de la crevette. Dans le cas d'une infection bactérienne, deux phases peuvent être distinguées : B) phase I, une réaction locale caractérisée par la migration des hémocytes jusqu'au site de l'infection et par l'émission massive de pénaeidines libres dans la circulation ainsi que de peptides dérivés de l'hémocyanine. C) Phase II, une réaction systémique caractérisée par l'accumulation des hémocytes synthétisant les peptides antimicrobiens et résultant de l'activation de l'hématopoïèse (Bachere *et al.*, 2004)

### **III.1.6. Le stress oxydant**

En conditions physiologiques, une partie de l'oxygène est transformée au niveau de la mitochondrie en espèces oxygénées réactives (ROS pour « reactive oxygen species ») qui en excès sont particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces ROS, dont font partie les radicaux libres, 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,...). Au niveau moléculaire, les ROS peuvent également agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies. Ils sont ainsi des médiateurs des processus conduisant aux dommages cellulaires telle que l'apoptose ou la nécrose cellulaire. Afin de se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui lui permettent de réguler l'accumulation des ROS. Ces systèmes sont composés d'antioxydants (Glutathions, vitamines A, C et E), d'oligo-éléments, de protéines et d'enzymes.

De manière générale, le stress oxydant est défini comme le résultat d'un déséquilibre dans la balance des pro-oxydants et des anti-oxydants, avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Figure 1.16). Déterminer le statut du stress oxydant d'un individu est un sujet de priorité en santé humaine car de très nombreuses études indiquent qu'en dehors de son implication dans le processus de vieillissement, il existe une association étroite entre l'altération des systèmes de défenses antioxydantes et le développement de plus de 200 pathologies différentes allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement.

Le stress oxydant affecte aussi les animaux d'élevage et serait ainsi associé au développement de certaines maladies. Ce chapitre a pour objet de présenter rapidement ce qu'est le stress oxydant et de détailler les facteurs de risque pouvant y conduire chez les animaux aquatiques.

#### **III.1.6.1. La théorie de la toxicité de l'oxygène**

L'oxygène atmosphérique 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 souvent appelés radicaux libres bien que théoriquement en chimie, un radical libre soit un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre. Ainsi, généralement les auteurs préfèrent l'appellation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) et incluent le peroxyde d'hydrogène dans cette définition (Lesser, 2006).

La démonstration des effets toxiques de l'oxygène *via* les radicaux libres remonte aux années 1950 (Gerschman *et al.*, 1954) et a modifié la compréhension des mécanismes biologiques par les scientifiques. Toutes les cellules photosynthétiques et les cellules respiratoires produisent des ROS. Ainsi, chez les animaux, y compris chez les animaux aquatiques, le métabolisme aérobie est la première source de production de ROS (Winston & Di Giulio, 1991). La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de

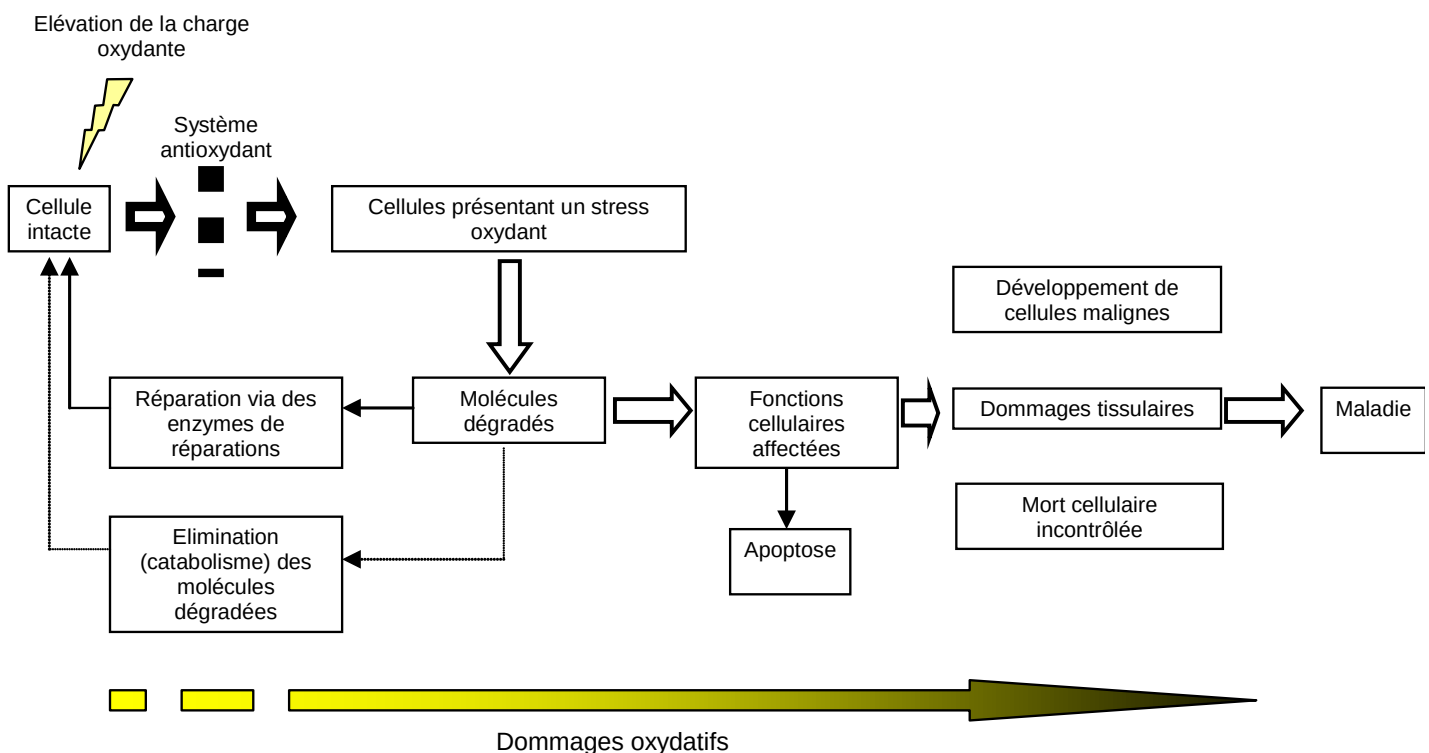


**Figure 1.16 :** Schéma général des défenses cellulaires mis en place contre les dommages induits par le stress oxydant. L'augmentation de la charge oxydative est initialement contrée par le système antioxydant. Les molécules affectées sont réparées ou catabolisées. La mort cellulaire programmée (apoptose) peut être initiée si les dégâts cellulaires deviennent trop importants et affectent le fonctionnement de la cellule. Quand les dommages cellulaires excèdent la capacité de défense et de réparation du système, la mort cellulaire incontrôlée, les dommages sur les tissus et le développement de cellules malignes peuvent entraîner le développement de certaines maladies (D'après Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Cette réaction de réduction directe impliquant la présence de quatre électrons est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournira à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, entre 0,4 à 4 % de l'oxygène ne sera pas correctement converti en eau, suite à des fuites électroniques, et donnera naissance à des espèces oxygénées réactives (ROS). La formation des ROS requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme des catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres.

L'organisme produit donc en permanence des ROS, et ce de façon normale. En effet, la biologie moléculaire a permis de montrer que les ROS jouent un rôle physiologique fondamental en agissant à faible concentration comme des messagers secondaires capables :

- de réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules évoluant vers un état cancéreux (Curtin *et al.*, 2002),
- d'activer des facteurs de transcription (NFkB, p38-MAP kinase, ...) eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Owuor & Kong, 2002),
- de moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (Holgrem, 2003).

### **III.1.6.2. Les dommages induits par les radicaux libres**

Dans les systèmes biologiques, la production de ROS est donc directement et positivement liée à la concentration en oxygène (Jamieson *et al.*, 1986). Les ROS, comme nous l'avons vu plus haut, sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires intervenant en conditions normales, cependant leur accumulation peut conduire à des dommages importants au niveau cellulaire. Le paradoxe des radicaux libres est donc qu'ils constituent à la fois des espèces indispensables à la vie tout en étant très dangereuses et en pouvant engendrer un grand nombre de maladies.

Lykkesfeldt et Svendsen (2007) ont proposé un schéma général présentant les défenses cellulaires mises en place contre les dommages cellulaires provoqués par une élévation du stress oxydant (Figure 1.16). Les effets néfastes des ROS sont d'induire l'apoptose dans des cellules saines ou d'activer divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de protéines d'adhésion.

Les ROS, par leur nature instable, sont également à l'origine de dégâts cellulaires importants :

- en provoquant des cassures et des mutations au sein de l'ADN,
- en inactivant des protéines et des enzymes,
- en induisant des processus de peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés au sein des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire,
- en oxydant des protéines,
- en oxydant les sucres (glucose).

Ainsi les ROS, et particulièrement le radical hydroxyle, interviennent dans la peroxydation des lipides membranaires (Fridovich, 1998). Les produits de dégradations sont des aldéhydes, tel que le malondialdéhyde et des hydrocarbures (éthane et éthylène) (Gutteridge & Halliwell, 1990). La peroxydation des lipides influe sur la stabilité des membranes cellulaires et a un effet particulièrement cytotoxique au niveau mitochondrial, comme notamment l'initiation de l'apoptose (Green & Reed, 1998).

L'attaque des protéines par les ROS entraînera, quant à elle, des modifications spécifiques de certains acides aminés, avec notamment la formation des groupements carbonyles (Levine *et al.*, 1994), une fragmentation des chaînes peptidiques, une augmentation de la susceptibilité à l'altération, une altération de la charge électrique...(Lesser, 2006). L'accumulation des produits de dégradation des protéines interviendrait dans le processus de vieillissement (Stadtman, 1986.).

Enfin, la génération de ROS peut aussi induire de nombreuses lésions sur l'ADN pouvant entraîner des délétions, mutations et autres effets génétiques plus ou moins létaux (Imlay & Linn, 1988)

### III.1.6.3. Les défenses antioxydantes

Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, les organismes ont développé des systèmes permettant de réguler, dans l'organisme, la production et l'accumulation des ROS (Lesser, 2006). 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 qui protège l'organisme contre les radicaux oxygénés et également contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote (Halliwell & Gutteridge, 1999).

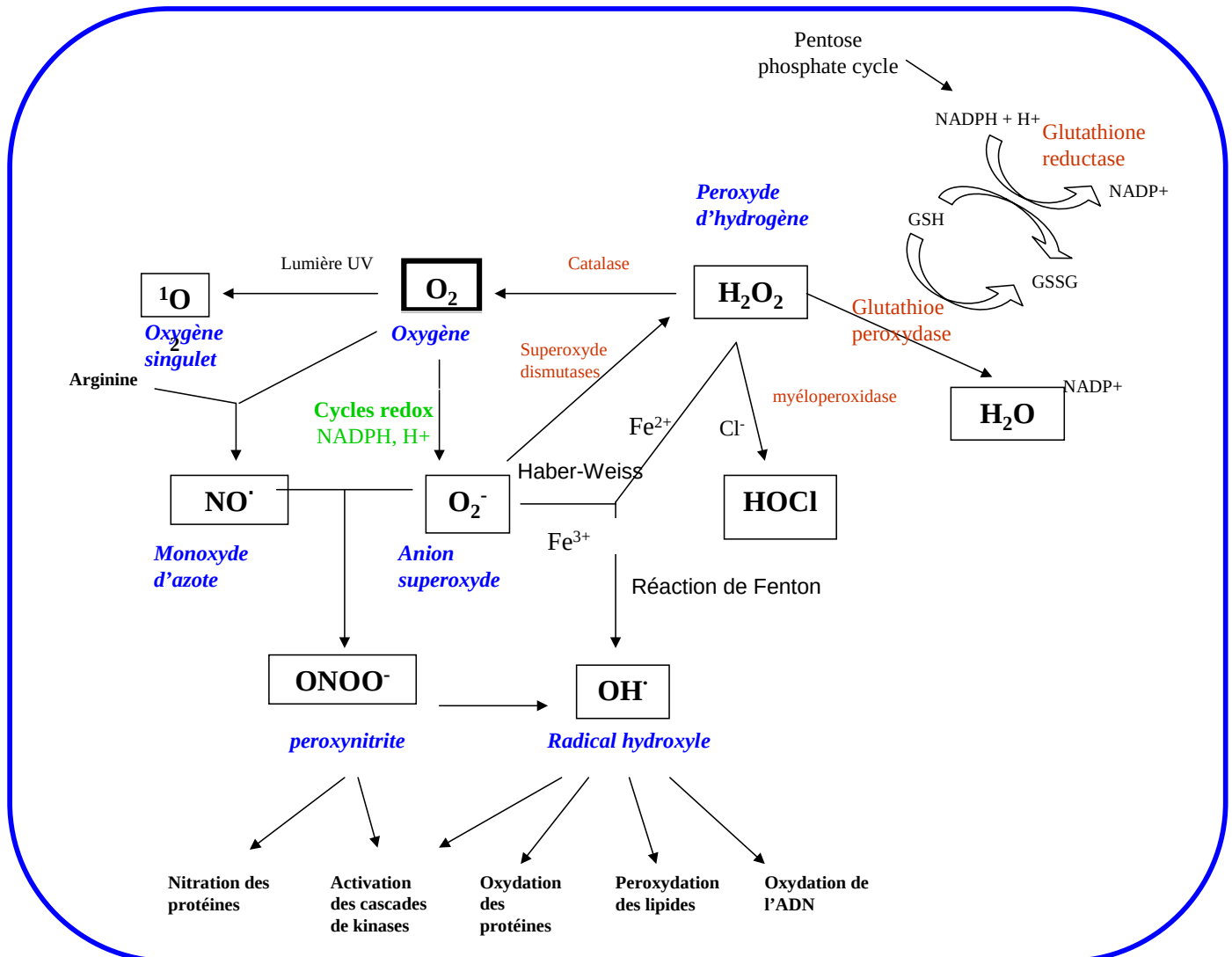


**Figure 1.17 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie



Le glutathion, comme les autres « piègeurs » de faible poids moléculaire, est considéré comme étant la première « ligne de défense » contre les attaques radicalaires. Il fonctionne en réagissant avec l'oxygène singulet, l'anion superoxide et le radical hydroxyle, et peut aussi agir en bloquant les chaînes de réaction faisant intervenir les radicaux libres. Le glutathion est également un substrat essentiel pour l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase. Ainsi, le glutathion réduit (GSH), une fois oxydé, forme un radical thiyl 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 (Figure 1.17). Elle implique notamment les superoxydes dismutases (SOD) qui transforment les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. La SOD a été initialement découverte par McCord et Fridovitch (1969), et il existe différentes métalloprotéines et différentes localisations cellulaires de cette enzyme. Ainsi, 6 types de SOD existent et diffèrent par le métal utilisé comme cofacteur : cuivre-zinc SOD, nickel SOD, manganèse-fer SOD, manganèse-zinc SOD, fer-zinc SOD, fer SOD et manganèse SOD (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Généralement deux types de SOD sont retrouvées chez les animaux: une Cu-Zn SOD présente dans le cytoplasme et une Mn SOD dans les mitochondries. De façon surprenante, les Arthropodes marins ne présentent pas de Cu-Zn SOD mais une Mn SOD cytoplasmique privée de peptide signal qui aurait pu l'assigner aux mitochondries (Brouwer *et al.*, 2003).

Le peroxyde d'hydrogène produit par 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). Il est intéressant de noter que la catalase a un  $K_m$  élevé pour le peroxyde d'hydrogène, supérieur aux peroxydases, rendant cette première plus efficace dans le piégeage de forte concentration de  $H_2O_2$  (Halliwell & Gutteridge, 1999). 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 & 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 ROS. La plupart des enzymes antioxydantes vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui, avec le glutathion réduit, constituent la plaque tournante des défenses anti-oxydantes. Le NADPH est directement lié au pouvoir réducteur et régénéré par la voie des pentoses phosphates

(Di Giulio *et al.*, 1989). Enfin, l'activité des enzymes des défenses antioxydantes nécessite aussi l'intervention d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium).

Un système de défense secondaire composé d'enzymes, dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation des sous-produits toxiques de l'oxydation, complète la panoplie des moyens de protection contre les ROS (Beyer *et al.*, 1991).

#### **III.1.6.4. Les facteurs de risque conduisant au stress oxydatif chez les animaux marins**

##### **Source de ROS dans l'eau de mer**

Dans les systèmes marins, l'absorption des radiations solaires, et spécialement des UV, par la matière organique dissoute dans l'eau, entraîne la production de divers composés réactifs tels que les ROS (Mopper & Kieber, 2000). Parmi ces ROS, dans l'eau de mer, le peroxyde d'hydrogène a la durée de vie la plus longue et montre les concentrations les plus élevées ( $10^{-7}$  M). Ce dernier a de plus la capacité de diffuser au travers des membranes cellulaires (Halliwell & Gutteridge, 1999).

##### **Le stress oxydant chez les organismes marins**

Les organismes marins sont exposés à une large gamme de facteurs environnementaux variant spatialement et temporellement. La plupart des organismes ont développé une certaine capacité à s'adapter à ces fluctuations. Ainsi les défenses antioxydantes des animaux peuvent s'adapter aux niveaux de production de ROS induits par ces fluctuations environnementales (Lesser, 2006). Il n'est alors pas surprenant d'observer des variations saisonnières des activités antioxydantes chez nombre d'animaux marins (Manduzio *et al.*, 2005).

La rupture de l'équilibre entre pro- et anti-oxydants chez un organisme peut avoir de multiples origines. Le stress oxydant est en effet une composante importante de la réponse des organismes marins aux changements, parfois brusques, des conditions de leur environnement (température, salinité, pH, composition minérale, pollution, radiations UV) ou aux infections par des pathogènes (micro-organismes, parasites, virus...). Les facteurs favorisant ou

déclenchant un stress oxydant peuvent ainsi être classés en deux catégories: les facteurs biotiques, c'est-à-dire biologiques, le plus souvent internes à l'individu, et des facteurs abiotiques, c'est-à-dire physico-chimiques, le plus souvent liés à des phénomènes d'origine exogène. Il a été par ailleurs suggéré qu'un déséquilibre du statut redox de l'animal pouvait conduire au stress oxydant et à certaines maladies infectieuses (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007).

Nous présenterons ici les principaux facteurs ayant entraîné le développement d'un stress oxydant chez les animaux aquatiques, notamment chez les Invertébrés marins.

#### Facteurs induisant un stress oxydant

**Les principaux facteurs abiotiques** recensés chez les organismes marins sont les suivants :

- les variations de température (Abele *et al.*, 2002),
- la concentration en peroxyde d'hydrogène (Abele-Oeschger *et al.*, 1997),
- l'exposition à des xénobiotiques ou encore à des radiations (Reddy, 1997 ; Livingstone, 2001),
- les variations de salinité, de pH, d'oxygène du milieu (Wang & Chen, 2006; Li & Chen, 2008 ; Zenteno-Savín *et al.*, 2006).

**Les facteurs biotiques** recensés sont essentiellement :

- le stade de développement et l'âge des animaux (Dandapat *et al.*, 2003 ;Correia *et al.*, 2003),
- le niveau du métabolisme oxydatif (consommation d'oxygène, alimentation ...) (Maciel *et al.*, 2004 ; Carefoot, 1990),
- l'infection des animaux par des pathogènes (Neves *et al.*, 2000 ; Rameshthangam & Ramasamy, 2006 ; Liu *et al.*, 2007a; Mathew *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2008).

#### Facteurs abiotiques

D'une manière générale, la majeure partie des études réalisées chez les organismes marins s'est intéressée à évaluer l'effet de polluants et de variations des paramètres

environnementaux (température, oxygène, salinité...) sur la production de ROS, l'état des défenses antioxydantes, et les dommages cellulaires résultant du stress oxydant.

De nos jours, de plus en plus de produits chimiques ou de polluants issus de l'agriculture, de l'industrie ou d'autres sources anthropiques, pénètrent dans l'environnement marin et dans les tissus des organismes, vertébrés ou invertébrés (Solé *et al.*, 2000). Dès lors l'évaluation des effets de ces polluants sur la biologie des espèces marines a revêtu une importance croissante. Des études récentes ont montré que les taux de ROS pouvaient être augmentés par toute une gamme de contaminants naturels ou artificiels d'origine exogène, comme certains composés organiques pesticides ou fertilisants par exemple, comme le DDT (Dichloro-diphényl-trichloroéthane), ou inorganiques comme les métaux (par exemple : Al, Cr, Hg, Ni), les contaminants de l'air (Ozone, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>), ou les radiations UV (Livingstone, 2001). Il a ainsi été montré chez de nombreux organismes marins que ces polluants induisaient un abaissement des défenses antioxydantes et le développement d'un stress oxydant. Par exemple, les Mollusques Bivalves, comme les moules, produisent des ROS en réponse à une exposition à des molécules xénobiotiques telles que les métaux lourds et autres polluants environnementaux (Winston & Di Giulio, 1991). Les Crustacés sont également affectés par de tels polluants, et notamment par les métaux lourds (Reddy, 1997 ; Venugopal *et al.*, 1997). Une synthèse des travaux concernant l'effet des xénobiotiques sur les animaux marins a été proposée par Livingstone (2001).

D'autres travaux se sont aussi intéressés aux effets de variations des paramètres environnementaux comme la température, l'oxygène, ou la salinité. Tout organisme poïkilotherme possède un optimum de température et subit un stress lorsque la température du milieu s'en éloigne. En effet, la biochimie de l'organisme ainsi que les réactions cellulaires catalysées par des enzymes sont tributaires de ce thermopréferendum. A titre d'exemple, chez la crevette *L. stylirostris*, des études ont été menées sur l'augmentation de la mortalité liée à une baisse et à des variations de température au seuil du thermopréferendum de cette espèce ( $\pm 22^\circ\text{C}$ ). Il a ainsi été observé que ces stress thermiques induisaient un stress oxydant important chez la crevette, avec des grandes variations des défenses antioxydantes (glutathions, TAS et SOD) et du niveau de peroxydation des tissus (Lemaire et Chim, 2007). De la même façon des stress thermiques induisent un stress oxydant chez les Mollusques (Abele *et al.*, 2002). La salinité du milieu est aussi un facteur très important affectant, chez les animaux aquatiques, le métabolisme, la croissance, la survie et les capacités de régulation

osmotique (Lemaire *et al*, 2002). Chez la crevette *L. vannamei*, une étude a montré qu'une salinité aux marges supérieure et inférieure de la zone de préférence de l'animal induisait un stress oxydant avec une diminution des activités des principales enzymes antioxydantes: SOD, CAT et Gpx. (Liu *et al.*, 2007). Enfin, l'hypoxie ou l'hyperoxie peuvent également entraîner une production accrue de ROS pouvant conduire à un stress oxydant (Lemaire & Livingstone, 1993; Zenteno-Savín *et al.*, 2006).

### Facteurs biotiques

Le rapport entre l'âge d'un organisme et le niveau du stress oxydant a fait l'objet d'une théorie déjà ancienne (Harman, 1956) qui postulait que le vieillissement d'un organisme s'accompagnait d'une augmentation généralisée du stress oxydant. En ce qui concerne les organismes marins, quelques résultats viennent étayer cette théorie. Par exemple, chez un crustacé amphipode, *Gammarus locusta*, une diminution des activités de la SOD et de la Gpx a été observée au cours du développement du stade juvénile au stade adulte. Cette diminution des défenses a parfois été associée à une augmentation des niveaux de peroxydation lipidique, suggérant une susceptibilité accrue au stress oxydant avec le vieillissement (Correia *et al*, 2003).

Le stress oxydant a également été associé au développement de certaines maladies infectieuses chez les animaux d'élevage (Lykkesfædt & Svendsen, 2007). Les travaux sur le sujet ont essentiellement concerné les animaux terrestres comme les porcs, les vaches ou encore les chevaux. Ainsi il a été montré une relation entre le stress oxydant et le développement de maladies comme la pneumonie, les entérites ou encore certaines infections bactériennes chez les porcs. Il existe très peu de résultats similaires chez les animaux aquatiques et notamment chez les crevettes d'élevage.

Quand un pathogène (parasite, bactérie, virus...) infecte un organisme, de multiples réactions ont lieu, initiées soit par le pathogène pour sa survie, soit par l'hôte afin d'éliminer l'intrus (Roch, 1999). Chez les Crustacés Décapodes, les hémocytes sont des acteurs majeurs de la réponse par médiation cellulaire et sont impliqués dans la réponse immunitaire *via* la production de mélanine grâce au système prophenoloxidase et *via* l'élimination des corps étranger par la phagocytose (Soderhall & Cerenius, 1998). Au sein d'un phagosome, l'activation de certaines enzymes comme la NADPH-oxydase ou la SOD aboutissent à la production d'un mélange très réactif de radicaux libres qui détruisent le pathogène. Ainsi, la

NADPH-oxydase est activée au niveau des hémocytes conduisant à la réduction d'une molécule d'oxygène et à la production d'anion superoxyde. S'ensuit la production d'espèces réactives intermédiaires comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle. Ce processus est appelée « bouffée respiratoire » ou « burst respiratoire » et joue un rôle important dans l'activité microbicide (Muñoz *et al.*, 2000). Chez les Crustacés, les ROS interviendraient, *via* une chaîne de réactions, dans la production de composés toxiques attaquant la structure moléculaire des particules étrangères pour les détruire (Holmblad & Soderhall, 1999). Ce processus a aussi été montré chez d'autres espèces d'animaux marins, notamment chez les Mollusques (Adema *et al.*, 1991).

Cependant, bien qu'une élévation de la production d'anion superoxyde soit bénéfique pour la défense de l'organisme, une surproduction de ROS peut avoir des effets délétères (Cheng & Wang, 2001) et provoquer un stress oxydant. Un tel phénomène a été observé récemment chez certaines espèces de crevettes d'élevage suite à des infections par des virus ou des bactéries pathogènes (essentiellement des vibrios). Ainsi il a été montré chez *Penaeus monodon* qu'une infection virale par le WSSV conduisait à un abaissement des défenses antioxydantes et à une élévation des dégâts cellulaires (Rameshthangam & Ramasamy, 2006 ; Mathew *et al.*, 2007). Mathew *et al.* (2007) ont ainsi montré une chute de l'activité de la SOD et une élévation des niveaux de peroxydation lipidique dans la glande digestive et l'hémolymph 24 heures après une infection par le WSSV.

En ce qui concerne les infections bactériennes, quelques travaux récents ont montré une chute des défenses antioxydantes, essentiellement caractérisée par une baisse de l'activité de la superoxyde dismutase (Sarathi *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008 ; Hsieh *et al.*, 2008a), ainsi qu'une élévation de la transcription des gènes codant pour des enzymes antioxydantes suite à des infections par des vibrios (Liu *et al.*, 2007a). Ainsi, chez la crevette *L. vannamei*, il a été montré qu'une infection par *Vibrio alginolyticus* induisait un burst respiratoire associé à une augmentation de l'activité de la SOD et de la GPX dans les 12 heures suivant l'infection (Liu *et al.*, 2007a). Cependant, après 12 heures, une diminution de l'activité de la SOD a été mesurée chez *Fenneropenaeus indicus* et *L. vannamei* (Sarathi *et al.*, 2007 ; Hsieh *et al.*, 2008a). Un résultat équivalent a été obtenu par Sarathi *et al.* (2007) chez *F. indicus* infectée par *V. alginolyticus* et par le WSSV. L'ensemble de ces travaux suggère qu'une augmentation de l'intensité de la réponse immunitaire induirait une accumulation de ROS et une baisse du statut antioxydant de l'animal suite à une infection par un pathogène (Mathew *et al.*, 2007).

A partir de ce constat, il a été proposé qu'un apport en antioxydants nutritionnels *via* l'alimentation pourrait constituer un moyen prometteur en vue de renforcer le potentiel antioxydant des animaux et d'améliorer leur résistance aux pathogènes (Lykkesfed & Svendsen, 2007; Chiu *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007b ;. Hsieh *et al.*, 2008b).

### **III.2. Les bactéries lactiques : le cas de *Pediococcus acidilactici***

#### **III.2.1. Les bactéries lactiques et leur utilisation en agroalimentaire**

Les bactéries lactiques (LABs) sont des bactéries appartenant au groupe des bactéries à GRAM+. Elles sont généralement non mobiles, n'ayant pas la capacité de sporuler et produisant essentiellement de l'acide lactique par fermentation. Parmi les bactéries présentes dans ce groupe, on distinguera, sur le plan morphologique, les coques (ex : *streptococci*) et les bacilles (*lactobacilli* et *carnobacteria*). Plusieurs genres de bactéries lactiques (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ou encore *Carnobacterium*) sont capables de croître dans des conditions environnementales variées, et sont ainsi retrouvées dans divers environnements tels que le tractus intestinal de nombreux animaux terrestres et aquatiques, les produits laitiers, les produits de la mer, ou encore certaines plantes (Ringo & Gatesoupe, 1998). D'une manière générale, les LABs sont ubiquistes dans les aliments fermentés et non fermentés (Steinkraus, 1983; Soomro *et al.*, 2002) et font partie de la microflore commensale de l'homme (Adams, 1999).

D'après la littérature, les bactéries lactiques font partie intégrante de la flore intestinale native des animaux aquatiques (Ringo *et al.*, 1995). Cependant elles ne seraient pas dominantes dans la microflore intestinale des poissons (juvéniles et adultes) à l'inverse des animaux terrestres homéothermes. Dans leur revue, Ringo *et al.* (1995) ont montré que la flore cultivable des Salmonidés était essentiellement composée de bactéries GRAM-, mais que quelques bactéries GRAM+ (*Lactobacillus spp.*) étaient également présentes en quantités plus faibles. Par ailleurs, Hovda *et al.* (2007) ont rapporté des différences de composition de la microflore intestinale des saumons Atlantique selon que la méthode d'analyse reposait sur la caractérisation de la flore totale par PCR-DGGE ou de la flore cultivable par des techniques de microbiologie classiques (culture sur milieux spécifiques). Les méthodes basées sur les bactéries cultivables détectaient essentiellement des bactéries des genres *Vibrio* sp.,

*Pseudomonas* sp., *Janthinobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. et *P. phosphoreum*, alors que la technique basée sur l'extraction d'ADN totaux trouvait essentiellement *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus* sp., *P. phosphoreum* et *Bacillus* sp. comme bactéries dominantes. A notre connaissance aucune étude n'a visé une analyse spécifique de la flore intestinale lactique chez les Invertébrés marins, et plus précisément chez les crevettes pénéides. Néanmoins, comme nous l'avons déjà mentionné la plupart des études de la flore intestinale des crevettes ne rapportent pas la présence de bactéries lactiques. Cependant, dans la plupart des cas, les techniques utilisées par ces études ne permettaient pas de détecter la présence éventuelle de LABs. Retenons cependant le travail de Viera *et al.* (2007) qui a permis, après culture sur MRS à 35°C pendant 48 heures, d'isoler du tractus digestif de *L. vannamei* deux bactéries lactiques, dont une a été identifiée comme appartenant à l'espèce *L. plantarum*. De même Zhou *et al.* (2007) ont isolé une souche de *Lactobacillus* sp. à partir du tractus digestif de *L. vannamei* nourries avec un aliment supplémenté en Sc-FOS (fructo-oligosaccharides à courte chaîne).

Plus généralement, il apparaît qu'une meilleure connaissance de la flore intestinale des crevettes pénéides devrait permettre de statuer sur la présence de bactéries GRAM+ et plus particulièrement de LABs, sur les facteurs affectant leur présence, et sur leur éventuelle contribution à la physiologie de l'hôte.

Les LABs sont des micro-organismes dont les propriétés biologiques, biochimiques, technologiques et thérapeutiques ont depuis longtemps permis d'envisager leur utilisation en argroalimentaire. Ces bactéries contribuent notamment à la production et à la conservation de nombreux produits laitiers ou de produits alimentaires fermentés. Elles sont également utilisées dans la production et la conservation des ensilages (Vanbelle *et al.*, 1990; Hammes & Tichaczek, 1994). Une des propriétés majeures de ces bactéries est la production d'acides issus du métabolisme fermentaire (acide lactique majoritairement, acide acétique, diacétyl) qui agissent comme agents de saveur via la libération de diacétyl, comme agents texturants (coagulation des protéines) ou comme conservateurs via un abaissement du pH, limitant le développement des flores pathogènes (*Enterobacteriae*, *Staphylococci*, *Listeria*...). De plus, les LABs produisent aussi une grande variété de facteurs anti-microbiens, comme les bactériocines, qui permettent d'inhiber la croissance de certains micro-organismes, plus ou moins éloignés phylogénétiquement (essentiellement des bactéries GRAM +). Ainsi, des



bactériocines comme la nisine, produite par les *Lactobacilles*, sont utilisées comme conservateurs des aliments (Riley & Wertz, 2002).

L'ensemble des propriétés des LABs a aussi permis de considérer leur utilisation comme probiotiques chez l'homme (Reid, 1999 ; Gomes & Malcata, 1999) et d'autres espèces animales terrestres et aquatiques (Guerra *et al.*, 2007 ; Ringo & Gatesoupe, 1998 ). Dans ce cas, les LABs sont souvent utilisées dans le but de stabiliser la flore intestinale, réduisant notamment le développement de flores pathogènes et favorisant la flore lactique. Plusieurs propriétés, faisant des LABs de bons candidats comme probiotiques, ont été listées (Reid, 1999 ; Vazquez *et al.*, 2005 ; Kullisaar *et al.*, 2003) :

- adhérence au mucus intestinal/ colonisation,
- compétition-exclusion vis-à-vis des pathogènes (compétition spatiale, en nutriments essentiels et antagonisme *via* la production de substances inhibitrices : acide lactique, peroxyde d'hydrogène, bactériocines, surfactant...),
- stimulation de l'immunité de l'hôte,
- sécurité d'utilisation, non pathogénicité,
- propriétés antioxydantes.

A titre d'exemple, il a été montré chez l'homme que la souche *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhodia, Madison, WIS) était capable d'adhérer aux cellules intestinales, de réduire l'adhésion de certains pathogènes par compétition-exclusion (synthèse de surfactant) et de produire des bactériocines. Des essais cliniques ont alors montré que cette souche survivait au passage de l'estomac, était capable de coloniser l'intestin, et réduisait ainsi les problèmes associés à l'intolérance du lactose, et les risques de cancer du colon (Montes *et al.*, 1995 ; Goldin *et al.*, 1984).

Bien que certaines souches pathogènes, appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* ou encore *Carnobacterium*, aient été recensées (Ringo & Gatesoupe, 1998), l'utilisation historique des LABs en nutrition humaine et animale fait que ces bactéries sont généralement considérées comme sans risque. Plusieurs espèces bénéficient ainsi du status GRAS (« generally recognized as safe ») (Mäyrä-Mäkién & Bigret, 1993; Salminen *et al.*, 1998; Ishibashi & Yamazaki, 2001; Donohue, 2006).

### III.2.2. *Pediococcus acidilactici*: taxonomie et origine

Les Pédiocoques appartiennent au groupe des bactéries lactiques et peuvent être classés phylogénétiquement de la façon suivante :

- **Règne:** Bacteria
- **Embranchement:** Firmicutes
- **Classe:** Bacilli
- **Ordre:** Lactobacillales
- **Famille:** Lactobacillaceae
- **Genre:** *Pediococcus*

Ces bactéries sont des microbes GRAM<sup>+</sup> strictement homofermentaires produisant, à partir d'hexoses, de l'acide lactique DL ou L(+) selon les espèces, l'espèce *acidilactici* ne produisant que le type L(+). Les cellules sont sphériques (coques), organisées en diplocoques voire en tétrades, et ne forment jamais de chaînettes. Les colonies mesurent de 1,0 à 2,5 µm de diamètre et ont une couleur allant du gris-blanc au blanc-crème. Toutes les espèces se développent bien à 30°C, et leurs températures optimales de croissance sont comprises entre 25°C et 40°C. Leur croissance est dépendante de la présence de sucres fermentables, de facteurs de croissance (vitamines : acide nicotinique, biotine, acide pantothenique) et d'acides aminés. Elles ont généralement une faible activité protéolytique et une incapacité à utiliser le lactose, ce qui les empêche d'acidifier et de coaguler le lait. Les pédiocoques ne possèdent pas d'activité catalase ni de cytochromes, bien que l'existence d'une pseudo-catalase ait été détectée chez *P. acidilactici* et *P. pentosaceus*. Enfin, du point de vue phénotypique, ce genre est plus proche des genres *Lactobacillus* que des autres bactéries lactiques (Figure 1.18). Les différentes espèces peuvent être discriminées par leur sensibilité à la température, au pH et à la concentration en chlorure de sodium. Toutes les espèces peuvent être cultivées sur milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharp).

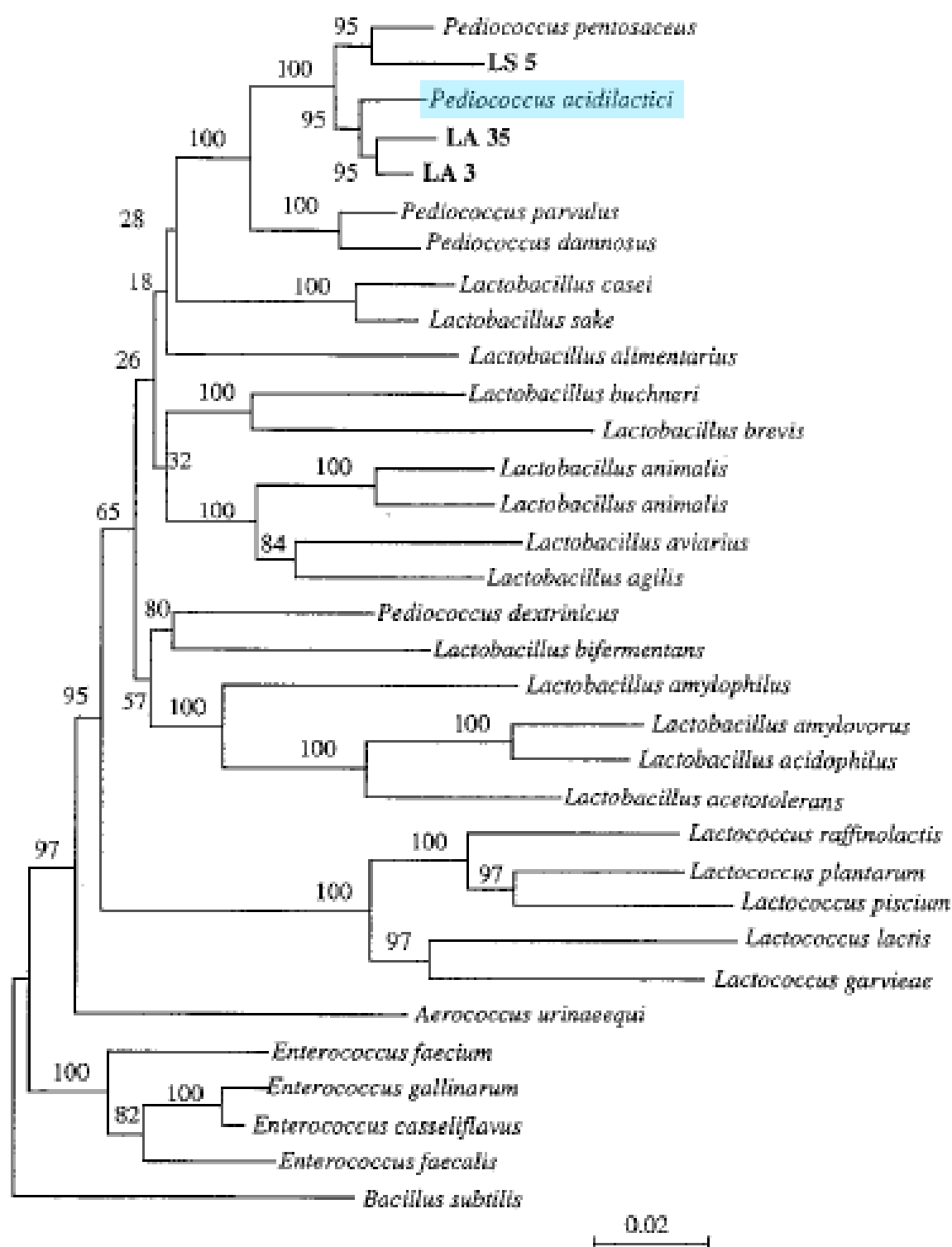


**Figure 1.18** : Arbre phylogénétique en méthode neighbor-joining, sur la base des séquences ribosomiques de l'ADN 16S positionnant l'espèce *P. acidilactici* parmi différentes espèces de bactéries lactiques (Cai et al., 1999).

**La souche *P. acidilactici* MA 18/5M** a été sélectionnée à partir d'une collection privée appartenant à la société Lallemand. Cette souche a été historiquement isolée à partir d'une graminée. Les cellules font une taille de 1 µm et sont groupées en paires ou en tetrades. Comme les autres *Pédiocoques*, cette espèce a besoin de facteurs de croissance et de sucres fermentescibles pour croître. L'espèce *acidilactici* peut croître dans des conditions de température, de pH et de concentration en sel (NaCl) variées et n'a pas de besoins particuliers en vitamines. La souche MA18/5M peut être cultivée facilement sur MRS à une température de 45°C et tolère des concentrations en sel de 8 % (80 g/l de chlorure de sodium). Sa croissance est toujours satisfaisante à 48°C, ce qui permet de la différencier des autres souches de la même espèce. Les caractéristiques biochimiques de la souche, basées sur sa capacité à fermenter certains sucres, sont présentées dans le tableau 1.9.

**Tableau 1.9 :** Caractéristiques biochimiques de la souche *P. acidilactici* MA18/5M obtenues par galerie API 50 CH (Source : Lallemand).

|                  |   |                     |   |                 |   |
|------------------|---|---------------------|---|-----------------|---|
| Glycérol         | - | Mannitol            | - | D-Raffinose     | - |
| Erythritol       | - | Sorbitol            | - | Starch          | - |
| D-arabinose      | - | αMethyl-D-mannoside | - | Glycogen        | - |
| L-arabinose      | + | αMethyl-D-glucoside | - | Xylitol         | - |
| Ribose           | + | N Acetyl Glucosamin | + | βGentiobiose    | - |
| D-Xylose         | + | Amygdalin           | - | D-Turanose      | - |
| L-Xylose         | - | Arbutin             | - | D-Lyxose        | - |
| Adonitol         | - | Esculin             | + | D-Tagatose      | + |
| βMethyl-xyloside | - | Salicin             | - | D-Fucose        | - |
| Galactose        | + | Cellobiose          | + | L-Fucose        | - |
| D-Glucose        | + | Maltose             | - | D-Arabitol      | - |
| D-Fructose       | + | Lactose             | - | L-Arabitol      | - |
| D-Mannose        | + | Malibiose           | - | Gluconate       | - |
| L-Sorbose        | - | Sucrose             | - | 2ceto-gluconate | - |
| Rhamnose         | + | Trehalose           | + | 5ceto-gluconate | - |
| Dulcitol         | - | Inuline             | - |                 |   |
| Inositol         | - | Melezitose          | - |                 |   |

Les *Pédiocoques* produisent des bactériocines nommées plus spécifiquement pédiocines (Cintas *et al.*, 1995 ; Elegado *et al.*, 1997; Albano *et al.*, 2007). Afin de satisfaire aux exigences de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA), la souche MA 18/5M a donc été testée par la Société Lallemand pour son absence d'activité anti-microbienne à l'encontre des souches bactériennes suivantes (diffusion disk méthode) :

- *Listeria ivanovi*, CIP 78.42 T
- *Salmonella typhimurium*, CIP 58.58

- *Klebsellia pneumoniae*, CIP 53.153
- *Staphylococcus aureus*, CIP A 238
- *Pseudomonas aeruginosa*, CIP 76.110
- *Enterococcus faecalis*, CIP 103214
- *Bacillus subtilis*, CIP 52.62
- *Escherichia coli* CIP 54.8 T

Ainsi, aucune activité anti-microbienne n'a alors été détectée. Les pédiocines ont généralement des spectres antimicrobiens relativement étroits et principalement dirigés vers les bactéries GRAM+ (Klaenhammer, 1993). Cependant Jamuna et Jeevaratnam (2004) ont montré que des bactériocines purifiées à partir de souches de *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* et *P. cerevisiae* avaient de larges spectres d'inhibition dirigés vers des bactéries GRAM+ mais aussi GRAM- comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas strain* and *V. parahaemolyticus*. De plus, une étude réalisée *in vitro* (Reynaud., 2004) a pu montrer l'existence de facteur(s) inhibiteur(s) produits par *P. acidilactici* MA18/5M, ayant une action contre trois souches de vibrios pathogènes : *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo* et *V. harveyi* (Tableau 1.10 & Figure 1.19).

**Tableau 1.10** : Diamètre moyen du halo d'inhibition (cm) causé par différentes souches probiotiques sur des bactéries du genre *Vibrio*, pathogènes de crevettes (Reynaud, 2004).

| Probiotiques testés             | <i>V. penaeicida</i> |         | <i>V. nigripulchritudo</i> |         | <i>V. harveyi</i> |         |
|---------------------------------|----------------------|---------|----------------------------|---------|-------------------|---------|
|                                 | Surnageant           | culture | Surnageant                 | culture | Surnageant        | culture |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | 1,8                  | 2       | 1,6                        | 1,9     | 1,3               | 1,4     |
| <i>Lactobacillus farciminis</i> | 2                    | 1,9     | 1,7                        | 1,5     | 1,3               | 1,4     |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>  | 2,1                  | 2,1     | 1,6                        | 2       | 1,3               | 1,4     |
| <i>Lb. B3G</i>                  | 2,1                  | 2       | 1,9                        | 1,6     | 1,4               | 1,4     |
| MRS stérile                     | 0                    | 0       | 0                          | 0       | 0                 | 0       |

Enfin, la susceptibilité de la souche à divers antibiotiques couramment utilisés en nutrition animale a été évaluée selon les recommandations de l'EFSA<sup>4</sup>. Il a ainsi été montré que la souche *P. acidilactici* n'était pas résistante aux antibiotiques listés par l'EFSA, avec néanmoins une légère résistance à la streptomycine et à la kanamycine, ne reposant cependant

<sup>4</sup> Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance (Question No EFSA-Q-2004-079) adopted on 25 May 2005. The EFSA Journal (2005) 223, 1-12.  
[http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/feedap/feedap\\_opinions/993.Par.0001.File.dat/feedap\\_op\\_ej223\\_antibiotics\\_en1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/feedap/feedap_opinions/993.Par.0001.File.dat/feedap_op_ej223_antibiotics_en1.pdf)

pas sur une acquisition de gènes spécifiques, et une résistance intrinsèque à la vancomycine (mais il y a eu incapacité à transférer le plasmide responsable de cette résistance). .



**Figure 1.19** : Exemple de halo d'inhibition observé en test d'antagonisme in vitro : probiotique/*Vibrio harveyi*. P : *Pediococcus*, R : *L. rhamnosus*, F: *L. farciminis*, B: *Lb. B3G*. (Reynaud, 2004).

### III.2.3. *Pediococcus acidilactici* : utilisation en agroalimentaire

***Pediococcus acidilactici*** bénéficie du statut GRAS et du statut QPS (« Qualified Presumption of Safety ») délivré par l'EFSA.

Cependant quelques rares études rapportent des cas de septicémie impliquant des pédiocoques (Sarma & Mohanty, 1998). Des souches de pédiocoques ont également été retrouvées chez des patients immuno-déprimés (Golledge *et al.*, 1990 ; Sire *et al.*, 1992 ; Sarma & Mohanty, 1998 ; Heinz *et al.*, 2000) présentant des septicémies, des abcès hépatiques ou des infections bactériennes. Cependant aucun lien n'a été démontré entre l'apparition de ces symptômes et la présence de *P. acidilactici* (Mastro *et al.*, 1990). Il a été alors suggéré que *P. acidilactici* pourrait, dans de rares cas, être un pathogène opportuniste chez des patients sévèrement immuno-déprimés (Riebel & Washington, 1990).

Les pédiocoques sont généralement associées aux plantes, dans les produits laitiers ou encore les boissons alcoolisées et autres aliments fermentés. Ces bactéries sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (fermentation, biopréservation, conservateur d'ensilage). Le

tableau 1.11 présente les espèces de pédiocoques généralement retrouvées dans les produits fermentés d'origines végétale et animale. Plusieurs revues rapportent l'utilisation de *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* dans la fermentation de légumes (Knorr, 1998), de viandes (Luchansky *et al.*, 1992; Albano *et al.*, 2007), de pâtes (Miambi *et al.*, 2003), de jus de fruit (Knorr, 1998), ou de produits laitiers (Bhowmik & Marth, 1990, Tzanetakis & Litopoulou-Tzanetakis, 1989 ; Gunduz & Tuncel, 2006).

Ces espèces, comme la plupart des autres LABs, permettent d'allonger la durée de vie de ces produits, et améliorent leur hygiène par la production d'acide lactique et/ou la sécrétion de substances anti-bactériennes comme les pédiocines (Stiles, 1996). Les bactériocines produites par *P. acidilactici* ont fait l'objet d'études afin d'évaluer leur potentiel en tant que bioconservateurs alimentaires et contrôleurs de flore indésirable (pathogène) dans les aliments (Bhunia *et al.*, 1990 ; Cintas *et al.*, 1995).

Enfin, les pédiocoques sont aussi considérés comme des contaminants de la bière ou du vin même si leur présence est parfois recherchée (certaines bières comme la Lambic). En oenologie, certaines souches peuvent produire du diacétyl qui donnera un arôme de beurre recherché dans l'élaboration de certains vins comme les Chardonnay.

En nutrition animale, des souches du genre *Pediococcus* sont largement utilisées comme conservateurs d'ensilage (Fitzsimons *et al.*, 1992 ; Cai *et al.*, 1999 ; Fitzgerald, 2000). Leur mode d'action repose une fois de plus sur la production d'acide lactique permettant d'abaisser le pH de l'ensilage et ainsi d'empêcher les dégradations induites par d'autres micro-organismes et pouvant altérer la qualité nutritionnelle du fourrage.

De plus, Guerra *et al.* (2007) ont montré les effets bénéfiques de quatre bactéries lactiques, dont une souche de *P. acidilactici*, sur la croissance de porcelets sevrés et sur la réduction des coliformes totaux au niveau intestinal. Un probiotique commercial contenant une souche de *P. acidilactici* a par ailleurs permis d'améliorer la résistance de poulets de chair à la coccidiose (Lee *et al.*, 2007).

**Tableau 1.11** : Espèces de Pédiocoques généralement présentes dans les produits fermentés (d'après Knorr, 1998).

| Pediococci in fermented products of plant origin  |                                                                           |                                                                                       |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Products                                          | Ingredients                                                               | Pediococcus and role                                                                  |
| <b>Vegetables</b>                                 |                                                                           |                                                                                       |
| Sauerkraut                                        | Shredded cabbage + salt (2-2,5%)                                          | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
| Pickled cucumbers                                 | Cucumber + salt                                                           | <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> : lactic acid                          |
| Olive                                             | Olive + salt                                                              | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
| Kimchi                                            | Vegetables (+ fruits), spices + salt                                      | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
| Gundruk                                           | Fruits + vegetables                                                       | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
| <b>Cereal</b>                                     |                                                                           |                                                                                       |
| Idli                                              | Blended rice + black gram + salt (1%)                                     | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
| <b>Dosa</b>                                       |                                                                           |                                                                                       |
| <b>Puto</b>                                       |                                                                           |                                                                                       |
| <b>Koko</b>                                       |                                                                           |                                                                                       |
|                                                   | Rice powder + legume                                                      | <i>P. pentosaceus</i> : lactic acid                                                   |
|                                                   | Rice + sugar                                                              | <i>Pediococcus spp.</i> : lactic acid                                                 |
|                                                   | Maize (+ sorghum)                                                         | <i>P. acidilactici</i> : lactic acid                                                  |
| <b>Legume</b>                                     |                                                                           |                                                                                       |
| Soy sauce                                         | Soybean + salt                                                            | <i>P. halophilus</i> : lactic acid                                                    |
| Miso                                              | Soybean + rice + salt                                                     | <i>P. halophilus</i> , <i>P. pentosaceus</i> and <i>P. acidilactici</i> : lactic acid |
| <b>Hama-nato</b>                                  |                                                                           |                                                                                       |
|                                                   | Soybean + cereal + salt                                                   | <i>Pediococcus spp.</i> : lactic acid                                                 |
| <b>Fruits (juice)</b>                             |                                                                           |                                                                                       |
| German wine                                       | Desired fruits                                                            | <i>P. acidilactici</i> : malic acid to lactic acid                                    |
| Pearl wine                                        | Grapes                                                                    | <i>P. acidilactici</i> : malic acid to lactic acid                                    |
| Lambic                                            | Barley malt                                                               | <i>Pediococcus spp.</i> : lactic acid                                                 |
| Pediococci in fermented products of animal origin |                                                                           |                                                                                       |
| Producta (predominately consumed)                 | General description                                                       | Pediococci                                                                            |
| Cervelet (Europe, North America)                  | Semidry, finely chopped, smoked, uncooked, mild seasoning                 | <i>P. acidilactici</i>                                                                |
| Farmer sausage (Europe, North America)            | Semidry, coarsely chopped, smoked, uncooked, mildly seasoned.             | <i>P. acidilactici</i>                                                                |
| Kochsalami (Europe, North America)                | Semidry, coarsely chopped, smoked, cooked, heavily seasoned               | <i>P. acidilactici</i>                                                                |
| Longaniza (Europe)                                | cooked, favored (aniseed, pimento).                                       | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |
| Nham (SE Asia)                                    | Semidry, rice added, uncooked, steamed before eating, seasoning           | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |
| Thuringer (Europe, North America)                 | Semidry, coarsely chopped, smoked, cooked.                                | <i>P. pentosaceus</i>                                                                 |
| Chorizo (Europe, North America, Indian)           | Dry, medium chopped, not smoked or cooked, Fried before eating, Heavily   | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |
| German salami (Europe, North America)             | Dry, medium chopped, smoked, uncooked, mild seasoning.                    | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |
| Pepperoni (Europe, North America)                 | Dry, medium chopped, smoked, not cooked, heavily seasoned                 | <i>P. pentosaceus</i> and <i>P. acidilactici</i>                                      |
| Teewurst (Europe)                                 | Moist, finely chopped, smoked, not cooked, not seasoned, spread on bread. | <i>P. pentosaceus</i>                                                                 |
| Lebanon bologna (Europe, North America)           | Moist, coarsely chopped, heavily smoked, not cooked                       | <i>P. pentosaceus</i>                                                                 |
| Merguez (Europe, North America)                   | Moist, coarsely chopped, not smoked or cooked, mildly seasoned            | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |
| Pickled meat (Worldwide)                          | Trimming, cooked, brined (4±10% salt), spiced, vinegar may be added.      | <i>Pediococcus spp</i>                                                                |



### **Le cas de la souche MA 18/5M**

Cette souche entre dans la composition de plusieurs produits commerciaux disponibles en Amérique du Nord (Canada and U.S.A.) et en Europe (Allemagne, France, Royaume Uni). En France, cette souche a été enregistrée depuis 1994 en tant qu'additif d'ensilage (Biosilage Plus: numéro d'autorisation: 9400259) et, selon la nouvelle réglementation, est aujourd'hui enregistrée comme additif nutritionnel dans la catégorie: additifs technologiques, groupe fonctionnel des additifs d'ensilage<sup>5</sup>. *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M est aussi utilisée comme probiotique (Bactocell®; concentration garantie de  $10.10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> de *P. acidilactici*) développé spécifiquement pour la nutrition animale par la société Lallemand. Son efficacité a été démontrée chez les porcs à l'engraissement, les poulets de chair et les poules pondeuses par de multiples travaux scientifiques (Awaad *et al.*, 2003, 2005; Stella *et al.*, 2005; Lessard *et al.*, 2008; Chevaux *et al.*, 2006; Niven *et al.*, 2006; Di Giancamillo *et al.*, 2007; Rapport université de Milan; 2007) et par des essais en conditions réelles d'élevage (Bactocell technical dossier, Lallemand).

Ainsi depuis 1999, en Europe, le Bactocell est autorisé comme additif zootechnique (E1712) en engraissement des porcs et des poulets de chair. Chez le porc, cet additif confère une meilleure hygiène à l'aliment liquide (diminution des coliformes fécaux, des entérobactéries et des clostridies, élévation de la flore lactique), améliore les performances zootechniques (Gain Moyen Quotidien (GMQ), indice de consommation, poids des carcasses), diminue les rejets d'azote et d'ammoniaque, et améliore les qualités technologiques et organoleptiques de la viande. Des travaux approfondis ont pu montrer que ces améliorations reposaient sur un abaissement du pH limitant le développement de pathogènes (Niven *et al.*, 2006), sur une amélioration des fonctionnalités de l'intestin (élévation de la hauteur des villosités intestinales) (Di Giancamillo *et al.*, 2007), sur une augmentation de la digestibilité iléale (Chevaux *et al.*, 2006) et donc sur une meilleure utilisation de la ration (élévation de l'énergie nette et de l'énergie digestible de l'aliment).

En complément à ces résultats, il a été montré que l'administration de *P. acidilactici* aux truies pendant la lactation augmentait, chez le porcelet, le nombre de lymphocytes T (CD8+) dans l'intestin et les ganglions mésentériques, et réduisait le passage de *E. coli* entérotoxigénique vers les ganglions mésentériques suite à une infection

---

<sup>5</sup> Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition

expérimentale (Lessard *et al.*, 2008) : le probiotique permettrait ainsi de limiter l'attachement de *E. coli* à la muqueuse intestinale. Au cours de ces études, les auteurs ont également rapporté une stimulation de l'expression de molécules impliquées dans les défenses de l'organisme contre le pathogène (Interleukine-6 et  $\beta$ -défensine-2). Enfin, l'administration de *P. acidilactici* MA18/5M tendrait à diminuer la sévérité des signes cliniques de diarrhées chez les porcelets. Ainsi ce probiotique pourrait être une alternative prometteuse pour réduire l'utilisation des antibiotiques et contrer les infections entériques causées par *E. coli* chez le porcelet. Un effet de l'administration de *P. acidilactici* sur la diversité microbienne des porcelets au niveau du côlon après le sevrage a aussi été montré (Gagnon *et al.*, 2007).

Plus récemment, *P. acidilactici* MA18/5M a vu son utilisation s'étendre au domaine de la pisciculture (truite arc-en-ciel, lieu jaune, bar, anguille, tilapia). Plusieurs essais, réalisés en partenariat avec des instituts de recherche, ont permis de mettre en évidence des effets bénéfiques du probiotique chez différentes espèces de poissons, notamment chez le lieu jaune et la truite arc-en-ciel (Gatesoupe, 2002 ; Aubin, 2005a et b). Les résultats obtenus chez cette dernière espèce ont notamment fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2004 (WO 2005/ 000327 A2). Par ailleurs un dossier d'autorisation de l'additif Bactocell a été déposé à l'EFSA en 2008 pour ses applications chez les Salmonidés.

Enfin, la souche MA18/5M a également fait l'objet de plusieurs évaluations préliminaires chez la crevette *L. stylirostris* (Reynaud, 2004 ; Chim *et al.*, 2005; Castex, 2005, Castex *et al.*, 2006) et chez d'autres espèces comme *L. vannamei* et *P. monodon* (Usache *et al.*, 2004). Ces travaux ont notamment montré un effet inhibiteur *in vitro* de *P. acidilactici* MA 18/5M à l'encontre de deux pathogènes bactériens affectant les élevages de crevette de Nouvelle-Calédonie, ainsi que des améliorations en terme de survie et de croissance de *L. stylirostris* soumise au syndrome d'hiver (Castex, 2005).

Le tableau 1.12 présente les différents travaux, ayant fait l'objet de publications ou de communications, dans lesquels des souches de *P. acidilactici* ont été évaluées comme probiotique en nutrition animale. Il est finalement important de noter que le séquençage du génome de *P. acidilactici* MA18/5M par l'Institut Roswell est en cours de finalisation (Tompkins, communication personnelle).



## Première Partie : Rappels bibliographiques

**Tableau 1. 12 :** Principaux travaux (publiés ou ayant fait l'objet de communication) rapportant l'évaluation des effets de *P. acidilactici* MA18/5M utilisé comme probiotique alimentaire en nutrition animale.

| Animal concerné                         | Bactérie                                    | Source                                                       | Effets                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Référence                                                        |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>Monogastriques terrestres</b>        |                                             |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                  |
| Porcelets sevrés                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-5627 | Northern Reginal Research Laboratory (NRRL, Peoria, IL, USA) | Survie au conditions gastrointestinales<br>Augmentation du gain de poids et du poids final<br>Diminution de la concentration totale en coliformes faecaux dans les fécès                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Guerra et al., 2007                                              |
| Porcelets avant et après sevrage        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | l'administration dès la naissance à des porcelets stimule l'établissement des lymphocytes T dans l'intestin<br>inhibe le passage des bactéries vers les ganglions mésentériques après une épreuve d'infection avec <i>E. coli</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                   | Lessard et al., 2008                                             |
| Porcs à l'engraissement                 | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Améliore l'hygiène de la soupe                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Niven et al., 2006                                               |
| Porcelets sevrés                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Elevation du poids et du gain de poids après sevrage<br>Elevation de la hauteur des villosités intestinales                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Di Giancamillo et al., 2007                                      |
| Porcelets nouveau nés et sevrés         | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Amélioration de la digestibilité iléale<br>Amélioration des performances de croissance                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Chevaux et al., 2006                                             |
| Porcelets sevrés                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | réduction de la diversité bactérienne des porcelets au niveau du côlon après sevrage comparé à avant sevrage                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Gagnon et al., 2007                                              |
| Poulets de chair                        | <i>Pediococcus acidilactici</i>             | Produit commercial (Mito-Grow)                               | Protection partielle contre les effets liées à la Coccidiose                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Lee et al., 2007                                                 |
| Poulets de chair                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Améliore la résistance à une infection par <i>E. coli</i><br>Réduction de la colonisation intestinale et caecale de <i>Clostridium perfringens</i> et <i>S. typhimurium</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Awaad et al., 2003                                               |
| Poulets de chair                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Amélioration de la croissance, réduction de l'indice de consommation<br>Augmentation de la population caecale en Lactobacilles, Diminution du contenu caecal en <i>E. coli</i> / coliformes                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Stella et al., 2005                                              |
| Poules pondeuses                        | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Augmentation de la production d'œufs, de leur taille et de leur poids. Réduction des taux de conversion alimentaire                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Université de Milan, 2007*                                       |
| <b>Animaux aquatiques</b>               |                                             |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                  |
| Lieu Jaune                              | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Amélioration de la croissance des larves                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Gatesoupe, 2002                                                  |
| Truite arc en ciel                      | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Prévention contre le syndrome de compression vertébrale<br>Diminution de la concentration bactérienne intestinale après 5 mois de traitement<br><i>P. acidilactici</i> survit et transite dans l'intestin des truites ( $10^5$ CFU.g <sup>-1</sup> ), influence sur la composition de la flore digestive<br>Tendance à l'amélioration de la rétention azotée au stade juvénile<br>Absence d'effet sur les paramètres immunitaires humoraux<br>Amélioration de la résistance à <i>Yersinia ruckeri</i> | Aubin, 2005a<br>Aubin, 2005b                                     |
| Crevettes pénaïdes<br><i>P. monodon</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Amélioration de la survie et de la croissance<br>Concentration intestinale en probiotique: $10^4$ à $10^5$ CFU.g <sup>-1</sup><br>Diminution de la concentration en vibrios dans l'intestin                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Usache et al., 2004                                              |
| <i>L. stylirostris</i>                  | <i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18/5M    | CNCM, commercial product Bactocell                           | Effet inhibiteur in vitro contre des souches pathogènes de <i>V. penaeicida</i> , <i>V. nigripulchritudo</i> et <i>V. harveyi</i><br>Amélioration de la croissance et de la survie en condition de syndrome d'hiver<br><i>P. acidilactici</i> survit et transite dans l'intestin ( $10^4$ à $10^5$ CFU.g <sup>-1</sup> ) mais ne semble pas s'implanter durablement dans le tube digestif                                                                                                             | Reynaud, 2004<br>Chim et al., 2005; Castex, 2005<br>Castex, 2005 |

\*Rapport du "Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety", Université de Milan, 2007.



**DEUXIEME PARTIE :**

**MATERIELS & METHODES**



## DEUXIEME PARTIE :

### MATERIELS & METHODES

|            |                                                                       |            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I</b>   | <b>Démarche expérimentale et expérimentations réalisées .....</b>     | <b>127</b> |
| <b>II</b>  | <b>La station expérimentale de Saint-Vincent.....</b>                 | <b>132</b> |
| <b>III</b> | <b>Pêche et stabulation des animaux .....</b>                         | <b>134</b> |
| III.1.     | <b>Pêche et transfert .....</b>                                       | <b>134</b> |
| III.2.     | <b>Dispositifs expérimentaux.....</b>                                 | <b>135</b> |
| III.2.1.   | Bacs expérimentaux de la zone extérieure.....                         | 135        |
| III.2.2.   | Bacs thermo-régulés de la salle de maturation .....                   | 135        |
| III.2.3.   | Salles d'infection expérimentale .....                                | 136        |
| III.2.4.   | Cages flottantes .....                                                | 137        |
| III.3.     | <b>Marquage individuel des crevettes.....</b>                         | <b>137</b> |
| III.4.     | <b>Conditions de stabulation .....</b>                                | <b>139</b> |
| III.4.1.   | Protocole de transfert en bacs expérimentaux .....                    | 139        |
| III.4.2.   | Renouvellement d'eau .....                                            | 139        |
| III.4.3.   | Alimentation .....                                                    | 139        |
| III.5.     | <b>Aliment expérimental .....</b>                                     | <b>140</b> |
| III.5.1.   | Formulation et production .....                                       | 140        |
| III.5.2.   | Incorporation du probiotique .....                                    | 140        |
| <b>IV</b>  | <b>Analyses.....</b>                                                  | <b>144</b> |
| IV.1.      | <b>Détermination des stades de mue .....</b>                          | <b>144</b> |
| IV.2.      | <b>Dissection et prélèvements .....</b>                               | <b>145</b> |
| IV.3.      | <b>Traitement des échantillons pour les dosages biochimiques.....</b> | <b>146</b> |
| IV.4.      | <b>Paramètres physiologiques .....</b>                                | <b>147</b> |
| IV.4.1.    | Dosage des protéines .....                                            | 148        |
| IV.4.2.    | Dosage du glucose et du glycogène.....                                | 148        |
| IV.4.3.    | Dosage des activités des enzymes digestives .....                     | 149        |
| IV.4.4.    | Mesures des bio-indicateurs du stress oxydant.....                    | 150        |
| IV.4.5.    | Analyses microbiologiques et biologie moléculaire .....               | 154        |





## **I Démarche expérimentale et expérimentations réalisées**

L'ensemble des données bibliographiques présentées ci-dessus suggère qu'il existe, chez les crevettes pénéides, des relations multiples entre l'animal et sa flore intestinale. Ces relations ont été très peu étudiées (Harris, 1993), et souvent supposées à partir des travaux réalisés chez les poissons et les animaux terrestres. Cependant, au cours des dernières années, les recherches menées sur les probiotiques ont contribué à documenter cet aspect de la biologie des Crustacés et ont notamment montré que ces bactéries bénéfiques pouvaient agir sur la microflore et la physiologie des crevettes (Farfanzar, 2006).

L'hypothèse centrale de notre travail repose sur l'existence des relations entre l'animal, sa microflore intestinale et le probiotique (Sonnenburg et al., 2006) ; l'effet probiotique serait alors fonction des rapports d'équilibre entre ces trois compartiments (Figure 1.20). Notre travail s'est attaché à étudier ces derniers au travers de l'étude (i) du devenir du probiotique au sein de l'animal (concentration, persistance, survie...) et (ii) de ses actions sur la microflore intestinale et sur certains aspects de la physiologie de la crevette.

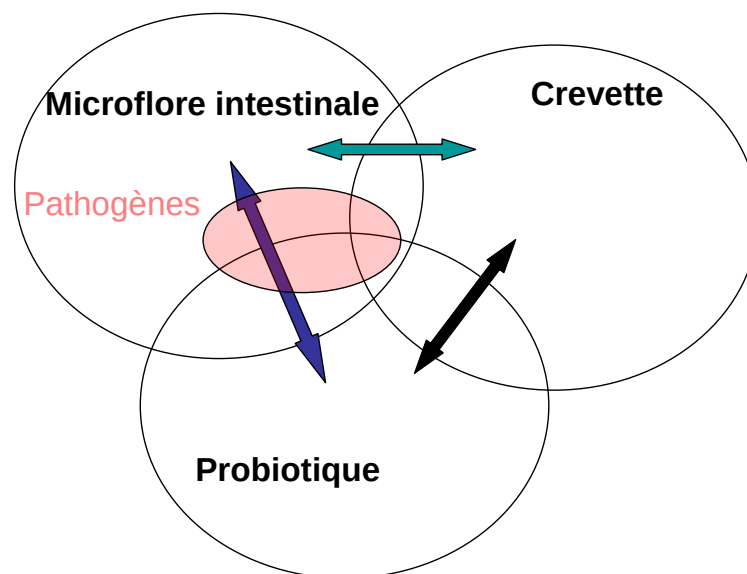


**Figure 1.20.** Schéma représentant les interactions entre l'hôte (ici la crevette), sa microflore intestinale et le probiotique. Les équilibres entre ces trois compartiments seraient à l'origine de l'effet probiotique.

Ainsi, notre démarche expérimentale a consisté dans un premier temps à répondre à des questions simples mais essentielles pour la suite de notre travail, à savoir : quelles sont les

conditions d'administration du probiotique, sachant que la crevette a la particularité de se nourrir lentement en triturant son aliment ? Quel est le devenir du probiotique après ingestion et résiste-t-il au processus de digestion ? Et enfin, quels sont ses effets sur la microflore intestinale ? Ainsi, nous avons étudié le devenir de la souche probiotique dans l'aliment et après son ingestion dans le tractus digestif de la crevette. Une grande partie de ce travail a été réalisé à l'aide de techniques classiques de microbiologie, faisant appel à des cultures bactériennes sur milieux spécifiques. La bactérie probiotique a notamment été détectée à l'aide d'un milieu spécifique des bactéries lactiques (De Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS). De plus, afin de caractériser les communautés bactériennes et l'effet du probiotique sur celles-ci, nous avons utilisé une technique de biologie moléculaire (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE). Nous avons envisagé cette méthode avant que les premiers résultats sur la crevette ne soient publiés (Li et al., 2007 ; Johnson al., 2008). L'adaptation de cette technique et sa mise en œuvre ont été réalisées en étroite collaboration avec l'équipe de Jean Louis NICOLAS (LPI, IFREMER, centre de Brest) qui utilise la DGGE pour ses études chez l'huitre. Nous verrons comment l'ensemble de ce travail nous a permis de définir les modalités d'administration du probiotique à la crevette.

Ces bases étant fixées, nous avons poursuivi notre démarche par l'étude des effets de *P. acidilactici* sur la nutrition et la résistance à une infection bactérienne de *L. stylirostris*. Avant d'aborder les aspects nutritionnels, il nous a fallu au préalable définir une méthode expérimentale permettant de quantifier précisément la croissance et l'utilisation de l'aliment par la crevette. Ainsi nous avons choisi d'utiliser la méthode croissance-ration définie par Brett (1979) pour les poissons. En effet cette méthode, originale par rapport à celles généralement utilisées chez les Pénéides, permet de déterminer les besoins alimentaires journaliers de l'animal pour l'entretien et la croissance, ainsi que les coefficients brut (K1) et net (K2) d'efficacité alimentaire. Elle pouvait également, en la couplant à des analyses biochimiques, nous permettre de mesurer les différences entre traitements et d'évaluer l'effet du probiotique sur la nutrition de la crevette.

La suite de ce travail a concerné la sensibilité de *L. stylirostris* à une infection bactérienne, quand elle est traitée avec un probiotique. Nous avons soumis les crevettes à l'infection bactérienne en utilisant des méthodes disponibles et mises au point au LEAD. Il s'agit du « syndrome 93 induit » (Legroumellec et al., Wabete et al., 2006), et de l'infection expérimentale par *V. nigripulchritudo*. Nous avons également caractérisé le statut

physiologique des animaux par la mesure de bio indicateurs du stress oxydant, dans le but notamment d'étudier les effets du probiotique sur la physiologie de la crevette en lien avec sa sensibilité à l'infection. Cette approche, centrée sur le stress oxydant, est également originale, n'ayant à ce jour fait l'objet que de rares travaux chez des crevettes infectées par le White Spot Syndrome Virus (Mathew et al., 2007).

L'ensemble des résultats obtenus à partir des différentes expérimentations nous a permis de proposer un premier scénario explicatif des effets de *P.acidilactici* dans le cadre de l'hypothèse des trois compartiments présentée ci-dessus.

Finalement, la question s'est posée d'éprouver le probiotique en conditions réelles d'élevage. Cela représentait un problème important d'un point de vue méthodologique car les bassins d'élevages semi-intensifs sont difficilement utilisables comme unités expérimentales. Pour cette raison, un travail important a été consacré à la mise au point et à l'utilisation d'une méthode originale d'élevage en cages flottantes, permettant de maintenir dans de bonnes conditions les animaux dans les bassins tout en utilisant un nombre de répliques suffisant pour une puissance statistique de 80 %. C'est grâce à cet outil que nous avons pu tester statistiquement l'effet probiotique sur une ferme commerciale.

### **Expérimentations réalisées**

Ce travail de thèse s'est donc organisé autour de trois ensembles d'expérimentations, en fonction des grands objectifs suivants:

- 1/ Etude de l'administration de *P. acidilactici* et de son optimisation chez *L. stylirostris*
- 2/ Evaluation des effets de *P. acidilactici* chez *L. stylirostris* : études expérimentales
- 3/ Etude pilote : transfert des résultats à l'échelle d'un bassin d'élevage en ferme.

Par souci de clarté, nous avons résumé dans le tableau 2.3 ci-après les études menées dans ces trois ensembles, ce qui permettra au lecteur de situer les différentes expérimentations et publications issues des résultats, présentées dans la Troisième Partie.

Ces ensembles d'expérimentations ont été menés non pas successivement, mais en parallèle. Comme nous avons choisi d'exposer, dans ce mémoire de thèse, les travaux selon une logique

thématique et non pas chronologique, le lecteur constatera que nous faisons parfois référence, dans une discussion, à des résultats présentés dans des parties ultérieures du mémoire, ce qui est possible car ils ont été obtenus et publiés antérieurement.

Bien que ce mémoire de thèse soit largement construit autour de publications, qui comportent à chaque fois un exposé des matériels et méthodes, nous avons jugé utile d'apporter, dans cette deuxième partie, des informations générales concernant les conditions expérimentales ainsi que les principales méthodes de mesure employées, tant sur les animaux que sur les paramètres biochimiques et physiologiques.

**Tableau 2.3** : Tableau de synthèse des différentes expérimentations réalisées (English version of the table in Annexe 2).

| Ensemble expérimental                                                                                                                                                      | Objectif de l'étude                                                                                                  | Dispositifs expérimentaux                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Variables mesurées                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Publications dans journaux à comité de lecture                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br> | 1. Etude de l'administration de <i>P. acidilactici</i> et optimisation de son administration chez <i>L. stylosis</i> | <p>Incorporation du probiotique dans l'aliment et suivi de sa stabilité</p> <p>Bacs expérimentaux de 500 L</p> <p>Survie des crevettes suite à un syndrome d'hiver induit plus ou moins intense - Gain de poids - Indice de conversion - Effet de <i>P. acidilactici</i> sur les concentrations bactériennes intestinales.</p> <p>Bacs expérimentaux extérieurs 500L</p> <p>Bacs intérieurs thermorégulés</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <p>Concentration en <i>P. acidilactici</i> dans l'aliment après plusieurs jours de stockage et suite à l'immersion dans l'eau de mer</p> <p>Survie des crevettes suite à un syndrome d'hiver induit plus ou moins intense - Gain de poids - Indice de conversion - Effet de <i>P. acidilactici</i> sur les concentrations bactériennes intestinales.</p> <p>Open Fish Science Journal</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <p><b>Article 1:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Evaluation of the dietary probiotic <i>P. acidilactici</i> at two levels on shrimp <i>L. stylosis</i> survival following temperature drop at the low side of its thermopreference. <b>The Open Fish Science Journal</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                            | 2. Etude de l'administration de <i>P. acidilactici</i> et optimisation de son administration chez <i>L. stylosis</i> | <p>Suivi intestinal de la souche probiotique</p> <p>Bacs expérimentaux extérieurs 500L</p> <p>Concentration en <i>P. acidilactici</i> à différents niveaux du tractus intestinal de <i>L. stylosis</i> (CFU.g<sup>-1</sup> d'organe) deux heures après la prise alimentaire. Temps de résidence et part relative par rapport à la microflore intestinale</p> <p>Survie de la concentration en <i>P. acidilactici</i> dans le tube digestif moyen et postérieur de <i>L. stylosis</i> (CFU.g<sup>-1</sup> d'organe) sur 24 heures après 2, 4 ou 6 repas par jour.</p> <p>Profil DGGE et identifications spécifiques</p> <p>Bacs expérimentaux extérieurs 1600L</p> <p>Effet de <i>P. acidilactici</i> sur les communautés bactériennes au sein du tractus intestinal de la crevette</p> <p>Bacs expérimentaux 1600L - cages flottantes</p>                                                                                                                                    | <p>Concentration en <i>P. acidilactici</i> à différents niveaux du tractus intestinal de <i>L. stylosis</i> (CFU.g<sup>-1</sup> d'organe) deux heures après la prise alimentaire. Temps de résidence et part relative par rapport à la microflore intestinale</p> <p>Survie de la concentration en <i>P. acidilactici</i> dans le tube digestif moyen et postérieur de <i>L. stylosis</i> (CFU.g<sup>-1</sup> d'organe) sur 24 heures après 2, 4 ou 6 repas par jour.</p> <p>Profil DGGE et identifications spécifiques</p>                                                                                                                                                                                                                                   | <p><b>Article 2:</b> Chim, L., Castex, M., Wabete, N., Lemaire, N., Massabuau, J.C. Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp <i>Litopenaeus stylosis</i> by using individual measurements and nested design. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                                                                                                                                                            | 3. Etude de l'administration de <i>P. acidilactici</i> et optimisation de son administration chez <i>L. stylosis</i> | <p>Adaptation de la méthode "croissance ration" à la crevette pénée. Utilisation de valeurs individuelles et d'un plan expérimental hiérarchique</p> <p>Bacs expérimentaux extérieurs 500L</p> <p>Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1) - Efficacité nette d'utilisation (K2) - Ration d'entretien - Ration optimale - Scope for growth.</p> <p>Survie - Croissance individuelle (RGR) - Quantité d'aliment ingéré - Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1) - Efficacité nette d'utilisation (K2) - Ration d'entretien - Ration optimale - Activité des enzymes digestives (trypsine et <math>\alpha</math> amylase) - Glucose - Glycogène - Statut antioxydant total (TAS) -</p> <p>Survie - Prévalence et portage en <i>V. nigrilipchritudo</i> dans l'hémolymph des crevettes - Détermination de différents biomarqueurs des défenses anti-oxydantes et du stress oxydant.</p> <p>Bacs expérimentaux extérieurs 500L</p> <p>Salles d'infection expérimentale</p> | <p>Croissance individuelle (RGR) - quantité d'aliment ingéré - FCR - Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1) - Efficacité nette d'utilisation (K2) - Ration d'entretien - Ration optimale - Scope for growth.</p> <p>Survie - Croissance individuelle (RGR) - Quantité d'aliment ingéré - Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1) - Efficacité nette d'utilisation (K2) - Ration d'entretien - Ration optimale - Activité des enzymes digestives (trypsine et <math>\alpha</math> amylase) - Glucose - Glycogène - Statut antioxydant total (TAS) -</p> <p>Survie - Prévalence et portage en <i>V. nigrilipchritudo</i> dans l'hémolymph des crevettes - Détermination de différents biomarqueurs des défenses anti-oxydantes et du stress oxydant.</p> | <p><b>Article 3:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Marijous, C., Chim, L. Study of probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> effects on shrimp growth parameters based on an individual growth and ration size method. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b></p> <p><b>Article 4:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of dietary probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress status in <i>Litopenaeus stylosis</i> shrimp. <b>Submitted Aquaculture</b></p> <p><b>Article 5:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of probiotic <i>P. acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress of <i>Litopenaeus stylosis</i> under <i>Vibrio nigrilipchritudo</i> challenge. <b>Submitted Fish and shellfish immunology</b></p> |
|                                                                                                                                                                            | 4. Etude de l'administration de <i>P. acidilactici</i> et optimisation de son administration chez <i>L. stylosis</i> | <p>Développement d'une méthode expérimentale originale basée sur l'utilisation de cages flottantes immergées dans des bassins d'élevage</p> <p>Cages flottantes</p> <p>Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Puissance statistique - Sensibilité et détermination du nombre de réplicats nécessaire pour une puissance statistique &gt;80%</p> <p>Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> à l'aide de la méthode "cage flottante" sur une ferme d'élevage de Nouvelle Calédonie atteinte par le syndrome d'été</p> <p>Cages flottantes</p> <p>Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Concentration bactériennes intestinales (flore totale, flore vibronacée, <i>P. acidilactici</i>) - Prévalence et portage en <i>V. nigrilipchritudo</i> dans l'hémolymph des crevettes - Activité des enzymes digestives - Hepatosomatic index (HSI)</p>                                                                            | <p>Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Puissance statistique - Sensibilité et détermination du nombre de réplicats nécessaire pour une puissance statistique &gt;80%</p> <p>Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Concentration bactériennes intestinales (flore totale, flore vibronacée, <i>P. acidilactici</i>) - Prévalence et portage en <i>V. nigrilipchritudo</i> dans l'hémolymph des crevettes - Activité des enzymes digestives - Hepatosomatic index (HSI)</p>                                                                                                                                                                                                                                     | <p><b>Article 6:</b> Chim, L., Castex, M., Pham, D., Brun, P., Lemaire, P., Wabete, N., Schmiedly, P., Marijous, C. Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. <b>Aquaculture</b> 279, 63-6.</p> <p><b>Article 7:</b> Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmiedly, P., Marijous, C. Probiotic <i>P. acidilactici</i> application in shrimp <i>Litopenaeus stylosis</i> culture subject to vibriosis in New Caledonia. <b>Aquaculture</b> 275, 182-193.</p>                                                                                                                                                                                                                                           |



## **II La station expérimentale de Saint-Vincent**

Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont été réalisées dans les laboratoires du Département Lagon, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (**LEAD/NC**) de l'IFREMER Nouvelle-Calédonie, anciennement Département Aquaculture en Calédonie (DAC). La délégation IFREMER de Nouvelle Calédonie est basée à Nouméa et ses installations expérimentales sont regroupées à 75 Km au nord de Nouméa, sur la commune de Boulouparis. Cette station aquacole expérimentale située en bordure de la baie de Saint Vincent (SASV, Figure 2.1) est en service depuis 1970 et a contribué au développement historique de l'élevage de crevettes en Nouvelle-Calédonie, en collaboration avec le Centre Océanologique de Pacifique (IFREMER, AQUACOP, Tahiti).

La SASV a d'abord joué un rôle de ferme et d'écloserie de démonstration, mettant au point des techniques d'élevage. Par la suite, un transfert au secteur privé a été réalisé et les fermes de crevettes ont commencé à se développer sur le territoire. Les activités de l'IFREMER ont alors été réorientées afin d'offrir un soutien scientifique à la forte croissance de la filière crevette : un renfort de d'effectifs et de compétences a permis d'aborder des sujets de recherche pluridisciplinaires. Dès lors, le DAC s'est consacré à la recherche définie par le programme DESANS (DEfi SANté Stylirostris, 2003-2006) qui s'intéressait aux causes et remèdes à apporter aux mortalités atypiques qui affectent les élevages en saison froide et en saison chaude.

Le programme DESANS a représenté un changement profond dans la nature des recherches conduites à la SASV, nécessitant notamment une réhabilitation des installations expérimentales, en cours, et la création d'un second laboratoire à Koné, en 2006. Ces deux laboratoires travaillent exclusivement sur la crevetticulture selon deux axes complémentaires :

- l'unité de Saint-Vincent se consacre à la recherche pluridisciplinaire (pathologie, environnement, écophysiologie, génétique),
- l'unité de Koné est chargée du suivi technique et sanitaire de la filière crevette et du transfert à la profession des résultats issus de la recherche.



Parmi les infrastructures existant à Saint Vincent (certaines étant destinées à être agrandies ou remplacées), on notera particulièrement (Figure 2.1):

- un bâtiment de pathologie expérimentale,
- des installations de zootechnie expérimentale : (i) une zone expérimentale extérieure sous ombrage, (ii) une série de bassins en terre de différentes superficies (500m<sup>2</sup> à 100000m<sup>2</sup>), (iii) et une écloserie expérimentale, bientôt remplacée par une nouvelle installation,
- un laboratoire « semi-humide » comprenant une salle de prélèvement et de traitement d'échantillons ainsi qu'une salle spécifique aux analyses d'eau et de sédiment,
- des laboratoires d'analyse comprenant: un laboratoire-container destiné aux observations microscopiques et aux travaux de biologie moléculaire de base (PCR, électrophorèse), un laboratoire-container spécifiquement aménagé pour les expérimentations sur la physiologie respiratoire de la crevette, un bâtiment de 70 m<sup>2</sup> comprenant le laboratoire de microbiologie et d'analyses chimiques et biochimiques, et une extension du laboratoire, récemment livrée, destinée à abriter un laboratoire de biologie moléculaire.
- 



**Figure 2.1** : Station aquacole expérimentale IFREMER de Saint Vincent (SASV).

La délégation IFREMER apporte également ses compétences et moyens à différentes initiatives locales pour la diversification aquacole et le développement de coopérations régionales (Australie et îles du Pacifique). L'IFREMER contribue aussi par différents moyens à l'étude de l'environnement littoral et à l'évaluation des ressources minérales potentielles de la ZEE dans le cadre de plusieurs programmes.

### **III Pêche et stabulation des animaux**

#### **III.1. Pêche et transfert**

Les animaux utilisés pour chaque expérimentation ont été capturés, à l'aide d'un épervier, dans les bassins en terre de la station IFREMER de Saint-Vincent (Figure 2.2). Après la pêche, les animaux ont été immédiatement acheminés vers le laboratoire à l'aide de paniers en Netlon<sup>®</sup> disposés dans des compartiments de 50 L sur une remorque-container spécialement conçue à cet usage. Les compartiments étaient préalablement remplis d'eau de mer. La température de l'eau avoisinait celle du bassin et variait selon la saison d'élevage : en été ( $T_w = 28-31^{\circ}\text{C}$ ) et en hiver ( $T_w = 19-21^{\circ}\text{C}$ ).



**Figure 2.2** : Pêche des crevettes *L. stylirostris* dans les bassins de terre de la station expérimentale de Saint Vincent. Les crevettes sont pêchées dans un bassin d'élevage (A) proche du laboratoire (étoile) à l'aide d'un épervier (B), ramenées sur les berges du bassin (C) puis transférées dans des compartiments remplis d'eau de mer (D). Elles sont ensuite transportées vers les bacs expérimentaux situés à 150-200 m (étoile) à l'aide d'une remorque dédiée à cet effet (E).

## III.2. Dispositifs expérimentaux

Au cours de nos travaux, les animaux ont été transférés soit dans des bacs expérimentaux en zone extérieure, soit en salle de maturation ou d'infection expérimentale, soit dans des cages flottantes, selon les objectifs de l'expérimentation.

### III.2.1. Bacs expérimentaux de la zone extérieure

Les bacs expérimentaux extérieurs de la station de Saint-Vincent utilisés au cours de ce travail sont des bacs circulaires en polyester de deux tailles différentes:

- (i) des petits bacs de 500 L (diamètre, 118.5 cm ; hauteur, 69 cm ; surface au fond, 92 cm<sup>2</sup> ; capacité 536 L),
- (ii) des grands bacs de 1600 L (diamètre, 220.5 cm ; hauteur, 125 cm ; surface au fond, 143 cm<sup>2</sup> ; capacité 1600 L).

Ces bacs, situés en zone extérieure, sont abrités sous une toile d'ombrage et soumis à une photopériode naturelle, l'eau n'y était pas thermo-régulée. Chaque bac est alimenté en air surpressé à l'aide d'un diffuseur d'air posé sur le fond. Enfin, des distributeurs automatiques d'aliment étaient installés sur chaque bac pour les expérimentations nécessitant des fréquences d'alimentation supérieures à deux repas par 24 h (Figure 2.3. A).

### III.2.2. Bacs thermo régulés de la salle de maturation

Les bacs de maturation utilisés sont des bacs en scobalite® (plaque de fibre de verre de 1 mm d'épaisseur) de forme circulaire. Tous les bacs mesurent 1,25 m de haut pour une profondeur d'eau de 50 cm et ont un diamètre de 3 m. Le fond des bacs est constitué d'une couche inférieure de gravier, séparée par du Bidim® (géotextile), d'une couche supérieure de sable. L'épaisseur totale du substrat est de 8-10 cm. Chaque bac est alimenté en eau de mer par un tube PVC (4 cm de diamètre) équipé d'une vanne. Le centre de chaque bac est doté d'une évacuation sur laquelle est fixé verticalement un tube PVC (9 cm de diamètre) correspondant à la hauteur d'eau. Chaque bac est également équipé d'un système d'air lift connecté à un réseau circulaire de tubes PVC enfoui dans la couche inférieure du sédiment. Avec ce système, l'eau du bac circule du haut vers le bas à travers le fond de sable, qui agit ainsi

comme un filtre mécanique. Une aération supplémentaire est apportée à chaque bac par deux diffuseurs d'air posés sur le fond. Le contrôle de la température est assuré par un thermostat (RENA®, modèle DPS2A) relié à une résistance chauffante en verre (3000 watts) disposée dans chaque bac.



**Figure 2.3 :** Installations expérimentales utilisées lors des différentes études. (A) bacs expérimentaux équipés de la zone extérieure, (B) Bacs des salles d'infection expérimentale, (C) Cages flottantes du DAC Saint Vincent, (D) Cages flottantes utilisées au cours de l'expérimentation sur la ferme commerciale.

### III.2.3. Salles d'infection expérimentale

Le DAC de Saint Vincent dispose de deux salles expérimentales de pathologie (Figure 2.3.B). Ces deux salles contiennent chacune 16 bacs en fibre de verre de 300 L, chacun alimenté en eau de mer filtrée à 5  $\mu$ m. Le réseau de circulation permet le renouvellement de l'eau de mer des bacs et la gestion approximative des débits. La température des salles est contrôlée grâce à

deux climatiseurs réversibles présents dans chacune d'elles. Après l'infection expérimentale (baignade dans une suspension bactérienne), les effluents sont orientés vers des cuves extérieures de 10.000 L, dont le contenu est traité à l'hypochlorite de calcium avant rejet de l'eau désinfectée vers le milieu extérieur. Au cours de ce travail de thèse, ces deux salles expérimentales ont été utilisées pour (i) évaluer l'effet d'une infection par *V. nigripulchritudo* (souche hautement pathogène (Sfn1), Reynaud, 2008) sur les défenses anti-oxydantes et le niveau de stress oxydant chez *L. stylirostris*, et (ii) afin de tester l'effet d'un apport alimentaire avec le probiotique *P. acidilactici* sur ces paramètres.

#### III.2.4. Cages flottantes

Au cours de cette thèse, nous avons développé un système d'élevage des crevettes en cages flottantes immergées dans des bassins d'élevage (Figure 2.3.C). Les crevettes s'adaptent particulièrement bien aux conditions d'élevage en cages flottantes (Paquette *et al.* 1998). Nous avons ainsi pu maintenir des crevettes en élevage pendant plusieurs mois dans des conditions équivalentes à celles du bassin d'élevage, tout en séparant les lots selon les traitements, avec un nombre de réplicats nécessaire à une puissance statistique de 80 % (puissance minimale généralement admise en biologie).

Les cages flottantes étaient constituées d'un cadre (4 m x 2 m) en tube en PVC 160 (servant de flotteur) sur lequel était fixé un filet (netlon®) de 5mm de maille. La hauteur de filet immergé était d'environ 50 cm, et la cage était recouverte d'un filet empêchant les crevettes de sauter. Les informations relatives à ce système d'élevage sont détaillées dans la publication «Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions» (cf Troisième partie, Chapitre 4)

### III.3. Marquage individuel des crevettes

Au cours des expérimentations visant à évaluer l'effet du probiotique sur la croissance des crevettes, les crevettes ont été marquées individuellement. Cette technique, peu utilisée dans les travaux de nutrition sur les crevettes, permet une mesure plus précise de la croissance des animaux, tout en évitant la sélection, souvent difficile à mettre en œuvre en pratique, d'animaux de même poids initial en début d'expérimentation. Le marquage était réalisé après le transfert des animaux en zone expérimentale, au moment de leur répartition dans les bacs



expérimentaux. Dans certains cas (en hiver ou lorsque la température de l'eau dépassait 28°C) le marquage a été réalisé après une période d'acclimatation des animaux de quelques jours, afin d'éviter un stress trop important.

Le marquage était réalisé par injection sous-cuticulaire de 5-10  $\mu$ L d'élastomère coloré au niveau de l'abdomen (Norwest Marine Technology ; Figure 2.4). Cinq positions distinctes de l'abdomen peuvent être marquées:

- 1<sup>er</sup> segment position latérale à droite et à gauche,
- avant-dernier segment latéral droit et gauche,
- et dernier segment en position medio-dorsale.

A ces 5 positions étaient associées six couleurs d'élastomère (rouge, vert, jaune, violet, rose et blanc) ce qui permettait de reconnaître jusqu'à 30 individus dans un lot en expérimentation.

Le grand avantage de cette technique est qu'une fois injecté, l'élastomère présente une grande stabilité dans le temps et résiste en particulier aux mues successives des crevettes en élevage (Godin *et al.*, 1996). Dans le cadre du programme génétique du DAC, les populations de crevettes marquées au stade juvénile (poids moyen 1-2 g) restent identifiables jusqu'au stade géniteur (après 8 mois d'élevage).



**Figure 2.4 :** Marquage en position médio-dorsale sur le deuxième segment de l'abdomen de *L. stylirostris*.

### III.4. Conditions de stabulation

#### III.4.1. Protocole de transfert en bacs expérimentaux

Suite à la pêche et au transfert des animaux en bacs expérimentaux, un protocole spécifique d'acclimatation des animaux a été systématiquement utilisé. Ce protocole, adapté des travaux de Wabete *et al.* (2006), consistait au transfert des animaux dans une eau maintenue à une salinité de 26 ppm, avec une période de jeûne de 72 h. La salinité de 26 ppm correspond au point iso-osmotique chez des crevettes sub-adultes (Lemaire *et al.*, 2002). Ce protocole a ainsi permis de réduire les mortalités au transfert, en limitant les perturbations physiologiques provoquées par la pêche et la manipulation des animaux, plus particulièrement en hiver (Wabete, 2005).

#### III.4.2. Renouvellement d'eau

Le renouvellement d'eau était effectué en circuit ouvert. L'eau de mer, pompée dans le lagon (bassin de Saint Vincent), et stockée dans une réserve située à 8 m en hauteur, était distribuée par gravité dans les bacs après passage dans un filtre à sable. Selon les conditions expérimentales, le renouvellement en eau des bacs était compris entre 50 et 200 % par jour. L'eau était oxygénée en continu par injection d'air surpressé. ( $PO_2 = 20\text{-}21$  kPa,  $PCO_2 = 0.1$  kPa;  $pH \approx 7.76 \pm 0.05$ ).

#### III.4.3. Alimentation

Les expérimentations ont été réalisées avec des crevettes juvéniles et sub-adultes (poids frais compris entre 3 et 20 g). En phase de stabulation, avant le début de chaque expérimentation, les animaux ont été nourris avec un aliment expérimental fabriqué au laboratoire (de même composition quelle que soit l'expérimentation, voir paragraphe suivant), ou avec un aliment commercial (pour l'expérimentation sur ferme commerciale). La ration journalière « ad libitum », déterminée en fonction des restes observés et de la saison, variait de 3 à 5 % de la biomasse des animaux dans l'enceinte d'élevage (bacs ou cages) et était divisée en 2, 4 ou 6 repas égaux en fonction des expérimentations.

### **III.5. Aliment expérimental**

#### **III.5.1. Formulation et production**

Un aliment expérimental de référence pour le laboratoire était produit dans l'atelier aliment de l'unité de Saint-Vincent (Tableaux 2.1 & 2.2). Les ingrédients étaient préalablement broyés à l'aide d'un broyeur de laboratoire (Retsch®) avec une grille de 1 mm. Les farines obtenues étaient ensuite mélangées à l'huile et l'eau dans un mélangeur horizontal (Mainca®) jusqu'à atteindre une consistance permettant le pressage. Le mélange était alors extrudé dans un hachoir à viande à travers une filière de 3 mm. Après séchage dans une étuve ventilée (Venticell® 222) jusqu'à atteindre une humidité résiduelle inférieure à 10 %, l'aliment était cassé afin d'obtenir des granulés de 4 à 5 mm de longueur. La quantité fabriquée était calculée en fonction des besoins de l'expérience et l'aliment était alors conservé à -20°C au congélateur.

#### **III.5.2. Incorporation du probiotique**

##### **III.5.2.1. Produit utilisé**

La bactérie concernée est une bactérie lactique, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, enregistrée au Centre National de Culture des Microorganismes à l'Institut Pasteur (CNCM, Paris, France). Cette bactérie a été utilisée sous sa forme commerciale (Bactocell® PA10) fournie par la Société Lallemant. L'analyse du produit pour les risques de contamination par des substances indésirables est systématiquement assurée par le fabricant. De plus, une étude de stabilité en vieillissement accéléré, réalisée également par le fabricant, a montré que le ferment lactique Bactocell® avait une bonne stabilité vis-à-vis de l'humidité, mais que l'action de la température, au-delà de 40°C, conduisait à une dégradation du produit (période maximale de stabilité de 1 mois à 40°C).



**Tableau 2.1** : Composition de l'aliment expérimental fabriqué au laboratoire de Saint-Vincent, Nouvelle-Calédonie.

| Ingrédients                                        | %    |
|----------------------------------------------------|------|
| Farine de poisson basse température <sup>(a)</sup> | 30   |
| Farine de soja <sup>(b)</sup>                      | 20   |
| Farine de blé <sup>(c)</sup>                       | 37   |
| Gluten                                             | 7    |
| Huile de poisson*                                  | 2    |
| Huile de soja                                      | 2    |
| Lécithine de soja <sup>(d)</sup>                   | 2    |
| Prémix de vitamine pour crevette <sup>(e)</sup>    | 0.05 |
| Prémix de minéraux pour crevette <sup>(e)</sup>    | 0.1  |
| Vitamine C (330mg C/kg)                            | 0.04 |

<sup>(a)</sup> Provenance Chili à base d'anchois et/ou maquereaux

<sup>(b)</sup> Tourteau de grains de soja décortiqué et déhuilé par solvant

<sup>(c)</sup> obtenu par broyage de blé entier pour alimentation animal.

<sup>(d)</sup> Ultralec® ADM lecithin, Decatur, IL, USA.

<sup>(e)</sup> prémix fourni par la société SICA (Goodman Fielder)

\* huile utilisée en enrobage

**Tableau 2.2** : Composition chimique, énergie brute (GE) et digestible (DE) des aliments commercial et expérimental (Laboratoire Saint-Vincent) utilisés au cours de nos travaux.

| Aliment                                    | Expérimental |      |          | Commercial |      |          |
|--------------------------------------------|--------------|------|----------|------------|------|----------|
|                                            | n            | Mean | Std.Err. | n          | Mean | Std.Err. |
| Protéine <sup>(a)</sup> (%)                | 5            | 43.8 | 0.2      | 36         | 43.2 | 0.2      |
| Matière grasse <sup>(b)</sup> (%)          | 5            | 10.0 | 0.3      | 25         | 7.1  | 0.2      |
| Fibre <sup>(c)</sup> (%)                   | 5            | 2.0  | 0.3      | 35         | 3.8  | 0.1      |
| Cendre <sup>(d)</sup> (%)                  | 5            | 6.9  | 0.1      | 36         | 12.6 | 0.2      |
| GE <sup>(e)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> ) |              | 4502 |          |            | 4172 |          |
| DE <sup>(f)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> ) |              | 3364 |          |            | 3047 |          |

<sup>(a)</sup> dosage selon norme ISO5983

<sup>(b)</sup> dosage selon norme NF V18-117/B

<sup>(c)</sup> dosage selon norme NF V03-040

<sup>(d)</sup> dosage selon norme NF V18-101

<sup>(e)</sup> correspond à la somme des énergies brutes de chaque ingrédient

<sup>(f)</sup> correspond à la somme des énergies digestibles de chaque ingrédient

Une analyse statistique a permis de proposer une durée de validité du produit égale à 6 mois à une température ambiante et pour une teneur minimale à péremption à  $10^{10}$  CFU.g<sup>-1</sup> (CFU pour « Colony Forming Unit ») Ainsi, dans le cadre de notre travail, un produit neuf stocké à 20°C, dont la date de fabrication n'excédait jamais les 12 mois, comme conseillé par le fabricant, a été utilisé pour chaque expérimentation. Avant chaque utilisation, des numérations étaient systématiquement réalisées selon un protocole fourni par le fabricant (voir ci-après), afin de vérifier la concentration du produit brut.

### **III.5.2.2. Protocole d'incorporation**

Les conditions de fabrication des aliments composés sont souvent extrêmes (températures, pressions,...), et présentent différents points critiques au cours du process. Il est à noter que ces conditions de fabrication sont particulièrement contraignantes pour les aliments destinés aux crevettes d'élevage. En effet le process impose des températures dépassant généralement 90-100°C sur des périodes de 10 à plus de 20 minutes. Face à ces contraintes rendant l'incorporation des probiotiques plus ou moins difficile en fonction de leurs caractéristiques (résistance à la température, à différentes pressions...), des solutions alternatives reposant sur des technologies adaptées existent (sprayage post-granulation, incorporation en poudre post-granulation, utilisation de produits micro-encapsulés...). Ces techniques sont aujourd'hui bien connues et interviennent généralement en aval du process de fabrication du granulé. Le type d'incorporation choisi dépendra du type d'application et des caractéristiques du produit.

Dans notre cas, pour chaque expérimentation le probiotique *P. acidilactici* a été utilisé sous sa forme commerciale (Bactocell® PA10), poudre hydrodispersible dans laquelle les bactéries sont lyophilisées, destinée à une incorporation dans l'aliment. Au cours de notre étude, le probiotique a été incorporé dans l'aliment, après granulation, par enrobage selon la séquence suivante: (1) dilution dans l'huile de poisson, puis (2) enrobage direct de l'aliment granulé à l'aide d'un mélangeur horizontal (Mainca®). On utilise 2 à 3 % d'huile afin de garantir un enrobage homogène, la concentration finale en huile n'excédant jamais les 4 à 5 % de la composition totale de l'aliment. Une étude préliminaire (Castex, 2005) avait montré que ce protocole d'enrobage permettait d'atteindre la concentration attendue en probiotique tout en garantissant une bonne homogénéité (Figure 2.5.).

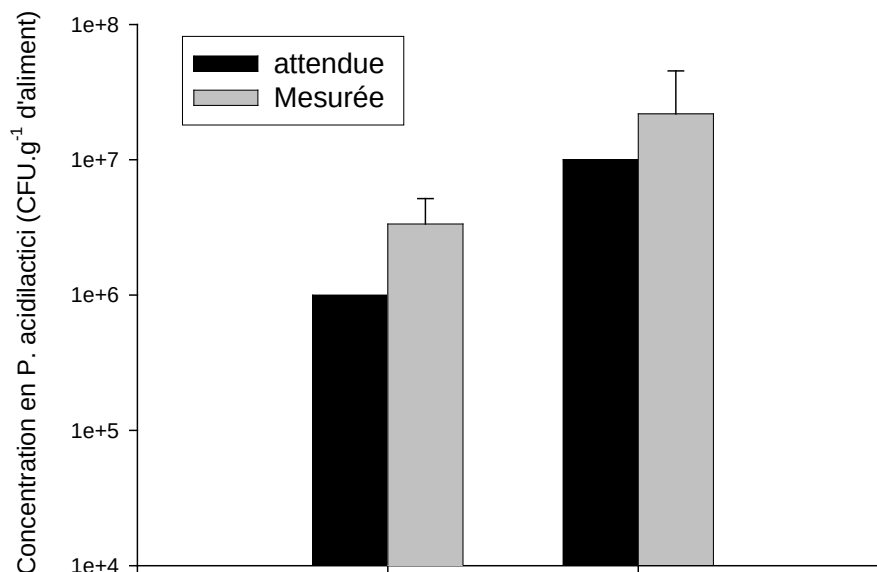


**Figure 2.5 :** Concentration mesurée en *P. acidilactici* dans l'aliment expérimental après enrobage. La concentration théorique attendu (noir) est comparée à la concentration mesurée (en gris). Les analyses ont été réalisées sur trois lots de 1kg (3 échantillons par lot) de chaque aliment (Castex, 2005).

Parallèlement à la fabrication de l'aliment avec probiotique, l'aliment témoin était systématiquement enrobé selon le même protocole avec de l'huile de poisson sans probiotique. Une fois enrobé, la concentration en *P. acidilactici* dans l'aliment était systématiquement déterminée (prélèvement de 3 échantillons de 1 kg par lot), puis l'aliment était stocké à 20°C dans des containers en plastique identifiés en fonction du traitement. Au cours des expérimentations, un lot d'aliment fraîchement enrobé était préparé tous les 15 jours.

### III.5.2.3. Dosage de *P. acidilactici* dans l'aliment

Le dosage de la bactérie *Pediococcus acidilactici* MA18/5M a été réalisé systématiquement sur le produit brut et sur l'aliment enrobé avant chaque expérimentation. Le produit à analyser (1 g de produit brut ou 10 g d'aliment) était pesé puis homogénéisé au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution d'eau peptonée. Le dénombrement était ensuite réalisé après dilutions successives et étalement en triplicats de 100 µL de la dilution choisie sur bûtes de Pétri (De Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS) à l'aide de pipettes stériles. Les numérations étaient réalisées après 24 à 48 h d'incubation à 45°C, et seules les boîtes comprenant entre 30 et 300 colonies étaient

prises en compte. Les résultats étaient alors exprimés en UFC.g<sup>-1</sup> de produit brut ou d'aliment à doser, et comparés aux concentrations théoriques attendues.

Le milieu MRS permet la croissance de toutes les bactéries lactiques. La spécificité de ce milieu a été améliorée par une incubation à 45°C, car *P.acidilactici* est une des rares espèces de bactéries lactiques poussant dans ces conditions.

## **IV Analyses**

Les analyses ont été réalisées en conditions de laboratoire, sur les prélèvements effectués suite à la pêche en bassin expérimental et au transfert des crevettes (temps de transfert inférieur à 30 mn). Les prélèvements ont été réalisés dans deux salles différentes selon le type d'installation expérimentale considéré:

- dans la majeure partie des cas les animaux pêchés étaient disséqués au laboratoire « semi-humide » réservé à cet effet,
- lors des infections expérimentales, les prélèvements étaient effectués dans une pièce réservée à cet effet et sous contrôle sanitaire.

Chaque séquence de prélèvement a nécessité la présence d'un minimum de 4-5 personnes: 1-2 personnes à la pêche et au transfert des animaux, et 2-3 personnes chargées des prélèvements au laboratoire. Ainsi, il était possible de déterminer rapidement le poids, le stade de mue, et de prélever l'hémolymphe et le tractus intestinal des crevettes. Les prélèvements nécessitant des conditions stériles ont été réalisés à proximité de la flamme d'un bec bunsen dans une zone réservée à cet effet. Les analyses microbiologiques étaient réalisées par la suite dans le laboratoire de microbiologie à proximité.

### **IV.1. Détermination des stades de mue**

La détermination du stade de mue est basée sur les travaux de Drach et Tchernigovtzeff (1967). Elle consiste en l'observation, sous loupe binoculaire, de la base des soies des écailles antennaires de la crevette. Pour l'ensemble de nos expérimentations, seuls les animaux au stade intermue (C4) ont été retenus pour les analyses biochimiques.

## IV.2. Dissection et prélèvements

Les prélèvements sur animaux ont concerné, en fonction des expérimentations, l'hémolymph, la glande digestive, l'estomac (ou tube digestif antérieur) et le tube digestif moyen et postérieur. L'hémolymph était systématiquement prélevée en premier puis l'estomac, le tube digestif et enfin la glande digestive étaient retirés. Lors des prélèvements pour analyses microbiologiques, la cuticule des animaux était systématiquement nettoyée à l'alcool à 70 %, afin de limiter les risques de contamination au moment de la dissection (Sakata, 1989).

**Les prélèvements sanguins** (100 à 250  $\mu$ L d'hémolymph) ont été ponctionnés au niveau du sinus infrabranchial (sang veineux) à l'aide d'aiguilles et de seringues de 1 mL stériles, introduites en arrière du céphalothorax au niveau de la première paire de pléopodes (Figure 2.6). Les échantillons d'hémolymph étaient utilisés en l'état pour les analyses microbiologiques et/ou dilués dans une solution anticoagulante (Tampon Trisodium citrate 30mM, 0,34M sodium chloride, et 1mM EDTA, stocké à 4°C) puis congelés dans l'azote liquide et conservés à - 80°C pour les analyses biochimiques ultérieures.

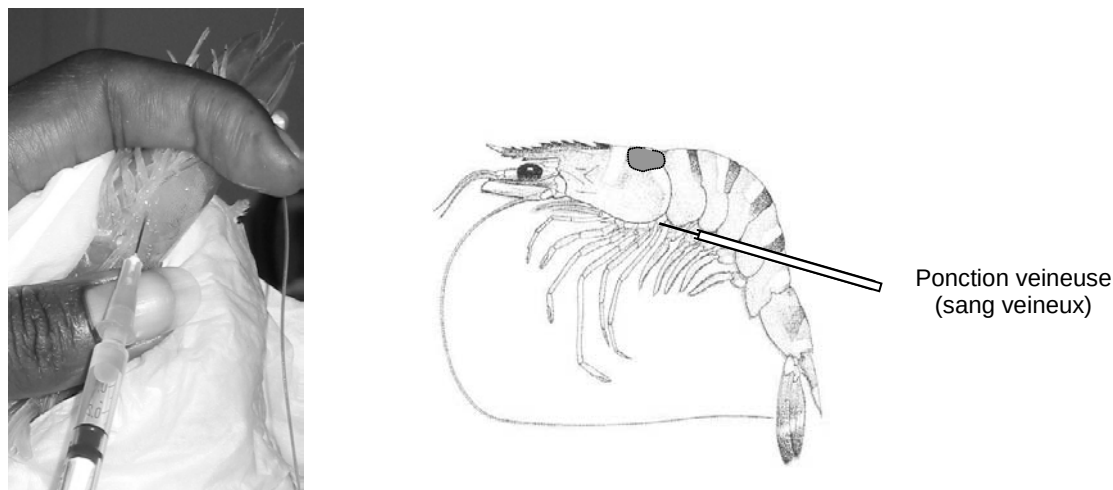


**Figure 2.6** : Prélèvement d'hémolymph chez *Litopenaeus stylirostris*. L'échantillon veineux est prélevé dans le sinus infra-branchial ventral. Sur la photo, exemple d'un prélèvement destiné aux analyses biochimique

**Le tractus intestinal** (estomac, glande digestive et tube digestif moyen et postérieur) a été prélevé en conditions stériles. Les portions prélevées comprenaient la partie antérieure du tractus intestinal, contenant l'estomac, et l'intestin moyen et postérieur de la sortie de

l'estomac jusqu'au dernier segment de l'abdomen (Dall, 1967). La glande digestive était ensuite prélevée comme indiqué sur la figure 2.7. Après dissection de l'organe, les échantillons réservés aux analyses biochimique étaient systématiquement congelés à -80°C dans l'azote liquide. Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques étaient immédiatement traités.

### IV.3. Traitement des échantillons pour les dosages biochimiques

Les échantillons étaient tout d'abord décongelés puis homogénéisés à froid pendant 1 min, à l'aide d'un ultraturrax (glande digestive) ou d'un vortex (hémolymphe), dans deux tampons différents selon le paramètre mesuré :

- un tampon Tris (10mM tris[hydroxyméthyl]amino méthane), 1mM DTPA (éthylène diamine pentacetic acid) et 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride), pH 7.4)
- un tampon spécifique dédié à la mesure du statut anti-oxydant total (TAS) (Tampon Trisodium citrate 30mM, 0,34M sodium chloride, 1mM EDTA).

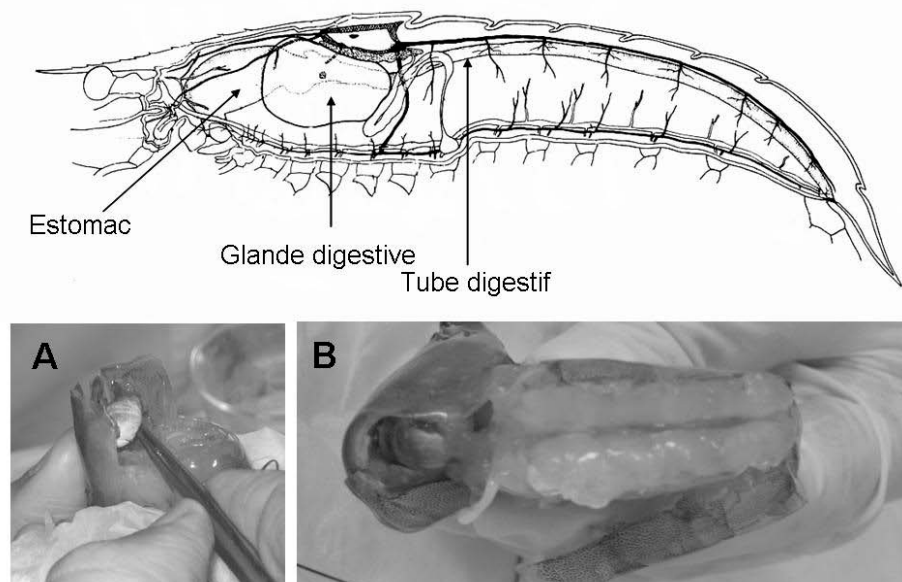


**Figure 2.7** : Dissection et prélèvement de la glande digestive et du tube digestif de *L. stylirostris*. (A) prélèvement de la glande digestive pour détermination des défenses anti-oxydantes, (B) prélèvement du tube digestif pour numération et détermination des communautés bactériennes associées.

Les homogénats étaient ensuite centrifugés à froid (4°C) pendant 10 min à 4000 rpm, pour éliminer les débris. Les surnageants des échantillons traités dans le tampon Tris étaient ensuite aliquotés et subissaient ensuite deux traitements différents selon les dosages (Figure 2.8). En effet, certains dosages nécessitaient un traitement préalable afin de faire éclater les cellules. Ce traitement consistait en un « choc » thermique (une minute dans l'azote liquide puis décongélation à 37°C) appliqué trois fois successivement.

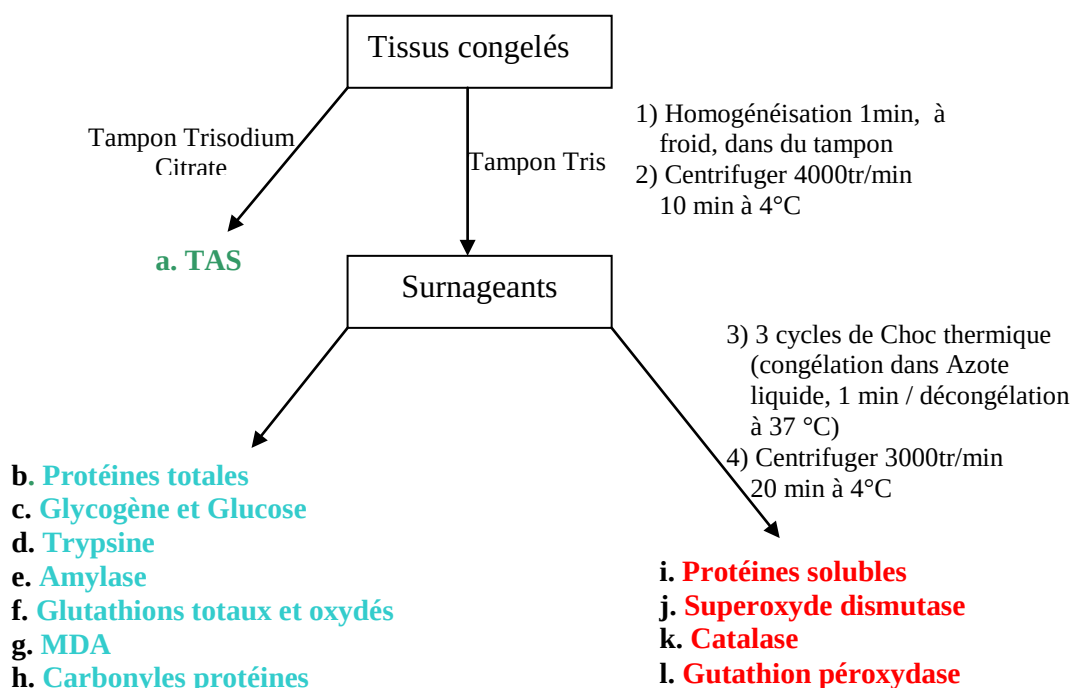


**Figure 2.8 :** Résumé des protocoles de traitement des échantillons en fonction des paramètres mesurés. En rouge, les paramètres mesurés uniquement dans la glande digestive ; en vert, ceux mesurés dans l'hémolymph et la glande digestive.

#### IV.4. Paramètres physiologiques

Les dosages des paramètres physiologiques ont été réalisés par méthodes spectrophotométriques, à l'aide d'un lecteur de microplaque (96 puits) SYNERGY HT, de la marque BIOTEK. L'utilisation des microplaques a permis une réduction des volumes de prise d'essai et des réactifs nécessaires, et la réalisation de 4 réplifications de lecture par échantillon. Chaque protocole de dosage a été préalablement adapté et calibré pour nos analyses.

#### IV.4.1. Dosage des protéines

Le dosage était réalisé directement sur le surnageant, dilué au  $1/10^{\text{ème}}$ . La concentration en protéines de chaque échantillon a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951) modifiée par Ohnishi *et al.* (1978). La méthode combine une réaction au Biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du Biuret. Cette méthode colorimétrique, très sensible, nécessite une dilution des échantillons à des concentrations comprises entre 0,15 et 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Une gamme étalon était réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (0 à 1 mg.mL<sup>-1</sup>). L'intensité de la coloration était mesurée en microplaque par lecture de l'absorbance à 620 nm. Les concentrations en protéines étaient finalement exprimées par rapport à un volume d'échantillon (mg.mL<sup>-1</sup>), et étaient utilisés dans le calcul des activités spécifiques.

#### IV.4.2. Dosage du glucose et du glycogène

Le glycogène dans la glande digestive a été dosé selon le protocole de Dubois *et al.* (1965) basé sur l'extraction du glycogène par l'acide sulfurique et le phénol. Ainsi, 250 µL d'échantillon à doser ont été homogénéisés dans 750 µL d'acide trichloro-acétique (TCA 10%) pendant 2 min à 16000 rpm. Après centrifugation 5 minutes à 3000 rpm, le surnageant était récupéré pour le dosage. A 500µl de surnageant, 2,5 mL d'éthanol à 95 % était ajouté et le mélange était chauffé 3 heures à 37-40°C, afin de précipiter le glycogène, puis centrifugé 15 minutes à 3000 rpm. Le culot était ensuite dissous dans de l'eau bouillante, de l'acide sulfurique et du phénol (5%). L'absorbance des échantillons était finalement déterminée par lecture de la densité optique à 490 nm et la concentration en glycogène calculée en glucose équivalent à l'aide d'une courbe étalon de glucose (0 à 10 mg.mL<sup>-1</sup>).

Les mesures du glucose libre dans l'hémolymphe et dans la glande digestive ont été réalisées à l'aide de kits commerciaux (Biomérieux) et les concentrations ont été calculées à partir d'une gamme étalon de glucose (0 à 10 mg.mL<sup>-1</sup>).



#### IV.4.3. Dosage des activités des enzymes digestives

La glande digestive de la crevette est reconnue comme l'organe majeur en terme de digestion, d'absorption et de stockage des nutriments, et est ainsi communément utilisée comme indicateur de l'état nutritionnel (Luvizotto-Santos et al., 2003). Les activités des enzymes digestives ont été mesurées dans cet organe. Les dosages ont été réalisés sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le dosage des protéines totales (Figure 2.8).

##### **Mesure de l'activité trypsique**

Le dosage est basé sur la méthode de Erlanger *et al.* (1961) et Garcia-Carreño *et al.* (1994), modifiée afin d'adapter les dosages à nos échantillons et aux microplaques. Nous avons utilisé un substrat de l'enzyme, le L-BAPNA (N $\alpha$ -benzoyl-1-arginine-p-nitroanilide hydrochloride), en large excès par rapport à la quantité estimée d'enzyme. Une solution de CaCl<sub>2</sub> à 0,04 M était préalablement ajoutée au substrat afin de limiter les variations lors de la lecture d'absorbance. Le chlorure de calcium joue en effet un rôle important pour la protection et la stabilisation de l'enzyme lors du dosage. La trypsine, hydrolysant le BAPNA, libère la para-nitroanilide, de couleur jaune, qui est dosée par lecture à 410 nm (correspondant au maximum d'absorbance) après 15 minutes de réaction. Une unité d'activité est exprimée en micromole de p-nitroanilide produit par minute de réaction. L'activité spécifique est calculée en rapportant la valeur obtenue à la concentration en protéines de l'échantillon.

##### **Mesure de l'activité $\alpha$ amylasique.**

Le dosage de l'activité  $\alpha$  amylasique a été réalisé selon la méthode de Bernfeld (1955). Cette méthode utilise une solution d'amidon à 1 % comme substrat dans un tampon phosphate (20mM, Ph=7). La réaction repose sur l'hydrolyse de l'amidon à 37°C conduisant à la libération de maltose. La réaction utilise le 3,5-dinitrosalicylic acide comme indicateur coloré, permettant de quantifier la libération de maltose à 540 nm. Une solution étalon de maltose a été utilisée (courbe étalon de 0 à 1 mg.ml<sup>-1</sup>), et une unité d'activité est exprimée en milligramme de maltose libéré par minute. L'activité spécifique est obtenue en rapportant la valeur obtenue à la concentration en protéines de l'échantillon.

#### IV.4.4. Mesures des bio indicateurs du stress oxydant

Afin d'évaluer le niveau de stress oxydant chez un organisme, différentes stratégies sont possibles (Kooter *et al.*, 2004). Il est généralement proposé de mesurer : (i) le niveau de radicaux libres de l'oxygène (ROS), (ii) les macromolécules produites suite à l'oxydation des tissus, (iii) ou l'état des défenses anti-oxydantes comme les enzymes anti-oxydantes ou les molécules capables d'éliminer les ROS. L'association de plusieurs de ces bio-marqueurs est considérée comme une méthode optimale afin d'évaluer précisément le niveau de stress oxydant chez un organisme.

Lors de cette étude une combinaison de différents indicateurs a été utilisée :

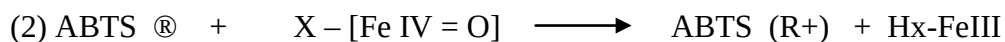
- l'activité d'enzymes anti-oxydantes majeures : Superoxyde dismutase (SOD), Catalase (CAT) et Glutathion peroxydase GPx),
- un antioxydant majeur, le Glutathion, et sa forme oxydée (GSSG), ainsi qu'un indicateur global du statut anti-oxydant (TAS)
- et les produits de l'oxydation des lipides (MDA) et des protéines (Carbonyl protéines).

Ces paramètres ont été mesurés dans la glande digestive, et certains ont été déterminés dans l'hémolymphe (TAS et SOD) (Figure 2.8). Les résultats obtenus étaient exprimés en micromoles par milligramme de protéines et/ou par milligramme d'organe ou millilitre d'hémolymphe.

##### **Détermination du statut anti-oxydant total (TAS)**

Cette mesure évalue la somme des activités individuelles de chaque antioxydant présent dans le tissu biologique. Cela comprend donc les éléments endogènes comme les enzymes et les protéines, et les éléments exogènes comme les oligo-éléments et les vitamines. La TAS a été dosée à l'aide du kit RANDOX (Ldt Crumlin, Royaume Uni).

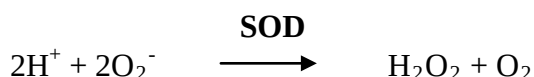
La réaction de dosage implique l'utilisation du réactif suivant : le chromogène ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenthiazoline sulphonate]) qui est incubé à 37°C, avec une peroxidase (horse radish peroxidase, Hx-FE-III) et de l'hydrogène peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour produire le radical cation ABTS (R<sup>+</sup>). Celui-ci, d'une couleur bleu-vert relativement stable, est mesuré à la longueur d'onde de 600 nm. Les antioxydants présents dans l'échantillon à doser décolorent plus ou moins la solution de réactif en limitant la réaction (2) suivante :



Les résultats sont ensuite exprimés en micromoles par gramme d'organe ou par ml d'hémolymphe.

### Détermination des activités des enzymes anti-oxydantes

**Superoxyde dismutase (SOD)** - Au cours de notre étude, nous avons dosé l'activité de la SOD totale. En effet, différentes SOD ont été décrites en fonction du métal associé à cette enzyme (essentiellement la SOD Cu-Zn, et la SOD Mn). Le dosage a été réalisé selon la méthode inspirée de Marklund et Marklund (1974), adaptée au dosage en microplaque. L'auto-oxydation du pyrogallol en présence de DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) est inhibée par la Superoxyde Dismutase. Dans une gamme de pH très fine (pH 7,90 à 7,91), la réaction est inhibée jusqu'à 90 % par la SOD, ce qui indique une totale dépendance de l'anion  $\text{O}_2^-$  dans cette auto-oxydation. Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l'anion superoxyde et la dismutation de ce dernier par la SOD selon la réaction suivante :



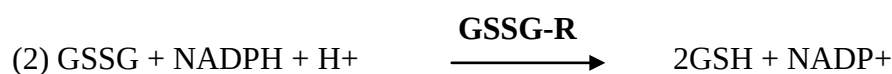
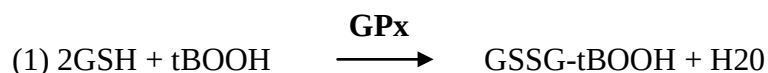
Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques de SOD (une unité correspondant à la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50 % de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage (25°C, pH 7,9). Les résultats étaient finalement rapportés à la quantité de protéines (mg) de l'échantillon ou au volume d'hémolymphe (ml).

**Catalase (CAT)** - Le dosage de l'activité de la catalase est basé sur la méthode de Clairbone *et al.* (1985). Le principe repose sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



L'activité enzymatique est déterminée en mesurant la quantité de peroxyde d'hydrogène restant après incubation avec l'enzyme. Pour déterminer la quantité de  $H_2O_2$  en question, on utilise du sulfate de fer et du thiocyanate de potassium, lesquels produisent, après réaction avec l'eau oxygénée, une coloration rouge due à un complexe de ferrithiocyanate, dont l'absorbance est lue à 492 nm. Les résultats sont exprimés en micromoles de peroxyde d'hydrogène consommé par minute à 25°C (pH 7) et rapportés à la quantité de protéines (mg) de l'échantillon.

**Glutathion peroxydase (GPx)** - Le dosage utilisé a consisté en une adaptation de la méthode de Günzler et Flohé (1985). Le principe repose sur le couplage des réactions enzymatiques suivantes, faisant intervenir la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathione reductase (GSSG-R). La glutathion peroxydase réduit un hydroperoxyde (tBOOH) tandis que le glutathion est oxydé (GSSG). Le glutathion oxydé est ensuite réduit par la glutathion peroxydase en présence de NADPH,  $H^+$  :



Le dosage est basé sur la mesure de la quantité de glutathion oxydé par le terbutyl en suivant la décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm. L'activité de la glutathion peroxydase est alors exprimée en micromoles de NADPH oxydé par minute à 25°C, et à pH 7.6.

### Détermination de la concentration en glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG)

Le dosage est basé sur la réaction du groupement thiol du glutathion (GSH) avec l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) après action de la glutathion réductase en présence de NADPH (Akerboom and Sies, 1981). Cette technique spectrophotométrique permet, d'une part, le dosage du glutathion total et, d'autre part, celui du glutathion oxydé (formation d'un pont disulfure), après blocage du glutathion réduit par la 2-vinyl-pyridine (Coutelle, 1992). L'évolution de l'absorbance à 405 nm est suivie pendant 4 minutes à 25°C. Deux gammes étalons étaient nécessaires, une pour le glutathion total, et une pour le glutathion oxydé. La quantité de glutathion réduit était finalement calculée de la façon suivante : (Glutathion total -

GSSG)= GSH. Les résultats étaient exprimés en concentration de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG). Le rapport GSSG/GSH était systématiquement calculé.

### **Détermination du niveau de peroxydation des tissus**

**Les protéines carbonylées** - Le dosage utilisé est basé sur la réaction du 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) avec les groupements carbonyles formant des 2,4- dinitrophenylhydrazones de couleur jaune (méthode de Levine *et al.*, 1994). Après centrifugation, les surnageants des échantillons sont incubés pendant 1 heure dans 10nM de DNPH préalablement dissous dans 2mM de HCl, permettant la fixation du DNPH aux groupements carbonyles (fixation mole à mole). On ajoute ensuite du TCA (tri-chloro acétate) en concentration importante (20 %) afin de précipiter toutes les protéines (y compris celles fixées au DNPH). Après centrifugation, le surnageant est éliminé, et le culot repris dans une solution de guanidine hydrochlorée, celle-ci se colorant en jaune spécifiquement avec le produit de la réaction de la DNPH avec les protéines carbonylées. La quantité de protéines carbonylées est finalement déterminée par la lecture de l'absorbance à 370 nm.

**Les MDA (dialdéhydes maloniques)** - La méthode de mesure des MDA est basée sur la méthode des TBARS (Thiobarbiturique Acid Reactive Substances) proposée par Draper et Hadley (1990). La mesure repose sur la libération en milieu acide du MDA fixé (le MDA libre étant peu ou pas mesurable). Les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA), libérées par hydrolyse à 95°C, réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner un complexe coloré en rose [MDA-TBA]. Cette mesure est réalisée par fluorimétrie à l'aide du lecteur SYNERGY HT (longueur d'onde d'excitation à 532 nm, longueur d'onde d'émission à 553 nm). Cette méthode permet le dosage de tous les aldéhydes qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique (dosage TBARS : Thiobarbiturique Acid Reactive Substances), le MDA étant le principal aldéhyde réagissant. La quantification spécifique des complexes formés est finalement réalisée par comparaison avec une gamme étalon de TEP (tetra ethoxypropane).

#### IV.4.5. Analyses microbiologiques et biologie moléculaire

##### **IV.4.5.1. Étalement sur milieu de culture et isolement des bactéries d'intérêt**

Les analyses microbiologiques ont été réalisées immédiatement après le prélèvement des organes et de l'hémolymph, soit au maximum 1 heure après la pêche des crevettes. L'hémolymph était tout d'abord prélevée à l'aide de seringues graduées de 1 ml pourvues d'aiguilles stériles, et 100 µL étaient immédiatement étalées sur boîte de Pétri. Les crevettes étaient ensuite disséquées et l'estomac, la glande digestive et le tube digestif moyen et postérieur étaient prélevés et conservés dans des tubes à hémolyse de 2ml stériles, préalablement tarés. Les échantillons étaient ensuite immédiatement broyés et homogénéisés à l'aide d'un ultrathurax dans de l'eau de mer stérile. Après homogénéisation, les échantillons étaient étalés sur milieu de culture aux différentes dilutions choisies.

Différents milieux de culture ont été utilisés afin de quantifier spécifiquement la flore totale cultivable (Marine Agar), la flore vibrionacée (TCBS agar), les souches bactériennes appartenant à l'espèce *V. nigripulchritudo* (Marine Agar + 2% de glycérol (MAG)), et la flore lactique (MRS agar). Pour chaque échantillon, excepté l'hémolymph, les étalements ont été réalisés systématiquement en triplicat et à différentes dilutions afin d'obtenir 10 à 300 bactéries par boîte. Les boîtes Marine Agar et TCBS ont été incubées à 29°C pendant 24 et 48 heures avant lecture, alors que les boîtes MRS étaient incubées 48 h à 45°C. Quant aux boîtes MAG, elles étaient incubées à 29°C et la lecture était effectuée après 72 et 96 heures.

Pour la quantification des bactéries appartenant à l'espèce *V. nigripulchritudo* dans l'hémolymph (noircissement des colonies sur MAG après 72 à 96 heures de culture, Baumann & Schubert, 1984), la prévalence et la charge individuelle ont été déterminées respectivement comme le nombre de crevettes présentant au moins une colonie attribuables à *V. nigripulchritudo*, et le nombre de ces mêmes colonies détectées par crevette. En ce qui concerne la microflore intestinale, après comptage, la concentration bactérienne a été systématiquement déterminée en CFU par gramme d'organe en tenant compte des dilutions réalisées.

Dans certains cas, un isolement des bactéries dominantes a été réalisé sur milieu Marine Agar afin d'obtenir des cultures pures. Pour cela, trois colonies du même morphotype étaient systématiquement repiquées sur boîte et isolées.

#### **IV.4.5.2. Extraction d'ADN**

Les ADN génomiques des souches isolées sur Marine Agar ont ensuite été extraits selon un protocole classique d'extraction au phénol chloroforme alcool isoamylique après digestion à la protéinase K. Les extraits d'ADN ont alors été repris dans du tampon Tris-EDTA (TE, 1X). Des extractions de l'ADN bactérien total ont également été réalisées directement à partir des contenus digestifs à l'aide du kit d'extraction QIamp® DNA Stool mini kit (QIAGEN).

Le tractus intestinal des animaux a été prélevé et vidé mécaniquement à l'aide de pinces stériles. Cette opération a été réalisée sur plusieurs animaux afin de récupérer environ 100 mg de contenu digestif (bol alimentaire + mucus intestinal) pour chaque échantillon. Le matériel biologique ainsi récupéré dans des eppendorfs de 2 ml était ensuite homogénéisé dans 1ml de tampon de lyse ASL (kit QIAGEN) et conservé à -20°C quelques jours avant de réaliser l'extraction d'ADN. Ainsi, après décongélation, 500 µl de tampon de lyse ASL étaient rajoutés dans chaque tube puis les échantillons étaient homogénéisés (1 min au vortex) et chauffés à une température de 95°C, afin de favoriser la lyse des bactéries à GRAM+. La suite du protocole était conforme à celui proposé dans le kit QIAGEN pour l'extraction d'ADN bactériens à partir de fécès. L'ADN était finalement élué dans du tampon AE (QIAGEN), et conservé à -20°C.

Après chaque extraction, une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) était systématiquement réalisée afin de vérifier la qualité de l'ADN. Les produits d'extraction étaient ainsi chargés dans les puits du gel après addition de 10 % (v/v) de bleu de charge. La révélation de l'ADN était assurée par l'incorporation de bromure d'éthidium (BET) dans le gel au moment de son coulage dans la plaque à électrophorèse. L'ADN était ensuite révélé après la migration par exposition aux UV.

#### **IV.4.5.3. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe**

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe est une technique de biologie moléculaire plus connue sous le terme de RAPD (d'après l'anglais : Random Amplification of Polymorphic DNA). Cette technique repose sur une PCR utilisant un seul primer constitué d'une courte séquence choisie arbitrairement. Lorsqu'on utilise une seule amorce de petite taille (8 à 12 bases), dont la séquence est choisie au hasard tout en respectant certaines règles quant à sa composition (contenu en GC), on peut constater, après PCR, l'amplification de plusieurs fragments à partir d'un ADN génomique. Ainsi, l'amplification de l'ADN génomique de deux génotypes différents, avec une même amorce, peut révéler des variations se traduisant par la présence ou l'absence d'un fragment donné selon le génotype. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ.

Au cours de nos travaux, des RAPD ont été effectuées sur les souches bactériennes pures isolées sur boîte de Pétri, à l'aide de billes Ready-To-Go RAPD analysis beads (Amersham 27-9500-01) et de l'amorce RAPD 3 : 5'-d[GTAGACCCGT]-3' fournie dans le kit. Chaque bille contenait une Taq polymérase thermostable (AmpliTaq™ DNA polymerase and Stoffel fragment), des dNTPs (0.4 mM de chaque dNTP), du BSA (2.5 µg) et un tampon spécifique [3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl and 10 mM Tris, (pH 8.3)]. Chaque bille était diluée dans un volume final de 25 µl (eau PPI+ amorces). Le programme de PCR utilisé était le suivant : 5 min à 94°C pour la dénaturation initiale, suivi de 45 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à la température d'hybridation de 36°C, et 2 min d'élongation à 72°C. La migration des produits de PCR était ensuite réalisée par électrophorèse dans un gel d'agarose (2%) et révélée aux UV après ajout de BET.

#### **IV.4.5.4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

##### **Principe**

Afin de caractériser la flore bactérienne de mélanges microbiens complexes, une des techniques possibles est de combiner l'amplification de séquences spécifiques et uniques pour une espèce donnée et leur séparation par électrophorèse. Pour cela, deux méthodes moléculaires basent la discrimination des espèces uniquement sur des différences de séquences nucléotidiques. Il s'agit de la PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel



Electrophoresis) (Riesner *et al.*, 1992) et de la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al.*, 1993). Ces méthodes reposent sur le fait que la stabilité d'un fragment d'ADN dépend de sa séquence nucléotidique. Selon la nature et l'enchaînement des bases azotées, le double brin d'ADN est plus ou moins stable. Il est donc possible de distinguer des fragments de tailles identiques, mais de séquences différentes, en jouant sur leur résistance à des contraintes dénaturantes comme l'augmentation de la température (méthode TGGE) ou de la concentration en agents dénaturants (méthode DGGE).

Le principe de la PCR-DGGE est de cibler des régions de taille identique mais de séquences nucléotidiques différentes encadrées par de courtes séquences consensus qui servent d'amorces pour l'amplification. Lors de l'électrophorèse, la migration s'arrête lorsque les doubles brins d'ADN se dénaturent par la contrainte physico-chimique engendrée par le gradient urée-formamide présent dans le gel d'acrylamide. Le comportement vis-à-vis de cette contrainte est directement corrélé aux interactions stabilisatrices de la double hélice qui s'établissent selon la nature et l'enchaînement des bases azotées. Une solution dénaturante de 100 % est définie par un mélange de 40 % (v/v) de formamide et d'urée 7M. Pratiquement, deux solutions, l'une fortement et l'autre faiblement dénaturante, sont préparées séparément. Puis au moment de couler le gel, la solution la moins dénaturante est mélangée, par pompage, à la solution la plus dénaturante, de façon à créer un gradient dénaturant linéaire. L'ajout d'une répétition de bases guanine et cytosine (*GC clamp*) sur l'extrémité 5' de l'une des amorces permet d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et donc leur élution du gel (Myers *et al.*, 1985). En fait, la dénaturation des doubles brins d'ADN lors de la migration dans le gel d'acrylamide ne s'effectue pas en une seule étape mais par fusions successives de petites régions, appelées domaines de fusion (Figure 2.9). Les régions les moins stables se dénaturent le plus rapidement. Elles ouvrent localement le double brin d'ADN ce qui fragilise les régions environnantes et modifie la conformation de la molécule. Des séquences différentes de fragments d'ADN qui ont des domaines de fusion avec des  $T_m$  « locaux » différents, mais un  $T_m$  « global » identique, ont des distances de migration différentes. L'alternance de domaines de fusion stables et de domaines de fusion plus flexibles est une propriété déterminante des séquences ciblées en DGGE (Shopek *et al.*, 1999).

Outre la dénaturation imposée par le gradient de formamide et d'urée, la contrainte de migration est également très importante. Elle est représentée par le couple voltage appliqué / durée de migration; la température du bain de migration étant également un paramètre important. Après avoir coulé le gel, il est nécessaire de l'incuber au préalable dans le tampon

de migration à la température de migration. Cette étape d'incubation à haute température joue un rôle prépondérant dans le pouvoir séparatif du gel. Bien que les raisons de ce phénomène ne soient pas encore déterminées, il semblerait que des diffusions internes du gradient dénaturant interviennent dans le gel à la suite de sa polymérisation (Sigler *et al.* 2004).

A la fin de la migration, la révélation d'un gel d'acrylamide de DGGE se fait sous UV après marquage de l'ADN au bromure d'éthidium (BET) au SYBER Green ou SYBER Gold. Ces deux derniers donnent moins de bruits de fond que le BET, et les quantités d'agents intercalants à utiliser, fortement carcinogènes, sont moins importantes.

Enfin pour permettre de résoudre les complexes microbiens, la PCR-DGGE doit cibler des fragments à séquence monocopie: sur le gel d'acrylamide à une espèce doit correspondre une bande et une seule. Concernant l'étude des bactéries, les régions du chromosome couramment ciblées sont les régions V1 (Cocolin *et al.*, 2004), V3 (Masco *et al.*, 2005), V6 et V8 (Lopez *et al.*, 2003) du gène de l'ARNr 16S. Mais ce gène est présent en plusieurs copies qui ne sont pas forcément identiques au sein d'une même espèce (Nüble *et al.*, 1996).

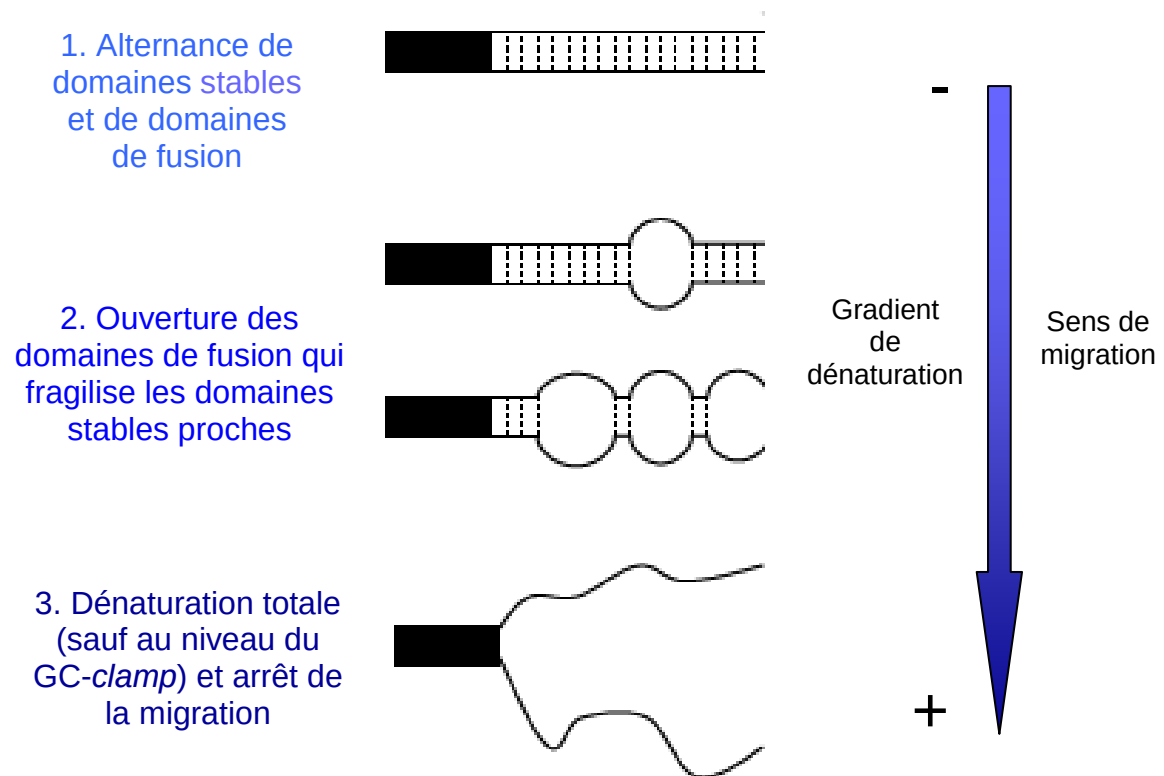


**Figure 2.9** : Principe simplifié de la DGGE.

Cette hétérogénéité intra-spécifique est principalement rencontrée au niveau des régions variables V1 et V6 qui étaient susceptibles d'être ciblées pour l'analyse par PCR-DGGE (Coenye & Vandamme, 2003). Un autre inconvénient avec les domaines V3, V6 et V8 est l'amplification d'ADN de levures (*Saccharomyces* sp. et *Candida* sp.), de moisissures (*Botrytis cinerea*, *Fusarium laterium*) (Lopez *et al.*, 2003) et de cellules eucaryotes de plantes (Dent *et al.*, 2004).

### PCR-DGGE

Dans notre étude, les PCR-DGGE ont été réalisées à partir des extractions d'ADN de la flore totale. Un fragment de 566 paires de bases, correspondant à une partie de la région V3 du gène de l'ARNr 16S, a été amplifié à l'aide des amorces 341f (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') et 907r (5'-CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT-3'). Le mélange réactionnel de PCR était composé de tampon de PCR 1x, de MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, de dNTPs à 0,2 mM, d'amorces sens et anti-sens à 1 µM, de 2 unités de Taq DNA polymerase, de 2 unités de Stoffel fragment et de 20 à 100 ng d'ADN génomique pour un volume réactionnel total de 50 µL. Pour les bactéries pures utilisées comme marqueurs, 5 ng d'ADN était ajoutés au mix de PCR. La dilution de ce mélange s'effectuait dans de l'eau PPI stérile (Préparation pour injection). Les cycles de PCR ont été réalisés avec un thermocycleur Master cycler (eppendorf). Le programme a consisté en 5 min à 94°C pour la dénaturation initiale, suivie de 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à la température d'hybridation de 54°C, 2 min d'élongation à 72°C, et une étape finale d'élongation de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont ensuite été visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dans du tampon TAE (Tris 0.4 M, Acetate 0.2 M, EDTA 10 mM) contenant du bromure d'ethidium (BET) à 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> et quantifiés à l'aide d'un marqueur moléculaire de 100 pb. Les DGGE ont ensuite été réalisées à l'aide du Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Figure 2.10).

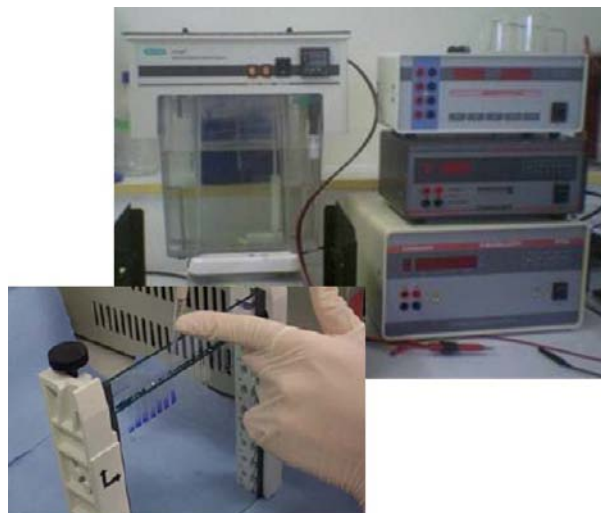


**Figure 2.10 :** Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) utilisé au cours de ce travail. La photo du bas montre le chargement des produits d'amplification dans le gel d'acrylamide.

L'électrophorèse a été réalisée à partir d'un gel à 8 % (w/v) de polyacrylamide (37.5:1 acrylamide-bisacrylamide; dimensions: 200 par 200 par 1 mm) avec un gradient d'urée-formamide de 40–80%. La solution 100% contenait une concentration de 7M d'urée et 40% (v/v) de formamide. Chaque puit du gel d'acrylamide a été chargé avec environ 80 ng d'ADN, préalablement additionné de tampon de charge constitué de glycérol, de TE et de bleu de bromophénol. Les conditions de migration étaient les suivantes : 10 minutes à 20V, puis 16 heures à 80 V dans un bain de TAE 0.5X (20 mM Tris acetate [pH 7.4], 10 mM sodium acetate, 0.5 mM Na<sub>2</sub>- EDTA) à une température de 60°C. A la fin de la migration, la révélation du gel d'acrylamide a été réalisée après marquage de l'ADN dans un bain de *SYBER Gold* (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) pendant 30 minutes. La visualisation du gel a été effectuée à l'aide d'un fluorimager (typhoon 9400, amersham) et les images ont été analysées avec le logiciel image quant 5.2.

### **Récupération des bandes d'ADN après l'électrophorèse.**

Les fragments d'ADN d'intérêt ont été extraits du gel d'acrylamide en découpant délicatement le gel sous UV au niveau du front de migration à l'aide d'une lamelle. Puis le bloc d'acrylamide contenant l'ADN a été placé dans 200 µL d'eau PPI et stocké à 4°C pendant une nuit pour permettre la diffusion de l'ADN dans l'eau. Les solutions d'ADN ainsi récupérées étaient utilisées comme matrice (2 µL) pour une nouvelle PCR identique à la PCR

initiale (PCR-DGGE). Puis une nouvelle DGGE était réalisée afin de s'assurer que la bande excisée correspondait bien à la bande d'intérêt. Une nouvelle excision était ensuite réalisée de la même manière et une dernière PCR était réalisée cette fois avec des amorces ne possédant pas de GC-clamp. Après confirmation de la ré-amplification, les produits de PCR pouvait être clonés puis séquencés.

### **Clonage et séquençage**

Les produits d'amplification ont été clonés à l'aide du kit de clonage TOPO TA 10F' (Invitrogen). Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont ensuite été réalisées à l'aide du EZNA Plamid mini Kit II (OMEGD6945-02, OMEGA VWR) sur les clones positifs avant de les envoyer à séquencer auprès de l'entreprise GENOM EXPRESS.

### **Analyse phylogénétique**

Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences disponibles sous GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les séquences obtenues ainsi que les séquences les plus proches déterminées par BLAST ont ensuite été alignées à l'aide du logiciel bioedit®. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel MEGA 4 avec la méthode des plus proches voisins (neighbour joining method). La fiabilité de la topologie a été évaluée par la méthode des bootstraps en réalisant 500 replicats.

**TROISIÈME PARTIE :**

**LES ÉTUDES RÉALISÉES**



## **TROISIÈME PARTIE :**

### **LES ÉTUDES RÉALISÉES**

---

#### **Premier chapitre : Détermination de la dose et des modalités d'administration du probiotique 165**

---

##### **INTRODUCTION..... 166**

##### **I Mesure de la stabilité de *P. acidilactici* dans l'aliment..... 167**

###### **I.1. Matériels et Méthodes ..... 167**

I.1.1. Stabilité du probiotique au cours du stockage..... 167

I.1.2. Stabilité du probiotique après immersion dans l'eau de mer ..... 167

###### **I.2. Résultats et discussion ..... 167**

##### **II Article 1 : Evaluation of the dietary probiotic *P. acidilactici* at two levels on shrimp *L. stylirostris* survival following a temperature drop at the low end of its thermopreferendum ..... 172**

##### **III Devenir de *P. acidilactici* MA18/5M dans le tractus intestinal de la crevette et influence sur la composition de la flore intestinale ..... 195**

###### **III.1 Matériels et Méthodes ..... 195**

III.1.1. Première série expérimentale ..... 195

III.1.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P. acidilactici* sur la flore intestinale..... 198

###### **III.2. Résultats et discussion ..... 199**

III.2.1. Première série expérimentale ..... 199

III.2.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P.acidilactici* sur la flore intestinale..... 208

##### **CONCLUSION..... 214**

---

#### **Deuxième chapitre : Effet du probiotique *P. acidilactici* sur la croissance et la nutrition de la crevette *L. stylirostris* ..... 216**

---

##### **INTRODUCTION..... 217**

**Article 2 : Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* by using individual measurements and nested design..... 218**

**Article 3 : Effects of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth and nutritional status in shrimp *Litopenaeus stylirostris* based on a growth-ration size approach..... 242**

##### **CONCLUSION..... 272**





---

**Troisième chapitre : Effet du probiotique *P. acidilactici* sur le statut antioxydant de *Litopenaeus stylirostris* et sur le stress oxydant induit par une infection bactérienne..... 278**

---

INTRODUCTION..... 279

Article 4 : Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status in *Litopenaeus stylirostris* shrimp ..... 280

Article 5 : Effect of probiotic *P. acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge ..... 289

CONCLUSION..... 316

---

**Quatrième chapitre : Application des résultats expérimentaux à l'échelle pilote : évaluation des effets de *P. acidilactici* sur une ferme commerciale au cours d'un épisode de vibriose ..... 320**

---

INTRODUCTION..... 321

Article 6 : Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions ..... 322

Article 7 : Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia..... 330

CONCLUSION..... 343



---

**Premier chapitre :**

**Détermination de la dose et des modalités  
d'administration du probiotique**

---



## INTRODUCTION

Comme nous l'avons rappelé dans la deuxième partie, ce travail de thèse s'est organisé autour de trois séries d'expérimentations. Ainsi, avant de pouvoir évaluer le probiotique *P. acidilactici* chez *Litopenaeus stylirostris*, il a fallu réaliser plusieurs expérimentations préalables afin de déterminer la dose d'utilisation et les modalités d'administration du probiotique.

Différentes études ont donc été conduites en vue :

- de s'assurer de la stabilité du probiotique dans l'aliment au cours du stockage et après sa distribution dans l'eau de mer afin de garantir sa disponibilité pour l'animal à la concentration désirée,
- de déterminer, sur des critères zootechniques, une dose convenable d'administration du probiotique pour son évaluation au cours de la phase expérimentale ultérieure,
- de vérifier la présence de *P. acidilactici* à différents niveaux du tractus intestinal de l'animal, d'y mesurer son temps de résidence, et évaluer une solution pour augmenter celui-ci,
- enfin de déterminer l'influence du probiotique sur la microflore intestinale.

Ce chapitre présente les principaux résultats ayant conduit à établir un protocole d'administration du probiotique, protocole que nous avons par la suite repris systématiquement pour nos expérimentations au laboratoire.



## **I Mesure de la stabilité de *P. acidilactici* dans l'aliment**

### **I.1. Matériels et Méthodes**

#### **I.1.1. Stabilité du probiotique au cours du stockage.**

La viabilité de la souche probiotique dans l'aliment expérimental au cours de son stockage a été évaluée. Pour ce faire, trois lots d'aliments ont été préparés: pour chacun de ces trois lots, trois échantillons de 1kg ont été prélevés et finalement chaque échantillon a été enrobé avec du Bactocell provenant de 3 stocks différents. Les neuf lots d'aliment ainsi obtenus ont alors été stockés dans des seaux propres pendant 90 jours à température ambiante (température du laboratoire humide non climatisé), cela afin de se rapprocher des conditions de stockage de l'aliment au cours des futures expérimentations. Trois échantillons de 10 g d'aliment ont ensuite été prélevés dans chaque lot afin de déterminer la concentration en *P. acidilactici* après différents temps : 1, 2, 3, 15, 30, 60 et 90 jours.

#### **I.1.2. Stabilité du probiotique après immersion dans l'eau de mer**

Afin de quantifier le lessivage et la viabilité du probiotique une fois l'aliment dans l'eau, nous avons réalisé un suivi de sa concentration sur 48 heures après immersion. L'expérience a été réalisée dans trois bacs de 500 L de la zone expérimentale. La température a été suivie en continu à l'aide d'une sonde de température (Optic StowAway® Temp; Onset). Au temps T0, 500 g de granulés ont été ajoutés dans chacun des bacs. Ensuite, 3 échantillons de 10 g d'aliment par bac ont été récupérés à différents temps (1/4 ; 1/2, 1, 2, 4 et 48 heures) et leur concentration en *P. acidilactici* déterminée. Les concentrations moyennes en probiotique dans l'aliment aux différents temps ont été comparées à l'aide du test de Kruskal & Wallis suivi du test de Student–Newman–Keuls.

### **I.2. Résultats et discussion**

Chez les crevettes juvéniles ou sub-adultes, l'administration d'un probiotique par voie alimentaire peut être réalisée de façon directe par incorporation du probiotique dans l'aliment ou de façon indirecte par administration dans l'eau. Au vu des caractéristiques de la souche



*P. acidilactici* MA18/5M rappelée précédemment, il a été choisi d'administrer le probiotique aux crevettes *via* l'aliment.

Comme nous l'avons rappelé dans la première partie de ce travail, l'additif Bactocell PA 10, utilisé au cours de notre étude, est garanti pour une concentration à  $10^{10}$  CFU.g<sup>-1</sup> de *P. acidilactici*. Il est préconisé par le fabricant d'incorporer ce probiotique en enrobant l'aliment par pulvérisation post-granulation d'une suspension probiotique + huile ou probiotique + eau sur l'aliment granulé. Des essais d'enrobage industriel à l'aide d'équipements adaptés ont été réalisés par la société Lallemand, conjointement avec la société BIOMAR, et ont montré que ce protocole d'enrobage permettait de garantir une incorporation homogène et une quantité conforme de probiotique dans un aliment truite Bio-Optimal Start feed (commercialisé par Biomar S.A, Nersac, France). Aubin *et al.* (2005a) ont ainsi utilisé ce protocole d'enrobage dans leur étude sur l'évaluation des probiotiques *P. acidilactici* et *S. cerevisiae* chez la truite arc-en-ciel. De plus, des mesures de stabilité de la concentration en *P. acidilacti* MA18/5M dans ces aliments ont aussi été réalisées et ont montré que la viabilité de la souche demeurerait constante au cours du stockage et ce, sur une période d'au moins quatre mois à température ambiante (température de laboratoire) (Figure 3.1).

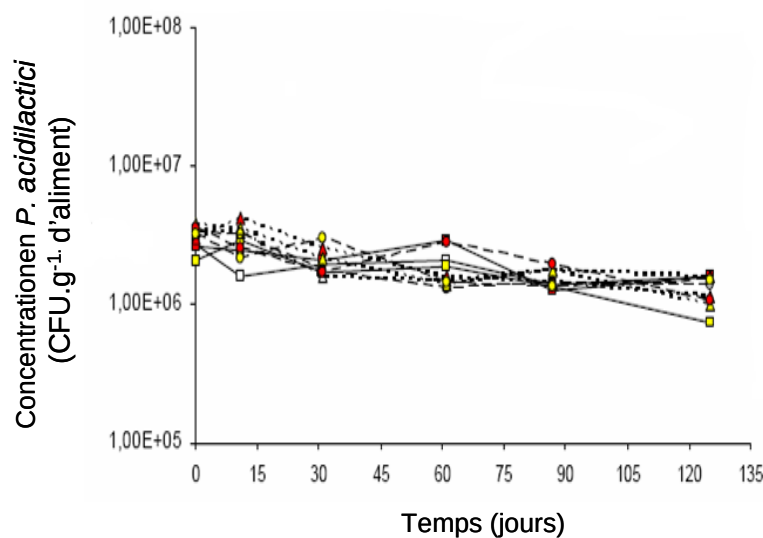


**Figure 3.1.** Stabilité de la concentration en *P. acidilactici* MA 18/5M dans l'aliment Bio-Optimal Start feed (Biomar S.A, Nersac, France) au cours de plusieurs mois de stockage à température ambiante (Source : Lallemand).

Au cours d'une étude précédente (Castex, 2005), nous avons vérifié qu'un enrobage avec 2 à 3 % d'huile de poisson, réalisé à l'aide d'un simple mélangeur horizontal (Mainca®), permettait d'obtenir un étalement homogène et conforme en terme de quantité de probiotique. Dans le cadre de ce travail de thèse, c'est cette méthode d'enrobage qui a été utilisée, et l'aliment préparé a été systématiquement mis en numération afin d'établir sa concentration en probiotique avant son utilisation. Nous avons ainsi pu vérifier la qualité de l'enrobage obtenu par cette technique sur un nombre de 46 échantillons (Figure 3.2.) prélevés entre 2006 et 2008.

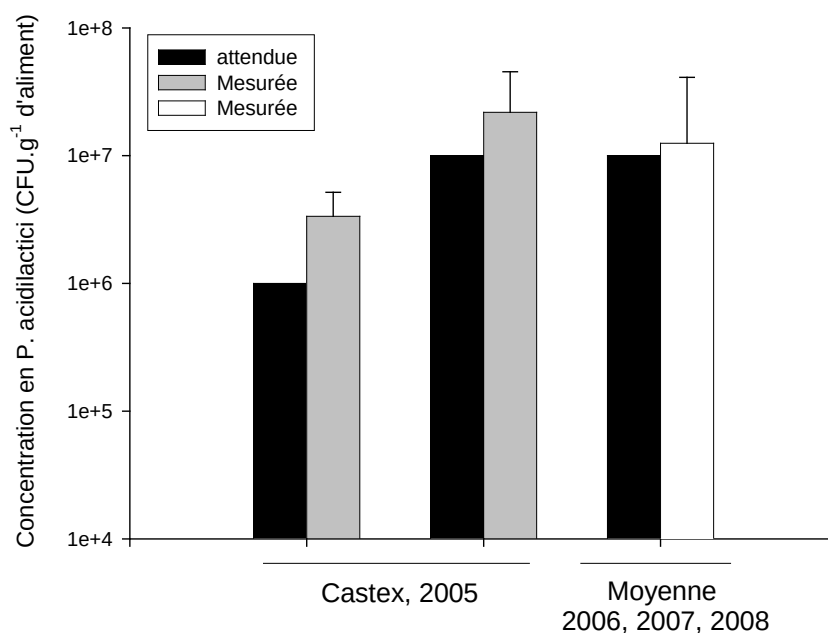


**Figure 3.2.** Confirmation de la conformité et de l'homogénéité d'enrobage du granulé par la numération de 46 échantillons d'aliments prélevés entre 2006 et 2008. Chaque barre d'erreur indique l'écart type.

Dans un second temps, nous avons réalisé un suivi de la viabilité de la souche probiotique au cours du stockage de l'aliment à température ambiante ( $T^{\circ}\text{moyenne} = 23.2^{\circ}\text{C} \pm 2.2$ ). Dans ces conditions, les résultats montrent que la concentration en probiotique diminue avec le temps de stockage, et que, si l'on admet une limite de validité maximale de 0,5 log, l'aliment n'est plus conforme après 1 mois (Figure 3.3.). Ce résultat confirme les observations initiales réalisées en 2005 montrant une diminution de la concentration du probiotique après stockage de l'aliment 15 jours à 25°C (Castex, 2005). Dans ces conditions, pour la réalisations de nos travaux, nous avons limité à 15 jours la durée d'utilisation de l'aliment expérimental fraîchement enrobé.

Au-delà de ces considérations, ce résultat montre aussi que la stabilité de la concentration en probiotique est moins bonne avec notre aliment expérimental qu'avec l'aliment industriel. Cela est vraisemblablement lié à des différences de conditions de stockage (niveaux et variations de température, taux d'humidité...) mais aussi à des différences de texture du granulé et/ou de méthode d'enrobage. Nous avons ainsi observé qu'après plusieurs semaines de stockage, l'aliment expérimental avait tendance à produire des fines, ce qui pourrait expliquer les baisses mesurées de teneur en probiotique. Quoiqu'il en soit, il serait important de définir la durée maximum de stockage de l'aliment enrobé avec Bactocell<sup>®</sup> dans les conditions de température et d'humidité des usines et des fermes.

Finalement, il nous a paru important de quantifier le lessivage et la viabilité du probiotique une fois l'aliment dans l'eau. Cette information est importante car la crevette se nourrit lentement et il fallait donc s'assurer que l'animal ingère effectivement le probiotique à la concentration désirée. De plus, *P. acidilactici* étant une bactérie GRAM +, sa résistance en milieu marin devait être vérifiée. Notre étude a montré que la concentration en probiotique diminuait d'environ 0,5 log après 48 heures d'immersion dans une eau de mer à 25,0±1,5 °C (Figure 3.4). Cependant, quatre heures après distribution, sa concentration n'était pas modifiée de façon significative ( $P>0.05$ ). Cette première observation amène deux conclusions : la première est que *P. acidilactici* tolère, pour plusieurs heures, une immersion dans l'eau de mer mais ne s'y développe pas, la seconde est que la crevette, qui a besoin de moins d'une heure pour manger un repas complet (Wabete, 2005), aura suffisamment de temps pour effectivement ingérer le probiotique apporté par l'aliment

Enfin, le fait que la souche *P. acidilactici* MA18/5M ne tolère pas, sur le long terme, l'eau de mer, suggère qu'elle ne se maintiendra pas dans le bassin d'élevage et l'environnement marin.

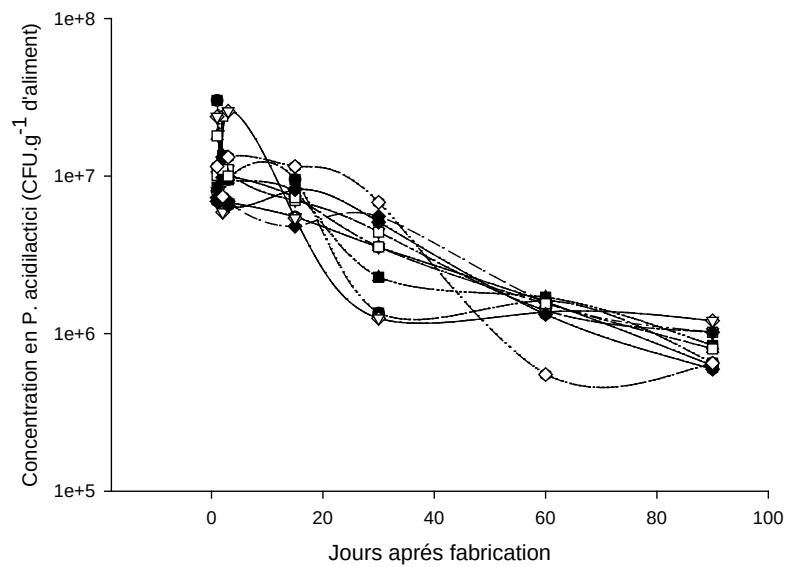


**Figure 3.3.** Concentration en *P. acidilactici* MA18/5M dans les 3 lots d'aliment expérimental stockés pendant 90 jours à température ambiante ( $T^{\circ}\text{moyenne} = 23.2^{\circ}\text{C} \pm 2.2$ ). Chaque point représente la mesure moyenne d'un échantillon mesurée à partir de 3 répliques.

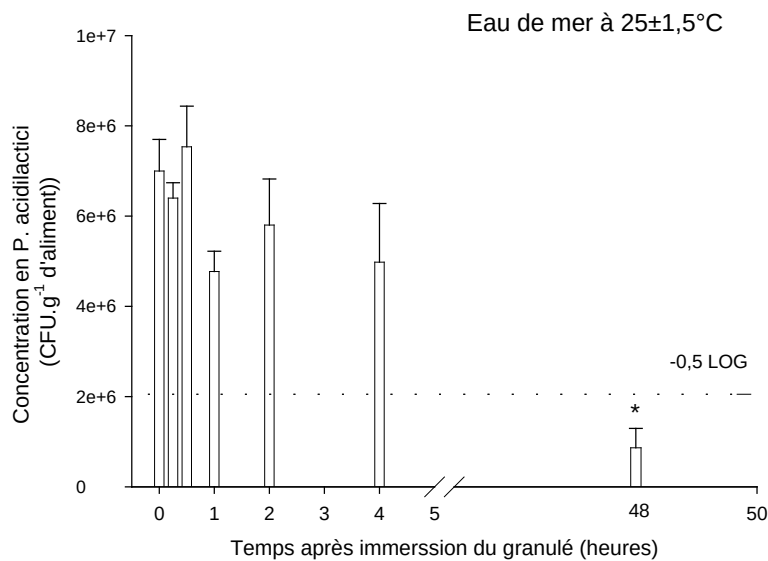


**Figure 3.4.** Concentration en *P. acidilactici* MA18/5M dans l'aliment après distribution dans des bacs alimentés en eau de mer. Chaque barre d'erreur indique l'écart type de la moyenne de 3 échantillons. \* indique une différence statistiquement significative (test de Student–Newman–Keuls).

## **II Article 1: Evaluation of the dietary probiotic *P. acidilactici* at two levels on shrimp *L. stylirostris* survival following a temperature drop at the low end of its thermopreferendum**

Les résultats précédents ont donc permis de valider la méthode d'incorporation du probiotique au niveau expérimental et de s'assurer de sa disponibilité aux crevettes, à la quantité désirée. Suite à cette première évaluation nous avons entrepris deux expérimentations afin de nous assurer de la présence et de la survie de *P. acidilactici* dans le tractus intestinal des animaux après ingestion de l'aliment. Nous avons parallèlement évalué les effets du probiotique administré à deux doses d'inclusion et deux fois par jour sur quelques paramètres zootechniques des crevettes élevées en conditions expérimentales. Le principal objectif de cette étude était de déterminer une dose d'inclusion suffisante du probiotique pour agir sur l'animal, tout en restant dans une enveloppe de coûts raisonnable pour les futurs utilisateurs. En outre, cette étude nous a permis de réaliser une première évaluation des effets du probiotique sur la microflore intestinale des crevettes.

Afin de mettre en évidence un effet éventuel du probiotique sur la survie des crevettes en conditions stressantes, nous avons utilisé le « syndrome 93 induit ». Comme nous l'avons rappelé dans la première partie de ce travail, en Nouvelle-Calédonie, la crevette *L. stylirostris* est affectée par des mortalités hivernales causées par une vibriose saisonnière impliquant *Vibrio penaeicida*. Or, il a été remarqué en saison froide qu'un simple stress de température (chute brutale) ou de manipulation à l'occasion d'un transfert des animaux au laboratoire ou à l'écloserie conduisait à des mortalités attribuables au syndrome 93 (Wabete *et al.*, 2006). Ainsi, nous avons standardisé, à des fins expérimentales, un protocole basé sur une chute de température ou un transfert des animaux en période froide permettant d'induire ses mortalités. Ce protocole a été baptisé « Syndrome 93 induit » (Chim *et al.*, 2008). Dans notre travail, ce protocole a été utilisé à deux reprises afin d'évaluer l'effet de *P. acidilactici* sur la résistance de la crevette au « Syndrome 93 induit ». L'article suivant présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces expérimentations.

**Evaluation of the dietary probiotic *P. acidilactici* at two levels on shrimp *L. stylirostris* survival following a temperature drop at the low end of its thermopreferendum<sup>1</sup>**

Mathieu Castex<sup>a\*</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>, and Liet Chim<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98.46 Nouméa cedex, New Caledonia.

Key words : shrimp, *Litopenaeus stylirostris*, dietary probiotic, *Peddiococcus acidilactici*, temperature, vibriosis.

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 84 ; fax : +687 35 11 77  
E-mail address: [Mathieu.Castex@ifremer.fr](mailto:Mathieu.Castex@ifremer.fr)

---

<sup>1</sup> Soumis dans « The Open Fish Science Journal »

## Abstract

In this study, two levels of the dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* – a low dose (LD) of  $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> and a high dose (HD) of  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed – were evaluated in regard to the survival and growth of shrimp *L. stylirostris*. For this purpose, shrimps were experimentally challenged by “Induced Winter Syndrome” (IWS) in two trials. IWS is characterized by high mortalities of *L. stylirostris* in tanks 48 hours following a standardised stress (fishing, handling, temperature drop) occurring during winter when water temperatures fluctuate around the lower limit of the thermopreferendum of this species ( $\pm 22^\circ\text{C}$ ). In the HD treatment, the probiotic greatly improved the survival of shrimps subjected to IWS compared to the control in both trials. Meanwhile, the HD treatment significantly increased average daily weight gain and food conversion ratio compared to the control. No significant dose effect was recorded; however, the LD treatment gave systematically intermediary results between the control and the HD dose for all the parameters considered. Finally, bacterial enumeration in the gut of the shrimps indicated that the probiotic is retrieved at concentrations ranging from  $10^4$  to  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> of gut with a higher concentration in the shrimps receiving the HD treatment ( $P > 0.05$ ). After 16 days and 32 days of rearing in tanks, shrimps from the probiotic groups exhibited significantly lower marine agar and TCBS counts in the gut compared to the control group, whatever the dose. From these results and others previously obtained, several hypotheses to explain the probiotic effects were formulated and discussed.

Our results showed the benefits of using *P. acidilactici* to reduce the susceptibility of *L. stylirostris* to temperature fluctuation at the low end of its thermopreferendum and more specifically to increase their resistance to New Caledonian winter syndrome. A dose of  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed is recommended to increase shrimp survival and growth in New Caledonian farms during the winter season.

## Introduction

The shrimp *Litopenaeus stylirostris* is a tropical species originating from the Pacific coast of Central and South America where temperatures can reach a maximum of 30°C in summer and a minimum of 20°C during the winter season [1]. In New Caledonia, *L. stylirostris* is farmed in ponds and is exposed to large circannual temperature changes. According to Wabete *et al.* [2], even if under steady state conditions an animal is observed to be healthy at the limit of its thermopreferendum, its efficiency may decrease considerably when facing dynamic imbalance such as environmental perturbations or physiological changes that frequently occur in pond conditions. These authors studied the physiological changes occurring at the low end of the thermopreferendum (22°C) in stressed (induced by fishing and handling) penaeid shrimps *L. stylirostris*. They showed that under these conditions shrimps exhibit an osmoregulatory disturbance associated with an impairment of the haemolymph O<sub>2</sub>-transport system, which can lead to death through respiratory failure. Then they proposed a novel means by which a cold-induced oxygen limitation can restrict whole animal tolerance to its thermal extremes in a tropical species.

During the winter season, New Caledonian shrimp farming faces a disease of bacterial origin. This disease, known as “Syndrome 93” or “Winter syndrome” [3], has been described as a seasonal juvenile vibriosis caused by *Vibrio penaeicida* which affects *L. stylirostris* in grow-out ponds and broodstock tanks [4]. Harvest and transfer of broodstock from earthen ponds to maturation tanks, or of juvenile shrimps to experimental tanks, when temperature fluctuations around 22°C occurred, led to significant mortalities 48 hours following the transfer. Those mortalities can also be exacerbated or induced by a sharp drop in temperature at the low end of the species thermopreferendum [5]. This phenomenon is called “Induced Winter Syndrome” (IWS), and a protocol has been standardized in order to use it for experimental purposes. Studies from our laboratory using the IWS protocol revealed that IWS mortalities can be reduced either (1) by limiting the physiological disturbances of the animals [6] or (2) by treating the shrimps with antibiotics (Goarant *et al.*, unpublished results). Recently, conclusions from DeSanS (Stylirostris Health Challenge), a research programme based on a multidisciplinary approach with the aim of gaining an overall explanation of seasonal vibriosis, defined winter syndrome as a multifactorial disease caused by physiological disorders due to temperature fluctuations at the low end of the species thermopreferendum and by (i) external factors such as infection by pathogenic bacterial strains (mainly belonging



to *V.penaecida* species) and (ii) internal aggravating factors (moulting stage, oxidative stress, nutritional deficiencies) [5]. Moreover, during the winter season, weak shrimp growth and high feed conversion ratio in pond are generally observed due to a drop in the feed consumption of penaeid shrimps at low temperatures.

In recent years, the biological control of diseases by environmental friendly methods such as probiotics has become major area of investigation in aquaculture research. Several reviews [7, 8, 9, 10, 11] have detailed the various developments made in the use of probiotics in aquatic cultured species, including shrimp. Because lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly applied probiotics in terrestrial animal nutrition, their use as probiotics has been proposed for aquatic species [12]. LABs potentially have several probiotic properties: they may stimulate the growth of preferred micro-organisms, outcompete harmful bacteria, and reinforce the organism's natural defence mechanisms [13, 14]. The available information on the probiotic *P. acidilactici* MA 18/5M (Bactocell®) provides convincing safety back-up (“Generally Recognized as Safe” (GRAS) and “Qualified Presumption of Safety” (QPS) status) and evidence of its effectiveness since its use has been authorized by the European committee for several terrestrial species (E1712 for broiler chickens and E1712 for fattening pigs). In addition, a first evaluation of its effects showed promising results as regards growth and survival of shrimps *L. stylirostris* following “induced winter syndrome” [15].

The present studies, carried out in 2005 and 2006, were conducted in order (i) to assess the reproducibility of the results from a first trial implemented in 2004 and (ii) to evaluate the effect of probiotic doses on survival improvement of shrimps challenged by IWS. Beside survival improvement, the probiotic doses were evaluated in relation to the growth parameters of the shrimp and to their associated gut microbiota.

## Materials and Methods

### *Diet preparation*

The standard shrimp feed composition is detailed in Table 1. Feed was processed at the laboratory as follows: the ingredients were ground up in a laboratory grinder (Retsch®) with a 1 mm screen. The meal obtained was mixed with oil and water (30%) in a horizontal mixer (Mainca®) until the consistency was such that it could be pelleted. The mixture was then extruded in a meat grinder through a 3 mm die. The strands of feed were dried at 60° C for

24h in a drying oven (Venticell® 222) until the residual moisture content was less than 10% and then they were broken up into pellets of 4 to 5mm in length.

The commercial probiotic preparation tested was Bactocell® PA 10 (Lallemand SAS., Blagnac, France) formulated with live *P. acidilactici* MA 18/5M (Institut Pasteur, Paris, France). The treatment groups were fed this diet supplemented with 2 levels of the probiotic, respectively a low dose (LD) of 0.1g ( $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> of diet) and a high dose (HD) of 1g ( $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of diet) per kg of diet. The probiotic (powder form) was top-coated on the pellets using 3% of fish oil as a carrier. The probiotic concentration in the feed was systematically checked after processing by counting *P. acidilactici* strains on MRS plates using serial dilution. The control diet was also top-coated with 3% fish oil and checked for the absence of detectable *P. acidilactici* prior to use. Feeds were stored in 5-litre boxes at 20°C until use.

#### *Shrimps and experimental conditions*

In this study, two trials were conducted in order to evaluate the effects of two *P. acidilactici* levels (LD and HD) in the shrimp feed on growth parameters and survival following induced winter syndrome.

The shrimps *Litopenaeus stylirostris* used in these experiments were previously reared in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) at the IFREMER research facilities of Saint-Vincent (New Caledonia), starting at 20-day post-larvae (P20) and stocked at a density of 20 post-larvae per m<sup>2</sup>. The shrimps were reared according to standard semi-intensive farming practices in New Caledonia until they reached the desired size: shrimp were fed twice a day (at 8.00 am and 4.00 pm) with a commercial formulated feed. The feeding rate was adjusted weekly according to the estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding.

#### Trial 1: Probiotic effect on survival and growth following IWS in outdoor tanks.

In the first trial, winter syndrome was induced by transfer and handling of the animals in outdoor experimental tanks during the winter season [16]. “Winter syndrome” has been standardized for experimental purpose and has been called “Induced Winter Syndrome” (IWS). The trial was conducted from May to June 2005 at the beginning of the winter season in New Caledonia. Two hundred and seventy (270) juvenile *Litopenaeus stylirostris* shrimps originating from IFREMER’s experimental farm were randomly allocated to three treatment groups: control, probiotic at a low dose (LD) and probiotic at a high dose (HD). Shrimps

were acclimatized in tanks supplied with continuously flowing seawater from the lagoon on the west coast of New Caledonia for one week prior to the induction of winter syndrome. The water renewal rate in the tanks was 400% per day. Aeration was delivered by high pressure air. The temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset). Shrimps were fed to appetite twice a day (7am and 3pm). At this time the water temperature fluctuated between 26°C and 27°C in the tanks. When a first drop in water temperature was detected, shrimps were fished, weighed, individually tagged by injection of a coloured elastomer (Norwest Marine Technology) and transferred (day 0) into eighteen circular 500 L polyester tanks (diameter, 118.5 cm; height, 69 cm; surface area at the bottom, 92 cm<sup>2</sup>; capacity, 536 litres) at a density of 15 animals per tank. Six replicate tanks were used for each treatment. Mortalities were determined by counting the number of recovered dead shrimps twice a day, starting immediately after the transfer until the end of the experimental period. Shrimps were kept in the same experimental conditions for 32 days in order to determine the probiotic effect on growth parameters. For this purpose individual growth was followed by means of individual tagging.

At the end of the trial the final body weight of each shrimp was measured, and the final biomass and the average daily weight gain (ADG) per tank were determined. Apparent feed conversion ratios (FCR = amount of feed distributed/biomass gain) were also determined for each tank. For this purpose, rations were daily adjusted for each tank according to feed remainders. This adjustment of the feeding rate was based on the visual determination of feed consumption carried out within two hours after each meal. In order to exclude the bias due to mortalities in FCR calculation, dead shrimps were removed from the tanks every day and immediately weighed individually.

#### Trial 2: Probiotic effect on survival after an induced temperature drop

A second trial was conducted in July 2006 during the winter season, but this time the temperature was kept constant and IWS was induced by a temperature drop. This experiment lasted 10 days. 300 shrimps (19.5±1.5 (s.d.)) previously transferred from a pond at the IFREMER research facility were acclimatized for 5 days in three indoor circular tanks (4-metre diameter, 1.25 m high with 50 cm depth of water) at a temperature of 25.7±0.6 °C (150 shrimps per tank). In order to reduce potential mortalities after handling and transfer of the shrimps, the following transfer protocol was used: temperature around 26°C and low salinity (26ppm), after Wabete *et al.* [6]. During the acclimatization period, shrimps were fed the experimental diet with (at dose LD and HD) or without probiotic. Water renewal was

continuous, at a rate of 100% per day. Each tank was also equipped with an air-lift system connected to a circular network of PVC tubes buried in the lower sediment layer. Additional aeration was provided at the bottom of each tank by two high pressure air diffusers. Water temperature was adjusted with a thermostat (RENAR, DPS2A) connected to heat resistances (3000 watts) in each tank. On the sixth day of rearing, heat resistances were turned off in order to induce a temperature drop within 24 hours from  $25.7 \pm 0.6$  °C to the ambient water temperature ( $21.6 \pm 0.4$  °C), near the low end of the thermopreferendum for *L. stylirostris* [2]. Mortality was recorded twice daily in each tank. The end of the trial was determined when mortalities ceased in all tanks.

**Table 1.** Formulation (%), proximate composition (%) and energy content of the experimental feed.

| Ingredients                                | %    |
|--------------------------------------------|------|
| LT Fish meal <sup>(a)</sup>                | 30   |
| Soy bean meal <sup>(b)</sup>               | 20   |
| Wheat meal <sup>(c)</sup>                  | 37   |
| Wheat Gluten                               | 7    |
| Fish oil                                   | 0    |
| Soy oil                                    | 2    |
| Soy lecithin <sup>(d)</sup>                | 2    |
| Shrimp vitamin premix <sup>(e)</sup>       | 0.05 |
| Shrimp trace mineral premix <sup>(f)</sup> | 0.1  |
| Stay C (330 mg/kg) <sup>(g)</sup>          | 0.04 |
| Composition (analysed, dry matter basis)   |      |
| Protein <sup>(1)</sup> (%)                 | 43.8 |
| Fat <sup>(2)</sup> (%)                     | 10   |
| Fiber <sup>(3)</sup> (%)                   | 2    |
| Ash <sup>(4)</sup> (%)                     | 6.9  |
| Gross energy (Kcal.kg-1)                   | 4502 |

<sup>(a)</sup> Chilean low temperature fish meal from anchovy and Jacl Marckerel

<sup>(b)</sup> Dehulled soybean meal solvent extracted

<sup>(c)</sup> Whole wheat grain for animal feed

<sup>(d)</sup> Ultrales® lecithin from ADM lecithin, Decatur, IL, USA

<sup>(e)</sup> Vitamin premix SICA Cie

<sup>(f)</sup> Mineral premix SICA Cie

<sup>(g)</sup> Rovimix® Stay-C® 35 from DSM nutritional products Ltd

<sup>(1)</sup> ISO5983 standard

<sup>(2)</sup> NF V18-117/B standard

<sup>(3)</sup> NF V03-040 standard

<sup>(4)</sup> NF V18-101 standard

### *Quantitative determination of the gut microbiota*

In order to determine the effect of the probiotic supplementation, a microbiological analysis of the gut microbiota of the shrimps was also carried out in the middle (16 days) and at the end of the first trial (32 days). Shrimps were sampled at midday (12.00 pm) between the two meals. For this purpose, four individual shrimps per treatment were dissected using sterilized surgical scissors to remove mid- and hind-gut (intestine) [17]. To avoid possible external contamination while removing organs, the surface of each shrimp was previously cleaned using 70% ethanol [18]. The removed organs were placed in a sterile tube containing 1 ml of sterile artificial seawater and weighed before homogenization. Bacteriological determination was made using serial dilution in sterile saline solution followed by plating triplicates on Marine agar (MA), Thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) and De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS), in order to determine total cultivable heterotrophic marine bacteria, *Vibrio sp.* and *P. acidilactici* respectively. After incubation (24 h and 48 h at 29°C for MA and TCBS plates, and 48 h at 37°C for MRS plates) colonies were counted and recorded. All the results are presented as colony-forming units per gram of fresh digestive tract (CFU g<sup>-1</sup>).

### **Statistical analysis**

The data were statistically analysed by the statistical package Stat View (SAS Inc., Cary, NC, USA). After checking normality (Kolmogorov Smirnov test) and homogeneity of variance (F-test), comparisons were made using ANOVA. Percentage survivals were assessed by ANOVA after arcsine transformation [19]. For microbiological analysis, bacterial counts were log transformed before running ANOVA. The comparisons between the two treatments were made using Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD). Statistically significant difference among experimental groups was reported at ( $P < 0.05$ ). When normality and/or homoscedasticity of variance were not verified, comparisons were assessed by the Kruskal-Wallis test to determine the general effect, followed by a Student-Newman-Keuls test for significant differences between the two probiotic treatments and control.

## Results

### *Concentration of P. acidilactici in the feed*

The average *P. acidilactici* (MA 18/5M) content in probiotic supplemented feeds prepared for trial 1 was  $6.8 \times 10^5$  cfu.g<sup>-1</sup> and  $7.2 \times 10^6$  cfu.g<sup>-1</sup> for the LD and HD diets respectively. For trial 2 probiotic concentrations were of  $1.3 \times 10^6$  cfu.g<sup>-1</sup> and  $1.9 \times 10^7$  cfu.g<sup>-1</sup> for the LD and HD diets respectively. These values were close to the expected counts,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  cfu.g<sup>-1</sup> of feed for the LD and HD diets respectively.

### *Probiotic effects on survival and growth parameters*

#### Trial 1

Figure 1.A shows the daily average water temperature in the experimental tanks. At day 0, following the transfer of the animals to the experimental tanks, and during the successive 11 days of the trial, daily average temperatures dropped gradually from 25°C to 22°C. Then water temperature returned to the initial level (around 26°C) before dropping again dramatically (within 48 h) at day 20 close to the lower limit of *L. stylirostris* thermopreferendum and stabilized around 22°C thereafter.

The daily number of dead shrimps recovered in the tanks belonging to the two probiotic and the control treatments are shown in figure 1.(B,C,D). Mortalities were observed immediately after the transfer in the control and the LD groups. These mortalities fell but continued until day 10 and 13 for the LD and the control group respectively. At this point, water temperature increased to reach values close to 26°C. A smaller number of dead shrimps were recorded daily in the LD, while the HD group did not exhibit any mortality during these first 13 days of rearing. At day 22, a second mortality peak was detected in all tanks following the second drop of temperature from 26°C to 22°C. At this time a higher number of dead shrimps was recorded in the LD group compared to the other treatments. Finally, a significant difference was obtained in the survival rates among the shrimps undergoing the treatment ( $P < 0.05$ ).

Probiotic treatment resulted in higher shrimp final survival rates (Table 2.). The HD supplementation led to a significant ( $P < 0.05$ ) increase (+42.2%) in the survival rate

compared to the control group (Table 2). The LD probiotic diet resulted in an intermediary survival rate not significantly different than with the other treatments. In regard to growth parameters, no differences were observed in the final body weights of shrimps among the groups (Table 2.). However, the mean ADG per tank exhibited higher values for shrimps belonging to the probiotic groups. Significant differences were observed only between control and HD groups ( $P < 0.05$ ). The final biomass per tank and FCR were significantly different between groups. Indeed, whatever the probiotic supplementation, biomass was significantly increased and FCR significantly reduced compared to the control group. No significant dose effects were recorded; however, the LD treatment gave systematically intermediary results.

**Table 2.** Survival and growth parameters of *L. stylirostris* reared with and without *P. acidilactici* probiotic at the end of trial 1.

| Parameter          | Control                | Probiotic                |                          | P-value |
|--------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
|                    |                        | LD                       | HD                       |         |
| Survival (%)       | 52.2±13.0 <sup>a</sup> | 75.6±9.1 <sup>ab</sup>   | 94.4 %± 2.7 <sup>b</sup> | 0.028   |
| Initial weight (g) | 5.08± 0.19             | 5.15±0.16                | 5.13 ± 0.17              | 0.504   |
| Final weight (g)   | 6.63± 0.24             | 6.81±0.18                | 6.98 ± 0.18              | 0.832   |
| ADG (mg/day) *     | 51.6±3.1 <sup>a</sup>  | 55.5±2.6 <sup>ab</sup>   | 61.5 ± 2.3 <sup>b</sup>  | 0.030   |
| Final biomass (g)  | 52.0±10.0 <sup>a</sup> | 77.2± 10.0 <sup>b</sup>  | 98.8±10.0 <sup>b</sup>   | 0.014   |
| FCR                | 3.47±0.16 <sup>a</sup> | 2.93 ± 0.16 <sup>b</sup> | 2.82 ± 0.16 <sup>b</sup> | 0.027   |

Within a row, a, b superscripts differ when  $P < 0.05$

## Trial 2

Figure 2 shows the cumulative mortalities for each treatment during trial 2. During the first stage of the trial, water temperature was kept at  $25.7 \pm 0.6$  °C. Transfer of the shrimps from the pond to the experimental tanks according to the Wabete *et al.* protocol [6] resulted in almost no mortalities. Only a very small number of shrimps died in the control and the LD treatments. In the second stage of the trial, heat resistances were turned off and the temperature dropped dramatically (within 24 hours) to  $21.6 \pm 0.4$  °C. This temperature drop resulted in mortalities in the control group while the probiotics groups were not affected. Four days after the temperature drop, mortalities ceased in all tanks.

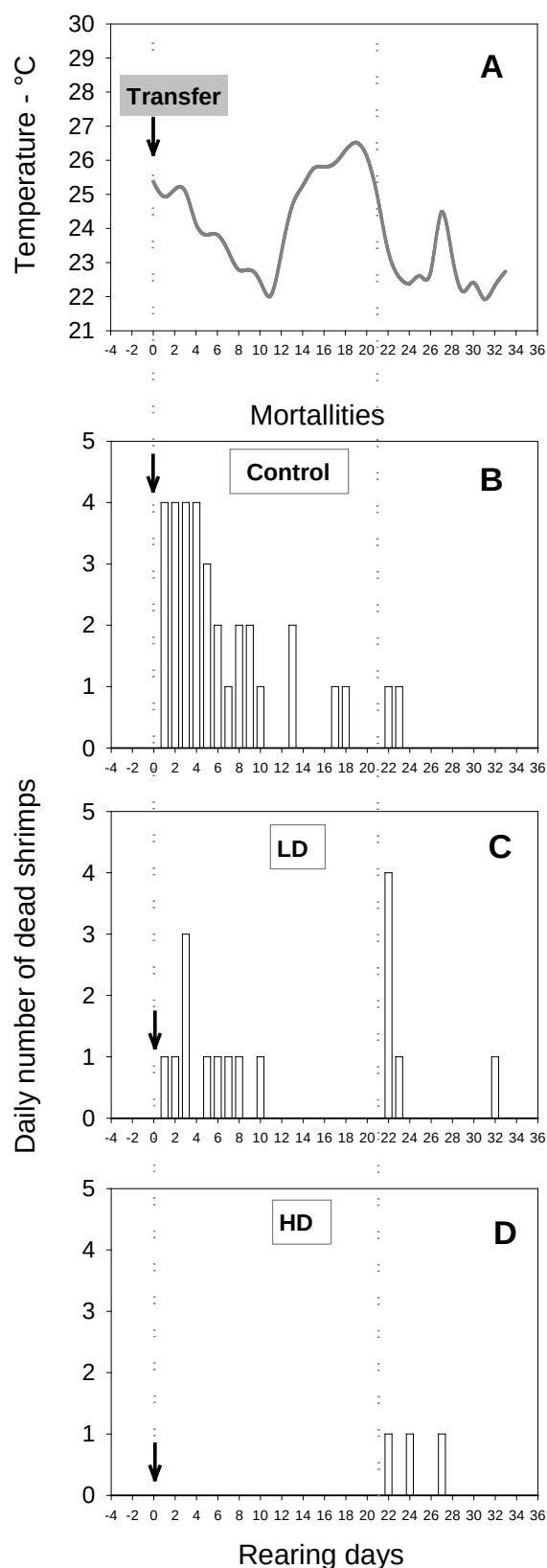


**Figure 1.** (A) Water temperature in the experimental tanks during trial 1 from day 0 (transfer) to the end of the trial. (B,C,D) Daily number of dead shrimps recovered in the tanks belonging respectively to the control, the LD and the HD treatments. Grey dash lines indicate significant temperature drops during the trial.



*Probiotic effect on gut microbiota.*

*P. acidilactici* numeration in the digestive tract of the shrimps from both probiotic doses (LD and HD) indicated levels close to  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> of fresh gut (Figure 3.). Shrimps from HD had slightly higher concentrations of *P. acidilactici*, but no significant differences were detected between doses whatever the sampling time. No colonies at all were detected on MRS plates where control digestive tract homogenates had been plated.

Bacterial counts carried out on the digestive tract of control shrimps during trial 1 indicated total bacterial concentration of 9.8 and 9.2 LOG (CFU.g<sup>-1</sup> of fresh gut) respectively after 15 and 32 days of rearing. Bacteria of the genus *Vibrio* represented a significant proportion of the microflora with concentration of 9.5 and 9.0 LOG (CFU.g<sup>-1</sup> of fresh gut) respectively after 15 and 32 days of rearing.

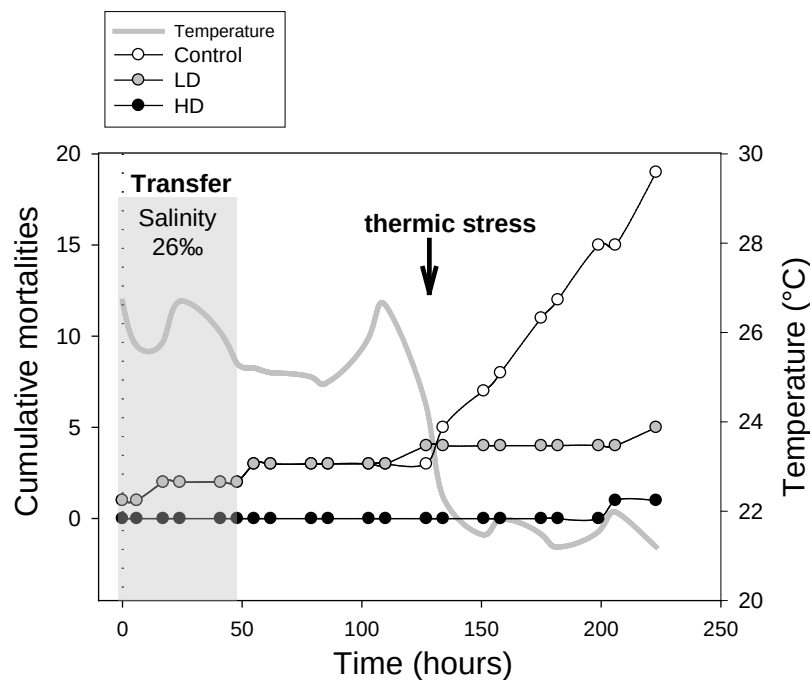


**Figure 2.** Water temperature and cumulative mortalities of shrimps during trial 2.

Significant differences were found for all treatments according to the sampling time, with significant decreases in Marine agar and TCBS agar counts between day 15 and day 32 of rearing. Finally, significant differences were found in both the total Marine agar and the TCBS counts depending on the treatment (Figure 4.). For both LD and HD, shrimps fed probiotic diets exhibited systematically lower bacterial counts compared to the control

shrimps ( $P < 0.05$ ), and this effect was more pronounced at day 32 for both MA and TCBS counts ( $P < 0.01$ ). No evident dose effect was evident, even though some significant differences between LD and HD were detected (Figure 4.).

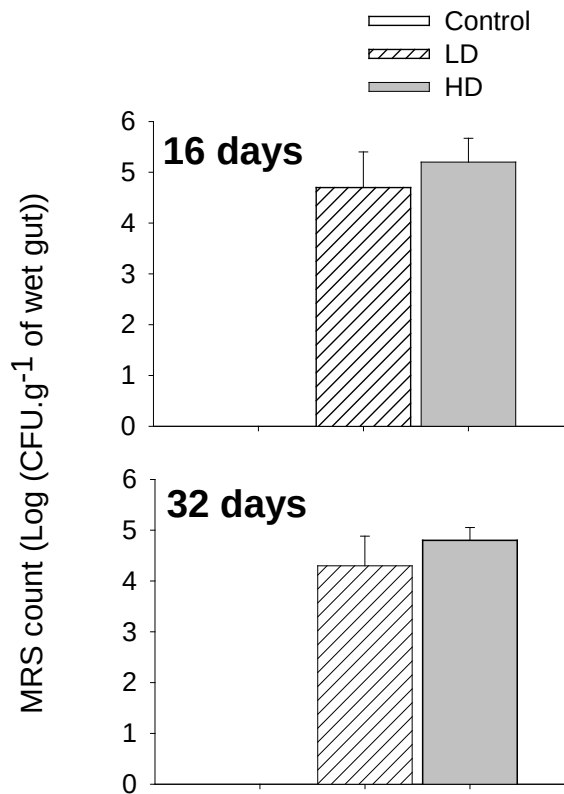


**Figure 3.** MRS agar counts from homogenate samples of fresh digestive tract of shrimp from trial 1 sampled in the middle (day 15) and at the end of the trial (day 32). No single *P. acidilactici* colony was detected in the gut of the sampled control group.

## Discussion

With these experiments, we confirmed the beneficial effect of *P. acidilactici* on the survival of *L. stylirostris* subjected to “Induced Winter Syndrome” (IWS) obtained in a previous experiment [15]. Here the objective was to evaluate two different probiotic levels on shrimp survival and growth. To this end, we used the IWS protocol in two trials to evaluate survival improvement when shrimps were fed the two probiotic doses, one a low dose ( $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup>) similar to the one used in 2004 [15], the other 10 times higher ( $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup>).

During the first experiment, shrimps were caught and transferred to the experimental tanks at the beginning of the winter season when temperatures began falling. This resulted in the

appearance of IWS-characteristic mortalities. Previous studies have shown that individual tagging has no lethal effect on shrimps [20, 21]. However, handling and tagging of the animals may have resulted in an additional stress which could have enhanced the mortalities observed in this study. If indeed this stress had a real aggravating effect, it would have been the same for all the animals, making the conclusions, in term of comparison between treatments, unbiased.

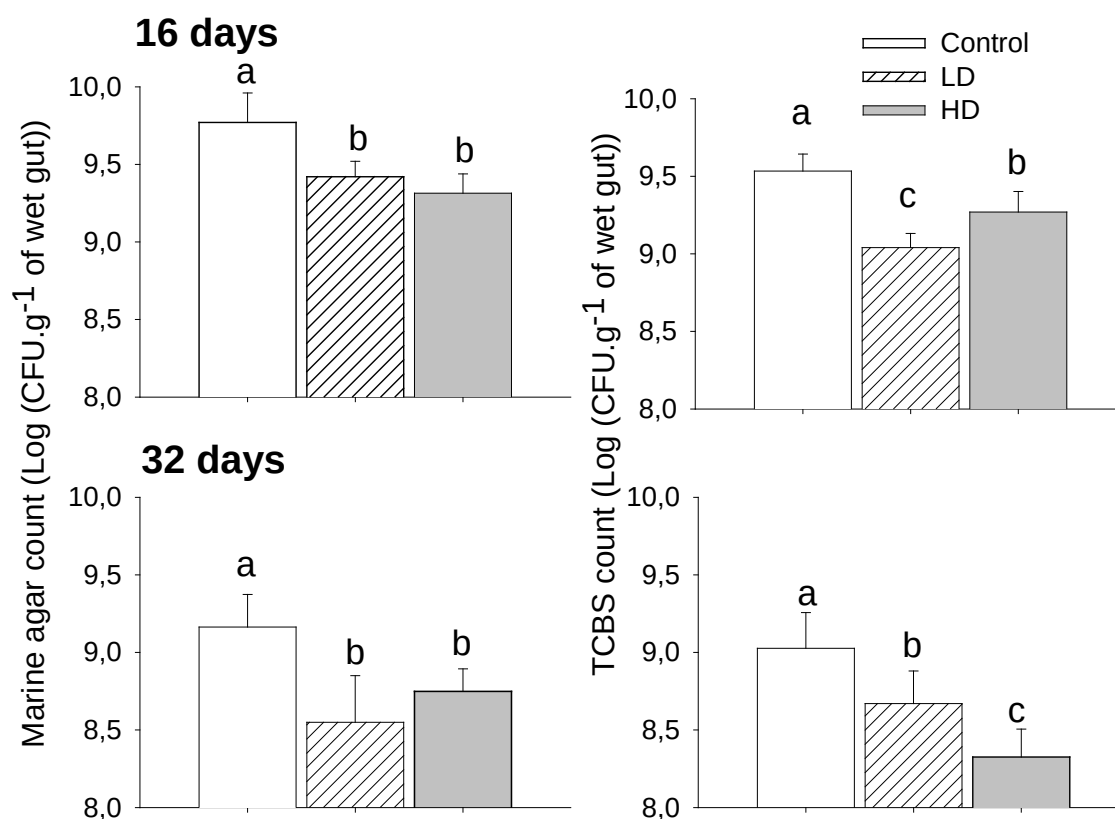


**Figure 4.** Marine agar and TCBS agar counts from homogenate samples of fresh digestive tract of shrimps from trial 1 sampled in the middle (day 15) and at the end of the trial (day 32).

Our results indicate that the probiotic reduced the mortalities and that this effect was more pronounced with the high inclusion level of *P. acidilactici*. In fact, in the HD treatment, transfer and handling of shrimps did not lead to any mortality. Furthermore, it is important to note that the second fall in temperature recorded in trial 1 from day 20 to day 22 resulted in mortalities in all the groups, and that at this time the LD treatment exhibited the highest mortalities. This can be explained by (i) the possibility that in the control group the most resistant animals may have been selected according to their better resistance during the first

stage of the trial, making them able to resist a second thermal stress, and (ii) the supposition that the HD treatment confers better protection to the shrimps compared to the LD one.

The second trial was conducted to evaluate the effect of a probiotic dose on shrimp survival after a lower stress induced exclusively by an experimental temperature drop, without any handling of the animals. During this experiment, shrimps were transferred from ponds to the experimental indoor tanks according to the protocol described by Wabete *et al.* [6]. Our results confirm the effectiveness of this protocol for eliminating mortalities after transfer during the winter season. However, a few days after the transfer, the induced temperature drop led to mortalities. Those mortalities were lower compared to those recorded during trial 1 (slightly less than 20% of mortality in the control treatment). This is not surprising as the stress applied to the shrimps in this case was reduced compared to trial 1. As a consequence, low mortalities were detected in all groups with 18%, 5% and 1% mortality rate respectively for control, LD and HD treatments. *V. penaeicida* and other bacterial strains responsive to winter syndrome are naturally present in New Caledonia and we can assume that the shrimps used in this experiment were carrying some of this strain. However, as was emphasized by the research program DESANS [5], mortalities related to “Winter syndrome” has multifactorial causes and may be heightened by parameters other than temperature drop and bacterial infection. Other external (environmental perturbations, fishing, handling stress) or internal factors (moulting, oxidative stress, etc.) were listed as aggravating factors.

Results from both trials indicate that a probiotic inclusion level of  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed may be recommended in order to increase shrimp survival under winter syndrome conditions. Furthermore, we showed that the probiotic has a significant effect on growth rate and feed conversion efficiency. Interestingly, the HD treatment again gave the greatest improvements. However, as this effect has not been assessed under healthy conditions we cannot conclude whether the probiotic has a direct effect on shrimp growth or if the growth and FCR improvements are linked to the better resistance of shrimps under IWS conditions. In addition, growth promoter effects are often influenced by ambient factors; therefore, the results may be liable to a high degree of variability depending on the rearing conditions. Consequently, the probiotics used as a growth stimulant could yield different results under different culture conditions. Further studies need to be conducted to assess the probiotic's growth-promoting effects under various culture conditions.

To explain the probiotic effects recorded on shrimp survival and growth, several hypotheses can be formulated. Some of them, briefly discussed in this paper, have been investigated and discussed in recent published papers [22, 23] or others currently under preparation. There are

many ways in which probiotics could be beneficial [8]. These include: inhibition of pathogens via production of antagonistic compounds, competition for attachment sites, competition for nutrients, alteration of enzymatic activity of pathogens, immunostimulatory functions, and nutritional benefits such as improved feed digestibility and therefore feed utilization. It is often claimed that a probiotic must be adherent and colonize within the gastrointestinal tract. These suppositions are based on the idea that a probiotic must become a permanent member of the intestinal flora [11]. However, it has been demonstrated that transient bacteria can also exert beneficial effects [24]. In a previous study [22], we showed that *P. acidilactici* reached levels between  $10^4$  and  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> in the gut after feeding, as recorded in the present study. However, it was demonstrated that the strain was transient in the gut of the shrimp, as it is the case for fish species [25]. Nevertheless, in these two studies, the probiotic exerted beneficial effects on the host by preventing the vertebral column compression syndrome in rainbow trout and by increasing survival of shrimps subject to vibriosis under pond conditions.

During the past decade, several *in vivo* studies have demonstrated the beneficial effect of probiotic strains on shrimp resistance to vibrio infections [26, 27, 28, 29, 30, 22, 31]. Other studies have reported probiotic effects on shrimp growth and feed utilisation efficiency [32, 33, 34, 35]. In regard to survival improvements, the hypotheses generally put forward are the inhibition of pathogenic bacteria strains in the digestive tract and various effects on the physiology of the host which strengthen their health status. For instance, the putative improvement in the immunity of shrimps by probiotic has received some attention [29, 31, 36, 37, 38]. In their study, Gullian *et al.* [29] showed an enhancement of the global immunity index when shrimp were fed *Bacillus* and *Vibrio* probiotic strains. However, a preliminary study carried out under the same conditions as trial 1 of the present study did not produce any clear evidence of the effect of *P. acidilactici* on the total haemocyte count and phagocytosing activity in the haemolymph of shrimps [15]. To our knowledge no effect on the immune system has been previously reported with *P. acidilactici* [14, 39]. Besides, as mentioned by Balcazar *et al.* [40], the bacteria that did not colonize the gut would not help in improving the immune system of shrimp. It is known that colonization with specific microbiota in the gut may play a role in balancing the intestinal mucosal immune system, which may contribute to the induction and maintenance of immunological tolerance or to the inhibition of the deregulated responses induced by pathogens in the host. Indeed in their study, apart from global immunity index enhancement, Gullian *et al.* [29] showed that the probiotic strains tested achieved colonization percentages of 83%, 60% and 58%. Viera *et al.* [41] showed the immunostimulant effect of *Lactiobacillus plantarum* in *L. vannamei* when its concentration

in the digestive tract was maximum ( $10^4$  to  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup>). Additional studies have shown that under pond conditions, feeding shrimps with two meals a day containing *P. acidilactici* did not allow its stable concentration in the intestinal tract of the shrimp to be maintained over 24 hours [22]. However, more frequent administration (4 meals a day) allowed its concentration (between  $10^4$  and  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> of the digestive tract) to be sustained over 24 hours in the gut (Castex, unpub. results). With this condition, we were able to show an effect of the probiotic diet at the physiological level, more precisely on *L. stylirostris* antioxidant status [23]. Interestingly, Wabete *et al.* [2] showed that thermal fluctuations near the lower limit of the *L. stylirostris* thermopreferendum led to an immediate increase in O<sub>2</sub> consumption and O<sub>2</sub> partial pressure in the haemolymph, while a reduction in haemolymph O<sub>2</sub> capacitance was measured. It has also been shown that this shrimp species exhibits very high oxygen consumption levels compared to other shellfish [16]. Because of the high elevation in its oxidative metabolism under stressful conditions, such as induced winter syndrome, *L. stylirostris* would then be more susceptible to oxidative stress. The probiotic effect on the antioxidant status has been associated with a better resistance of shrimps infected by *V. nigripulchritudo* [23], and we argued that this "antioxidant" effect may limit the deleterious effects of ROS accumulation due to bacterial infection. From the present results, we can hypothesize that the probiotic effect on Total Antioxidant Status (TAS) may also limit the deleterious effects of ROS accumulation due to respiratory disorders from winter syndrome.

As mentioned above, another hypothesis concerns the inhibitory effect of the probiotic strain on bacteria of the intestinal flora, reducing the effect of putative pathogenic strains. In a general way, the link between the inhibitory effects on intestinal flora and the improvement of survival following bacterial infection has not been clearly demonstrated. Ringo and Gatesoupe [12] stated that bacteria capable of producing lactic acid fermentation may inhibit the proliferation of putrefactive microbes in the digestive tract of aquatic organisms and thus contribute to the improved health status of the host. Our results showed a significant reduction of intestinal bacterial microflora in the probiotic groups. Other authors have reported similar *in vivo* observations in shrimps fed probiotic, and have also demonstrated survival improvement and beneficial immunological effects [31, 41, 42]. In a previous study, we showed that the probiotic lowered total bacteria counts, including TCBS counts, in the gut of shrimps. We assumed that this significant limitation of bacterial load after feeding probiotic indicates that the strain tested might have *in vivo* bacteriostatic properties. These results were consistent with previous data [43] showing an *in vitro* antagonistic effect of *P. acidilactici*

strain MA 18/5 M on Gram-negative bacteria, and notably on some pathogenic vibrio strains for *L. stylirostris* (*V. penaeicida* and *V. nigripulchritudo*). However, we did not see any evidence of a dose effect as has also been reported with other probiotic in *Litopenaeus vannamei* [31]. This may be partly explained by variations between the probiotic concentrations in the gut among individual shrimps due to differential feed intake and molting. Moreover, recovered *P. acidilactici* at the intestinal level seems weak compared to the total intestinal flora concentration for explaining such an inhibitory effect, even if these concentrations are in the same range as those reported for other GRAM positive probiotics fed to penaeid shrimps [36, 34, 44]. Furthermore, in our study, potential pathogenic bacteria, such as *V. penaeicida* strains, were not followed during this work and the way these pathogens enter the shrimp has not been studied. From our results, it is thus impossible to state if the probiotic inhibitory effects in the gut could have an effect on pathogenic bacteria and, moreover, on the levels of infection of the shrimps. In our previous study, we showed a reduction of shrimp infection levels by *V. nigripulchritudo*, but we were not able to link this observation with the inhibitory effect of the probiotic on the gut microflora [22]. In their study, Gullian *et al.* [29] showed competitive interaction of several probiotic strains with pathogenic *V. harveyi* strain in shrimp using RAPDs and monoclonal antibodies. However, in their case they looked at the digestive gland level, where the cultivable indigenous microflora is generally lower than in the digestive tract ( $3.7 \times 10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> in their case). As emphasized by Aubin *et al.* [25], an indirect effect of *P. acidilactici* strain, by stimulating favourable intestinal microbiota, would be more relevant. In order to investigate this hypothesis, a more detailed qualitative study, based on biomolecular techniques, such as Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), is currently being carried out. To date, only very few studies have reported using such methods on the intestinal microflora of penaeid shrimps [45, 46] and there is an absence of work using this approach to evaluate probiotic effects. Saenz De Rodriguez *et al.* [47] conducted such a study on juvenile Senegalese sole fed a probiotic enriched diet. As suggested by these authors, a probiotic effect on the intestinal flora composition may explain the effect on growth, intestinal functionality and resistance of fish to potential pathogens.

Finally, results on growth and FCR may also suggest a probiotic effect at the nutritional level. Additional studies on *L. stylirostris* were able to confirm the improvement of the FCR, and showed an improvement in some digestive enzyme activities [22]. Furthermore, a more recent study has confirmed growth and FCR improvements under standard conditions and

investigated the nutritional effects of the probiotic strain in *L. stylirostris* (Castex *et al.*, in prep.).

## **Conclusion**

In this study we confirmed the benefits of using *P. acidilactici* to reduce the susceptibility of shrimps to temperature fluctuations at the low end of their thermopreferendum and more specifically to increase their resistance to winter syndrome. A dose of  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed appears to be optimal and can be recommended in order to increase shrimp survival in New Caledonian farms during the winter season.

On the basis of this study, we formulated several hypotheses to explain the probiotic effect. Interestingly, they are corroborated by the results of our recent studies on the nutritional and physiological effect of the probiotic *P. acidilactici* in *L. stylirostris*.

## **Acknowledgments**

We thank the technical staff of the experimental facilities at St Vincent, New Caledonia for their help.



## References

1. 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.
2. Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.C.(2008) Life on the edge: physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. Marine Biology 154/3, 403–412.
3. 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. SICCPPS Book of Abstracts. SEAFDEC, Iloilo City, Philippines, p. 46.
4. Goarant, C., Régnier, F., Brizard, R., Marteau, A.L.(1998) Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. Aquaculture 169, 291–296.
5. Bouqin DESANS
6. 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.
7. Gatesoupe, F.J.(1999) The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165.
8. Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W.(2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 655–671.
9. Irianto, A., Austin, B.(2002) Review probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 25, 633.
10. Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H.(2006) Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 30, 404–427.
11. Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, J., Gibson, L. (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274: 1-14
12. Ringø, E., Gatesoupe, F.J.(1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160, 177–203.
13. Vandenberg, P.(1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 12, 221–238.
14. Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B.(2002) Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 1318–1323.
15. Chim, L., Maisonneuve, V., Lemaire, P., Wabete, N., Usache, V. (2005) Dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* MA 18/5 (Bactocell®) study to a juvenile marine shrimp *Litopenaeus stylirostris* reared in tanks and in pond. Book of abstracts. WAS annual meeting, 9–13 May 2005. Bali, Indonesia.
16. Wabete, N. (2005) Etude écophysiological du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetteculture en Nouvelle Calédonie. Thesis presented at Université Bordeaux 1. Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
17. Dall, W. (1967) The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* (Racek & Dall). Aust. J. Zool. 15, 699–714.
18. Sakata, T.(1989) Microflora of healthy animals. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), Methods for the Biological Examination of Fish and Shellfish. Ellis Horwood Ltd., West Sussex, England, pp. 141–163.
19. Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York 887 pp.
20. Goyard, E., Patrois, J., Peignon, J.-M., Vanaa, V., Dufour, R., Viallon, J., Bédier, E. (2002) Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. Aquaculture, 204, 461–468
21. Kneib, R.T. and Huggler, M.C. (2001) Tag placement, mark retention, survival and growth of juvenile white shrimp (*Litopenaeus setiferus* Perez Farfante, 1969) injected with coded wire tags. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 266, pp. 109–120.

22. Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P., Mariojouis, C. (2008) Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182–193.
23. Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2008) Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status in *Litopenaeus stylirostris* shrimp. *Aquaculture*, submitted.
24. Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2004) Probiotics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 18 (2), 299–313.
25. Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L. (2005) Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* 36, 758–767.
26. Moriarty, D.J.W. (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358.
27. Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. (1998) Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301–313.
28. Vaseeharan, B., Ramasamy, P. (2003) Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 83–87.
29. Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1–14.
30. Balcázar, J.L. (2007) Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 147–150.
31. Li, J., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Liufu, Z., Xu, W. (2008) Immune Responses and Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by Probiotic Bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (4), 477–489.
32. Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K. (2004) Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 501–507.
33. Lin, H.Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W., Li, Z.J. (2004) Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 35, 1441–1447.
34. Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M. (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516–524.
35. Wang, Y.B. (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259–264.
36. Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191, 271–288.
37. Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S. (2004) Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 115–120.
38. Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S. (2007) Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405–415.
39. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Belden, E.L. (1990) Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 211–215.
40. Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173–186.

41. Felipe do Nascimento Vieira, Fabiola Santiago Pedrotti, Celso Carlos Buglione Neto, José Luiz Pedreira Mouriño, Elpídio Beltrame, Maurício Laterça Martins, Cristina Ramirez, Luis Alejandro Vinatea, Arana1(2007) Lactic acid bacteria increase the survival of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. Brazilian Journal of Oceanography 55 (4), 251-255.
42. Felipe do Nascimento Vieira, Celso Carlos Buglione Neto, José Luiz Pedreira Mouriño, Adolfo Jatobá, Cristina Ramirez , Maurício Laterça Martins , Margherita Anna Antonia Maria Barracco, Luis Alejandro Vinatea (2008) Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. Pesq. agropec. bras., Brasília 43 (6), 763-769.
43. Renaud, Y. (2004) Utilisation de bactéries probiotiques comme substituts aux antibiotiques, en élevage larvaire de crevette *Litopenaeus stylirostris*. Mémoire de DEA Océanologie Biologique et Environnement Marin Option Connaissance des Producteurs Primaires, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM).
44. Rengpipat, S., Wongtangprasert, N., Palaga, T. (2008) The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture Nutrition, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00594.x.
45. Johnson, C.N., Barnes, S., Ogle, J., Grimes, D.J. (2009) 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.
46. Li,P., Burr, G.S., Gatlin III, D.M., Hume, M.E., Patnaik, S.,Castille,F.L., Lawrence, A.L. (2007) Dietary Supplementation of Short-Chain Fructooligosaccharides Influences Gastrointestinal Microbiota Composition and Immunity Characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. The Journal of Nutrition, Nutritional Immunology, 0022-3166/07 : 2763-2768.
47. Sáenz de Rodríguez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijó, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J. (2008) Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Aquaculture Nutrition, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x..

### **III Devenir de *P.acidilactici* MA18/5M dans le tractus intestinal de la crevette et influence sur la composition de la flore intestinale**

L'étude précédente a permis de montrer un effet de *P. acidilactici* sur l'amélioration de la survie et de la croissance de *L. stylirostris* soumise au « Syndrome 93 induit ». D'autre part, la dose haute ( $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>) appliquée a systématiquement permis d'obtenir de meilleurs résultats zootechniques bien que les différences avec la dose basse ne soient pas significatives. Sur la base de ces résultats, nous avons donc choisi de poursuivre nos travaux d'évaluation avec la dose d'administration de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>.

Dans ce chapitre nous avons réalisé deux séries expérimentales :

Dans la **première série** nous avons cherché à répondre à trois questions :

- Comment se comporte *P. acidilactici* MA18/5M dans le tractus intestinal de la crevette ? (expérience 1)
- Quelle est sa distribution aux différents niveaux du tractus digestif ? (expérience 2)
- Est ce que la fréquence des repas influence son maintien dans l'intestin de l'hôte ? (expérience 3)

Au cours de la **seconde série** expérimentale, nous avons cherché à évaluer l'influence du probiotique ingéré sur la microflore intestinale.

#### **III.1. Matériels et Méthodes**

##### **III.1.1. Première série expérimentale**

###### **III.1.1.1. Les animaux et les conditions d'élevage en phase d'acclimatation**

Pour cette étude, 300 crevettes d'un poids moyen de  $18,0 \pm 1,2$  g ont été pêchées dans un bassin de la station, et réparties dans 6 bacs de 1600 litres (50 crevettes par bac). Les crevettes ont été transférées dans les bacs comme décrit précédemment (Cf deuxième partie), et acclimatées pendant une semaine, nourris *ad libitum* ( $\pm 4\%$  de la biomasse) avec de l'aliment

expérimental. Le renouvellement d'eau était de 100 % par jour. Cette expérimentation a été réalisée en été et la température de l'eau a été mesurée en continu dans chaque bac à l'aide de sondes de température (Optic StowAway® Temp; Onset). Après la phase d'acclimatation, toutes les crevettes ont reçu le même aliment expérimental enrichi en *P. acidilactici* à la concentration de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>. Les restes d'aliments ont été systématiquement siphonnés deux heures après la distribution des repas.

#### **III.1.1.2. Protocole expérience 1 - Temps de résidence de *P. acidilactici* dans le tube digestif**

Le temps de résidence du probiotique dans le tube digestif des crevettes après un repas a été évalué durant 48 heures. Pour ce faire, la concentration en *P. acidilactici* dans le tube digestif (tube digestif moyen et postérieur) sur trois animaux par bac a été mesurée à différents temps après le nourrissage. A cet effet, les tractus digestifs des 3 animaux prélevés ont été poolés afin de réduire la variabilité entre les mesures. Simultanément un animal supplémentaire était sacrifié afin de mesurer la concentration *P. acidilactici* séparément dans le tube digestif vide et dans le bol alimentaire. Le bol alimentaire était récupéré en appliquant une pression de bas en haut sur le tube digestif à l'aide de pinces stériles. Deux heures après le dernier repas, les restes d'aliment ont été siphonnés et les prélèvements d'animaux ont alors été réalisés à 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 48 heures. Les données de cette expérimentation ont finalement été comparées à des résultats obtenus au cours de deux expérimentations précédentes, dont une avait été réalisée en saison chaude en cages flottantes dans des bassins d'élevage (Cf quatrième chapitre), et l'autre en saison froide dans des bacs expérimentaux (Castex, 2005).

#### **III.1.1.3. Protocole expérience 2 - Effet de la fréquence d'alimentation**

Pour cette expérience, nous avons utilisé les mêmes animaux que précédemment. Cependant avant de les mettre en expérimentation, nous les avons préalablement nourris avec de l'aliment sans probiotique jusqu'à ce que plus aucune colonie de *P. acidilactici* ne soit détectable dans leur tractus digestif. Les animaux ont alors été laissés à jeun pendant 24 heures avant le début de l'expérimentation.

Au cours de cette seconde expérience, les animaux étaient répartis dans 6 bacs et ils étaient nourris à une ration journalière de  $\pm 4\%$  de la biomasse.bac<sup>-1</sup> avec un aliment supplémenté en probiotique. Trois lots de deux bacs ont été constitués auxquels étaient appliqués trois fréquences d'alimentation : 2, 4 et 6 repas par 24 heures (Figure 3.5). Pour chaque traitement (fréquence des repas), trois crevettes par bac étaient prélevées sur 24 heures aux heures indiquées dans la figure 3.5. La concentration en *P.acidilactici* dans le tube digestif était alors déterminée.

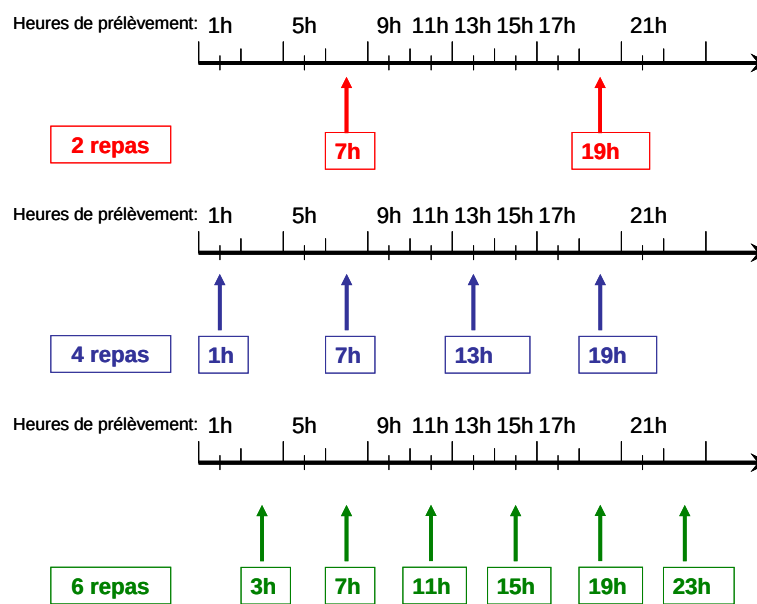


**Figure 3.5.** Horaires de nourrissage et de prélèvement pour les 3 fréquences d'alimentation considérées.

#### III.1.1.4. Protocole expérience 3 - Répartition à différents niveaux du tractus digestif et part relative du probiotique par rapport à la flore totale et vibrionacée.

A la fin de l'expérimentation précédente, un des bacs du traitement 4 repas a été maintenu pendant 24 heures supplémentaires. Trois heures après le repas du matin, neuf crevettes ont été prélevées et leurs tractus digestif disséqués. Les trois parties du tractus digestif, l'estomac, le tube digestif et la glande digestive, ont alors été prélevés séparément. Pour chacune de ces parties, trois pools de trois animaux ont été réalisés et leur concentration en flore totale, flore

vibrionacée et en *P. acidilactici* ont été déterminées après étalement sur milieux de culture spécifiques.

### III.1.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P. acidilactici* sur la flore intestinale

#### III.1.2.1. Les animaux

Des animaux d'un poids moyen de  $2,55 \pm 1,02$  g ont été pêchés dans un bassin et transférés dans deux bacs expérimentaux de 1600 L et dans deux cages flottantes (2 x 4 x 0,5 m ; cf deuxième partie) positionnées dans un bassin de la station de Saint-Vincent (Figure 3.6). Dans chaque bac et chaque cage ont été mis en élevage respectivement 80 et 200 animaux. Les crevettes ont alors été acclimatées pendant deux semaines avec l'aliment expérimental administré 4 fois par jour.

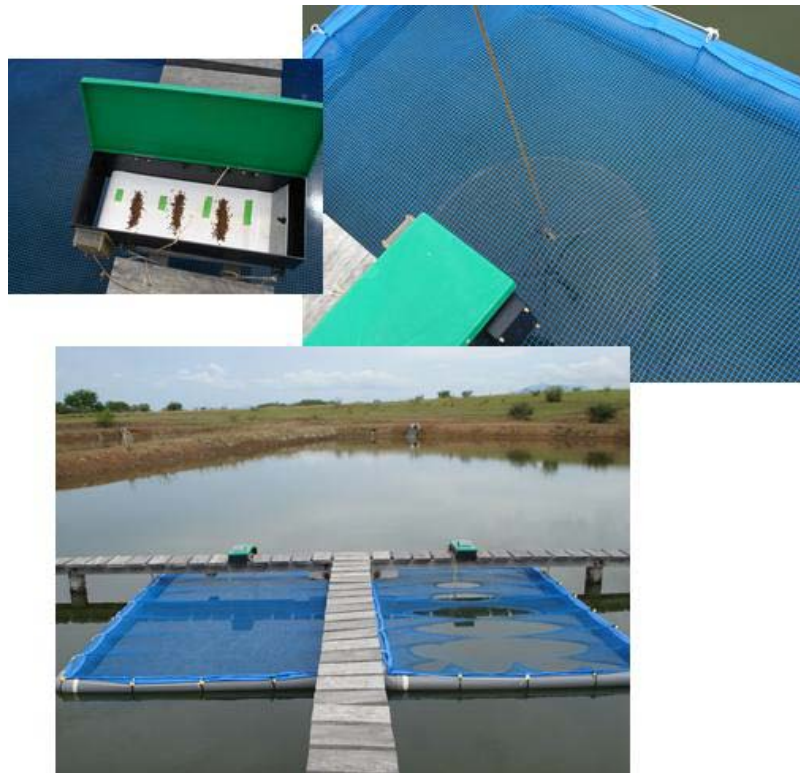


**Figure 3.6.** Cages flottantes dans un des bassins de la station expérimentale. En haut un distributeur automatique d'aliment positionné au dessus d'une mangeoire.

### III.1.2.2. Protocole expérimental

Cette expérimentation a été réalisée afin d'évaluer l'effet du probiotique sur la composition de la flore intestinale de l'hôte. Deux traitements ont été considérés pour chaque condition expérimentale: un traitement témoin recevant l'aliment expérimental standard et un traitement probiotique recevant l'aliment expérimental enrichi en *P. acidilactici* à la concentration de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ces traitements ont été appliqués sur une période de 4 semaines. Les crevettes ont été nourries avec 4 repas par jour (1h, 7h, 13h et 19h) à l'aide de distributeurs automatiques d'aliment. La ration était ajustée journalièrement sur la base des restes observés dans les bacs et sur les mangeoires des cages deux heures après les repas de 7h et de 13h. Chaque semaine, 15 animaux par cage et par bac ont été prélevés afin de déterminer le poids moyen des animaux. De plus, les tubes digestifs de 10 crevettes par cage et par bac étaient prélevés, poolés par 5. Chaque pool a ensuite été utilisé afin de déterminer la composition de la flore intestinale à l'aide de la PCR-DGGE (cf deuxième partie). Parallèlement, les tubes digestifs de 4 crevettes par traitement ont été prélevés, poolés par deux, homogénéisés dans de l'eau de mer stérile et étalés sur MRS afin de déterminer la concentration en *P. acidilactici*.

## III.2. Résultats et discussion

### III.2.1. Première série expérimentale

#### III.2.1.1. Expérience 1 - Temps de résidence de *P. acidilactici* dans le tube digestif

La figure 3.7 montre l'évolution de la concentration en probiotique dans le tube digestif des crevettes après un repas. A titre de comparaison, cette figure présente aussi des résultats obtenus dans différentes conditions d'élevage (en saison froide en bacs expérimentaux et en saison chaude en cages flottantes immergées dans des bassins d'élevage). *P. acidilactici* survit au passage de l'estomac et de la glande digestive de l'hôte, cependant, cette survie n'est pas quantifiable à partir des données de cette étude. Dans une étude réalisée en 2004 chez la truite arc en ciel (Aubin *et al.*, 2005b), la concentration en *P. acidilactici* observée dans le bol alimentaire était de  $10^5$  et  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de matière sèche. Les auteurs en déduisent une bonne survie des germes probiotiques après le passage dans l'estomac sachant que les truites



consommaient un aliment contenant  $2.1 \text{ à } 4.0 \times 10^6 \text{ CFU.g}^{-1}$  de *P. acidilactici*. Dans notre cas, la concentration déterminée dans le bol alimentaire était exprimée par rapport à la matière fraîche. La concentration moyenne en probiotique dans le bol alimentaire du tube digestif de la crevette, quelques heures après un repas, était de  $1.76 \pm 0.58 \times 10^4 \text{ UFC.g}^{-1}$

*P. acidilactici* semble transiter dans l'intestin des crevettes, montrant une concentration maximale comprise entre  $10^4$  et  $10^5 \text{ UFC.g}^{-1}$  dans les quatre heures suivant un repas. Cependant le probiotique ne s'y implante pas, sa concentration dans l'intestin diminuant avec le temps et atteignant des niveaux faibles (aux alentours de  $10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$ ) 48 heures après le repas. D'après Ringo et Gatesoupe (1998), chez les poissons, les bactéries lactiques apportées par la nourriture ne colonisent généralement pas la muqueuse intestinale et sont éliminées au fur et à mesure du transit intestinal. Cela a été confirmé par Aubin *et al.* (2005a) qui montrèrent que le probiotique *P. acidilactici* était transitoire chez la truite arc en ciel, et n'était retrouvé qu'à de faibles concentrations au niveau de la paroi intestinale ( $10^2$ - $10^1 \text{ UFC.g}^{-1}$ ). De plus, suite à un jeûne de 20 heures, la concentration intestinale en *P. acidilactici* n'était plus que de  $2,5 \pm 0,6 \text{ Log (UFC.g}^{-1}\text{)}$ . Nos résultats chez *L. stylirostris* suggèrent donc, comme chez la truite, que le pédiocoque transite avec le bol alimentaire.

La concentration en probiotique retrouvée dans l'animal est donc fonction de la quantité ingérée et du temps de passage dans le tractus digestif. Ainsi, en hiver, avec la baisse de la température il y a un ralentissement du transit intestinal qui explique que nous ayons retrouvé dans le tube digestif des concentrations en moyenne supérieures à celles observées en saison chaude (Chim *et al.* 2005). Parallèlement, en bassins nous avons observé que la diminution de la concentration intestinale en *P. acidilactici* était plus rapide qu'en bac. Cette observation pourrait s'expliquer par (i) un complément d'aliment naturel (Boucher, 2004) qui viendrait remplacer une partie du granulé entraînant une baisse de l'ingéré en probiotique (ii) et par un transit intestinal plus rapide du fait d'une nourriture abondante et toujours disponible.

Bien que la capacité d'une bactérie à adhérer et à coloniser le tube digestif soit souvent vue comme un critère de sélection de souches potentiellement probiotiques (Mombelli and Gismondo, 2000), certains travaux ont montré que des bactéries transitant dans le bol alimentaire pouvaient également avoir des effets bénéfiques sur l'hôte (Isolauri *et al.*, 2004 ; Aubin *et al.*, 2005a).

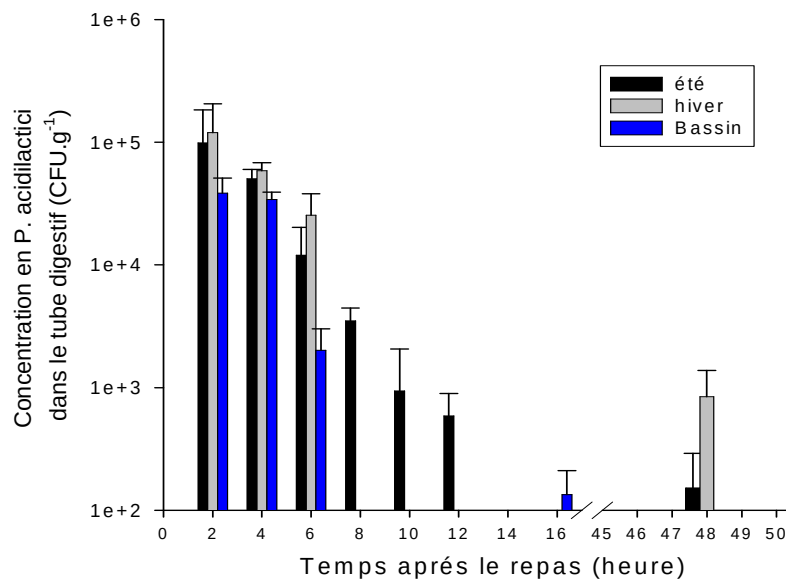


**Figure 3.7.** Evolution de la concentration en *P. acidilactici* dans le tube digestif de crevettes 48 heures suivant un repas en été. Les données en bassins sont issues d'une expérimentation qui sera détaillée ultérieurement (Cf 4<sup>ème</sup> chapitre), et les données hivernales proviennent d'une étude précédente (Castex, 2005).

Dans ce cas, la dose et le mode d'apport (continu ou semi-continu) de ce type de bactéries seraient d'une importance majeure afin de maintenir leur concentration intestinale (Gournier-Château *et al.*, 1994).

Enfin, le suivi microbien du tube digestif et du contenu digestif séparément a permis de distinguer le dénombrement de la flore associée au tube digestif de celui des germes transitant dans le bol alimentaire. Ainsi, les résultats présentés dans la table 3.1 confirment que le probiotique est en grande partie associé au bol alimentaire, et que seule une faible proportion ( $6,25 \pm 2,03\%$ ) peut être considérée comme associée au tube digestif. Cependant, l'association éventuelle de *P. acidilactici* aux parois intestinales ne semble pas durable, comme l'indique l'absence de sa détection chez des crevettes élevées en bassin 16 heures après le dernier repas (Figure 3.7). De façon intéressante, une fois encore ces résultats semblent être en accord avec ce qui a été observé précédemment chez la truite arc en ciel (Aubin *et al.*, 2005a, 2005b).

**Table 3.1.** Quantification comparée en *P. acidilactici* dans le contenu digestif seul et associé à la paroi intestinale.

|            | Concentration en <i>P. acidilactici</i> (CFU.g <sup>-1</sup> ) |               | Proportion associées au tube digestif |
|------------|----------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
|            | Contenu digestif                                               | Tube digestif |                                       |
| bac 1      | 1,89E+04                                                       | 7,22E+02      | 3,69                                  |
| bac 2      | 1,45E+04                                                       | 1,33E+03      | 8,39                                  |
| bac 3      | 1,52E+04                                                       | 1,14E+03      | 6,96                                  |
| bac 4      | 9,70E+03                                                       | 5,70E+02      | 5,56                                  |
| bac 5      | 2,06E+04                                                       | 9,51E+02      | 4,41                                  |
| bac 6      | 2,65E+04                                                       | 2,47E+03      | 8,52                                  |
| Moyenne    | 1,76E+04                                                       | 1,20E+03      | 6,25                                  |
| Ecart type | 5,80E+03                                                       | 6,82E+02      | 2,03                                  |

### III.2.1.2. Expérience 2 - Effet de la fréquence d'administration

La deuxième partie de notre étude a eu pour objet d'évaluer l'effet de la fréquence d'alimentation sur la concentration intestinale en probiotique. En effet, le caractère transitoire de *P. acidilactici* dans le tube digestif de la crevette semblait indiquer qu'un apport régulier, dont la fréquence optimale restait à être déterminée, permettrait de stabiliser sa concentration dans l'animal.

Les études expérimentales sur la fréquence d'alimentation concernent généralement l'effet sur la croissance des animaux, avec des résultats souvent contradictoires. Certains auteurs rapportent une amélioration de la croissance quand la fréquence d'alimentation est augmentée (Sedgwick, 1979, Tacon *et al.*, 2002) alors que d'autres ne montrent pas de relation directe entre ces deux facteurs (Smith *et al.*, 2002 ; Carvalho and Nunes, 2006). Cependant, Akyiama et Polanco (1997) recommandaient une fréquence de 4 repas par jour, ce que confirme une étude récente du comportement alimentaire de *L. vannamei* montrant qu'une fréquence journalière de 3 à 4 repas permet une amélioration de l'utilisation de l'aliment (Soares Pontes *et al.*, 2008)..

Dans notre étude, nous avons testé trois fréquences d'alimentation : 2, 4 et 6 repas par jour (Figure 3.5). La figure 3.8 présente les évolutions des concentrations intestinales en probiotique pour les 3 fréquences d'alimentation.

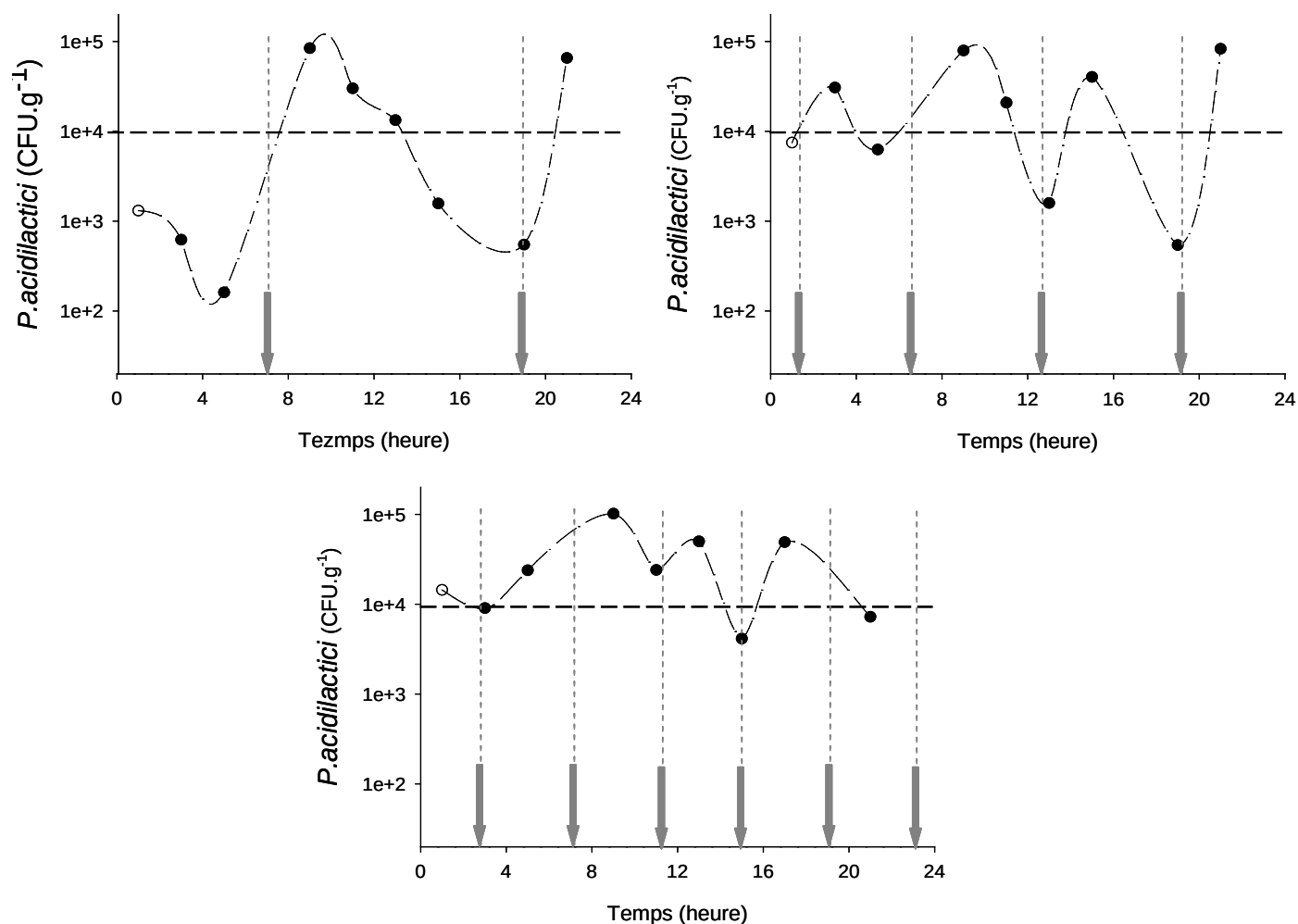


**Figure 3.8.** Evolution de la concentration en *P. acidilactici* sur 24 heures dans le tube digestif de crevettes nourris à une fréquence de 2, 4 et 6 repas par jour.

Ainsi, comme on pouvait s'y attendre, l'augmentation de la fréquence d'alimentation permet de stabiliser la concentration en probiotique dans le tube digestif. En effet, une fréquence de 4 à 6 repas par jour a permis de maintenir respectivement une concentration intestinale supérieure à  $10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> sur plus de 75 % et de 90 % de la journée contre 42 % à la fréquence de 2 repas par jour. Ce résultat s'explique simplement par le fait que le fractionnement des repas permet un apport continu du probiotique. *P. acidilactici* étant essentiellement associé au contenu digestif, il est normal d'observer une stabilisation de sa concentration intestinale. Mais en pratique, la multiplication du nombre de repas constitue une contrainte en élevage industriel, notamment dans des pays comme la Nouvelle-Calédonie où le coût de la main d'œuvre est élevé. Conscient de cette limite, et en accord avec les informations disponibles dans la littérature (Akyiama and Polanco, 1997 ; Soares Pontes *et al.*, 2008), nous avons opté

pour une fréquence de 4 repas par jour, plus couramment utilisée sur les élevages de crevettes semi-extensifs et intensifs (Clifford, 1994). Sur les fermes commerciales de Nouvelle Calédonie, l'aliment est distribué en routine 2 à 3 fois par jour.

En conclusion, ces résultats nous ont donc permis de définir une posologie d'utilisation du probiotique, à savoir une administration de *P. acidilactici* via l'aliment à une concentration de  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> et à une fréquence de 4 repas par jour.

### **III.2.1.3. Expérience 3 - Répartition à différents niveaux du tractus digestif et part du probiotique par rapport à la flore totale et vibrionacée.**

Cette expérience visait à quantifier *P. acidilactici* à différents niveaux du tractus intestinal des crevettes et à évaluer l'influence du probiotique sur la composition de la flore intestinale. La figure 3.9 montre que le probiotique a été retrouvé à tous les niveaux du tractus intestinal de la crevette. D'une manière générale, ces résultats suggèrent une certaine résistance de *P. acidilactici* aux conditions digestives chez *L. stylirostris*, notamment durant le passage dans l'estomac et dans la glande digestive. Les quantités plus importantes de bactéries probiotiques mesurées dans le tube digestif (CFU.organe<sup>-1</sup>) peuvent vraisemblablement s'expliquer par une part supérieure de l'aliment à ce niveau du tractus digestif comparativement à l'estomac et à la glande digestive. Cependant la survie de *P. acidilactici* au niveau intestinal n'étant pas quantifiable, nous ne pouvons conclure sur la part de germes probiotiques détruite par le processus de digestion.

De plus, comme nous l'avons montré précédemment, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la dose administrée de probiotique sur sa concentration retrouvée dans le tube digestif. Ce résultat diffère de ce qui a été rapporté chez la truite arc en ciel (Aubin *et al.*, 2005b), où un doublement de la concentration en *P. acidilactici* dans l'aliment s'est traduite par une augmentation significative de sa concentration intestinale. L'absence de différence observée dans notre étude peut s'expliquer, en partie, par la forte variabilité mesurée sur des échantillons individuels. En effet, la densité de la flore intestinale des crevettes pénéides varie fortement d'un individu à l'autre (Dempsey *et al.*, 1989) et cela semble être dû en partie à l'exuviation partielle du tractus intestinal au cours de la mue et probablement à des modifications rapides de la flore au cours du temps. Une autre explication peut être liée à la trituration et à la pré-dilacération externe des aliments préalablement à leur consommation par

la crevette, contrairement aux poissons qui avalent directement leur nourriture. Ce comportement alimentaire de la crevette peut en effet conduire au lessivage du probiotique qui n'est alors plus disponible pour l'animal.

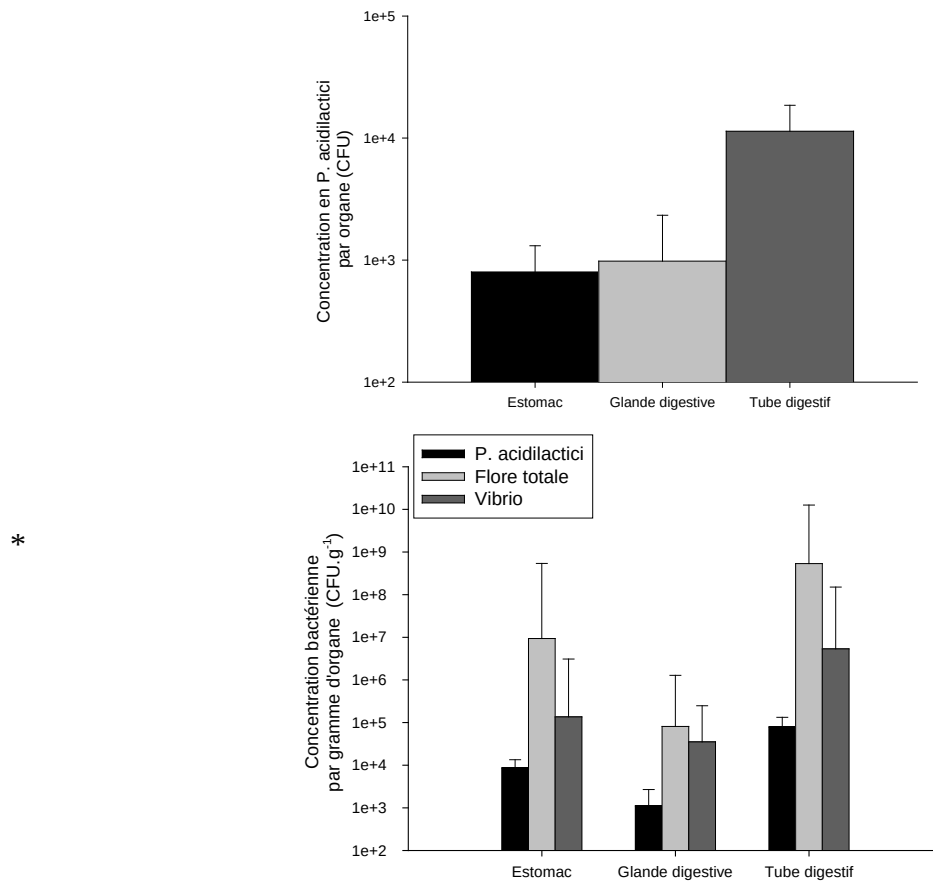


**Figure 3.9.** Concentration de la flore totale, de la flore vibrionacée et de *P. acidilactici* à différents niveaux du tractus intestinal : estomac, glande digestive et tube digestif, chez *L. stylirostris* dans les trois heures suivant le repas.

Au cours de ces expérimentations, nous avons également cherché à comparer, dans le tractus intestinal, la concentration en probiotique avec celles de la flore totale cultivable et de la flore vibrionacée. Nos résultats montrent des concentrations bactériennes totales de l'ordre de  $10^7$  à  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> dans l'estomac et le tube digestif, et autour de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> dans la glande digestive (Figure 3.9). Ces résultats sont en accord avec ce qui est généralement rapporté dans la littérature pour les différents organes considérés (Gomez-Gil *et al.*, 1998 ; Oxley *et al.*, 2002). La concentration en vibrios, dans l'estomac et le tube digestif, est, quant à elle, environ 1 à 2 log inférieure à celle de la flore totale cultivable, alors que dans la glande digestive, vibrios et flore totale sont du même ordre. En ce qui concerne le pédiocoque, nous

remarquons que sa concentration est négligeable comparativement à la flore totale cultivable, notamment dans l'estomac et dans le tube digestif (Table 3.2).

**Table 3.2.** Proportion relative de *P. acidilactici* par rapport à la flore totale et vibrionacée dans le tube digestif trois heures après un repas enrichi en Bactocell.

| Organe           | Proportion relative (%) |                   |
|------------------|-------------------------|-------------------|
|                  | Flore totale            | Flore Vibrionacée |
| Estomac          | 0,09                    | 6,37              |
| Glande digestive | 1,36                    | 3,15              |
| Tube digestif    | 0,01                    | 1,47              |

Dans leur étude Ziaei-Nejad *et al.* (2006) rapportent, chez *Fenneropenaeus indicus* (PL86 à 120), un ratio probiotique/flore intestinale compris entre 0.07 % et 0.11 %. Il faut noter que ces auteurs ont utilisé un probiotique constitué de 5 espèces de *Bacillus* et qu'ils l'ont administré directement dans l'eau d'élevage à une concentration de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Dans notre travail, la proportion relative de *P. acidilactici* par rapport aux vibrios dépasse les 1 % quelle que soit la partie du tractus digestif considérée, avec des valeurs de 6,4 % et 3,1 % respectivement dans l'estomac et dans la glande digestive. Ces valeurs sont nettement plus faibles que celles rapportées par Gullian *et al.* (2004) qui ont travaillé avec trois souches de probiotique : *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 et *Bacillus* P64 chez *L. vannamei*. En effet, ces 3 souches atteignaient, dans la glande digestive, des proportions respectives de l'ordre de 83 %, 60 % et 58 % de la flore indigène totale. Rappelons cependant que ces souches avaient la capacité de coloniser la glande digestive d'où elles avaient été isolées.

Enfin, nous avons cherché à comparer, dans le tube digestif des crevettes, la concentration en *P. acidilactici* des animaux issus, d'une part, d'élevages en cages flottantes, et, d'autre part, d'élevages en bacs expérimentaux. Les résultats obtenus sont en accord avec les précédentes observations, avec des concentrations en probiotique comprises entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> (Figure 3.10). Dans leur étude, Meunpol *et al.* (2003) rapportent, chez *P. monodon*, des concentrations intestinales en *Bacillus* S11 du même ordre ( $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>) lorsque ce dernier était administré à  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> d'aliment. Rengpipat *et al.* (2008) montrent chez la même espèce, nourrie 4 fois par jour avec un aliment comprenant  $10^{10}$  UFC de

probiotique.g<sup>-1</sup>, des concentrations en *Bacillus* S11 comprises entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> d'intestin.

Nos travaux montrent, de plus, que les concentrations intestinales en probiotique étaient plus élevées chez les crevettes provenant des élevages en eau claire dans les bacs que chez celles élevées en cages flottantes dans le bassin d'élevage (Figure 3.10). Cela semble, une fois de plus, s'expliquer par l'apport de nourriture naturelle du bassin venant diluer l'aliment composé, et le probiotique, dans le bol alimentaire ; l'observation visuelle des contenus digestifs a permis de valider cette hypothèse (données non présentées).

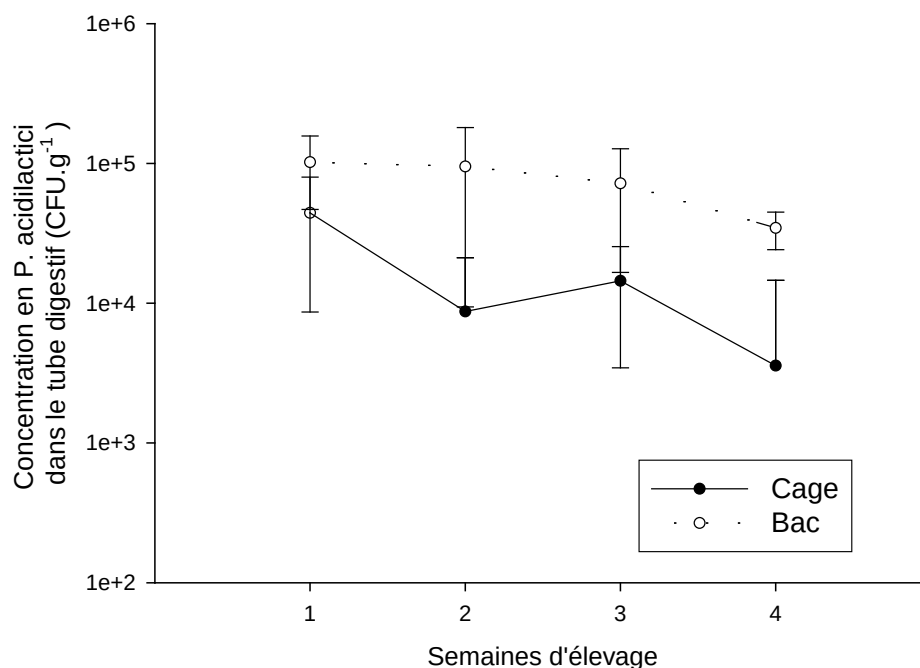


**Figure 3.10.** Concentrations hebdomadaires comparées en *P. acidilactici* dans le tube digestif de crevettes nourries à une fréquence de 4 repas par jour et élevées en bacs expérimentaux et en cages flottantes dans un bassin d'élevage.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre confirme donc l'incapacité de la souche *P. acidilactici* à coloniser le tractus intestinal de la crevette, à l'inverse d'autres souches étudiées comme la souche *Bacillus* S11. En effet, Rengpipat *et al.* (1998) ont montré une élévation de la concentration intestinale en *Bacillus* S11, passée de 10<sup>2</sup> CFU.g<sup>-1</sup> après 21 jours de traitement, à pratiquement 10<sup>8</sup> CFU.g<sup>-1</sup> après 100 jours d'élevage. Cependant Ziaei-Nejad *et al.* (2006) n'ont pas confirmé ce phénomène, car après administration de cinq espèces de *Bacillus* chez des PL de *F. indicus*, ils ont mesuré des niveaux de colonisation plus



faibles ( $10^4$  CFU.g<sup>-1</sup> de tractus digestif). Néanmoins, ces auteurs rapportent que l'administration combinée de ces *Bacillus*, durant la phase d'élevage larvaire et durant la phase de grossissement, permet d'augmenter de façon significative la proportion relative de *Bacillus* dans la flore intestinale totale et d'améliorer leur action sur l'hôte, notamment en terme de croissance. Ainsi, il pourrait s'avérer intéressant de vérifier si l'administration de *P. acidilactici* dès les phases larvaires permettrait d'augmenter la proportion relative du probiotique dans la flore intestinale des crevettes aux stades post-larvaires et juvénile.

### III.2.2. Deuxième série expérimentale : influence de *P. acidilactici* sur la flore intestinale

Nos précédents résultats (Article 1) ont montré que, quelle que soit la dose administrée, le traitement probiotique entraîne, après 16 et 31 jours de traitement, une réduction significative des moyennes des comptages de bactéries sur Pétri-films. Nous verrons dans le 4<sup>ème</sup> chapitre que des effets similaires ont été observés chez des crevettes élevées en bassin. De même, chez la truite arc-en-ciel recevant *P. acidilactici*, Aubin *et al.* (2005a) ont observé une réduction de la flore intestinale, ainsi d'ailleurs qu'une modification de la composition de cette flore.

Un autre suivi microbien sur Pétri-films de la flore intestinale, que nous avons réalisé durant 9 semaines sur des crevettes élevées en bassins, avait montré une évolution du nombre de morphotypes dominants et du type de bactéries dominantes (résultats non publiés). Une comparaison des profils RAPD de 48 bactéries dominantes isolées à partir des milieux de culture (Figure 3.11), avait permis de conclure à une relative diversité de la flore intestinale dont la composition évoluait rapidement au cours du temps. Cependant la méthode utilisée pour cette étude n'avait pas permis de mettre en évidence de différences notables entre les animaux témoins et ceux traités au probiotique.

Un tel sujet d'étude passe nécessairement par l'utilisation de méthodologies plus fiables et plus précises. Parmi celles-ci nous avons retenu la PCR-DGGE, méthode appliquée aux études de flores microbiennes complexes (Muyzer *et al.*, 1993) dont nous avons déjà présenté le principe (cf Deuxième partie). La PCR-DGGE a récemment été utilisée pour caractériser la flore bactérienne associée aux animaux aquatiques (Rombaut *et al.*, 2001 ; Hovda *et al.*,

2007 ; Brunvold *et al.*, 2007), notamment celle de *L. vannamei* (Li *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2008).

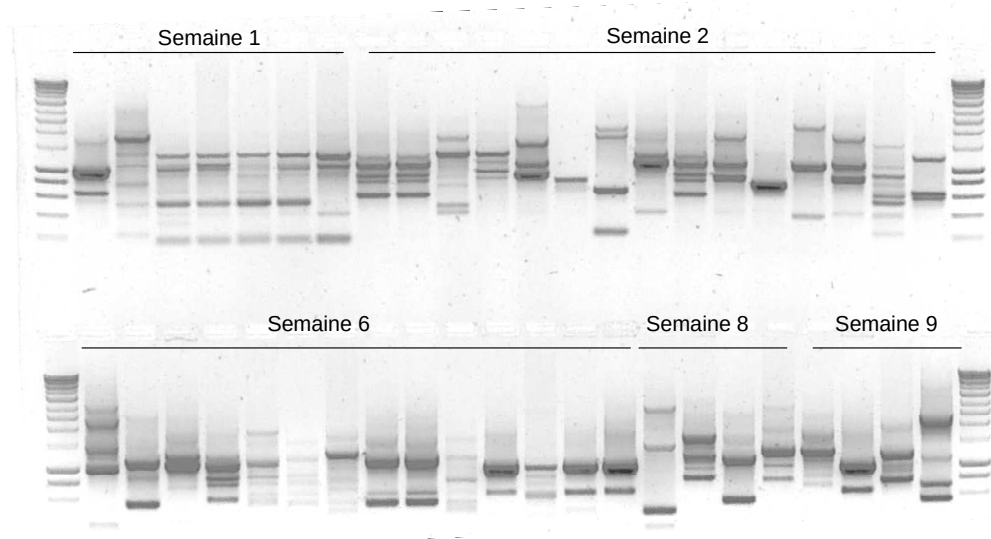


**Figure 3.11.** Profil RAPD des souches de bactéries dominantes isolées à partir d'homogénat du tractus intestinal de crevettes mis en culture sur Marina agar et TCBS. Les crevettes provenaient d'un élevage en cages flottantes mené pendant 9 semaines dans un bassin de la ferme commerciale Seafarm.

Par cette méthode, Sáenz De Rodrigáñez *et al.* (2008) ont montré l'effet de deux probiotiques alimentaires sur la flore intestinale de la sole du Sénégal. De la même façon Li *et al.* (2007) révélèrent l'effet d'un enrichissement alimentaire en fructo-oligosaccharides à courte chaîne sur la flore intestinale de *L. vannamei*.

Au cours de la présente étude, nous nous sommes intéressés à suivre, pendant un mois d'élevage, l'évolution de la flore intestinale des crevettes traitées ou non avec le probiotique. Quelles que soient les conditions d'élevage (bac ou cage), et le traitement, il n'y a eu aucune mortalité notable. Les performances de croissance ont été bonnes eu égard aux températures fraîches enregistrées sur la période (Figure 3.12). Ainsi, nous pouvons considérer que cette étude a été réalisée en conditions « standard », en l'absence de toute pathologie.

L'objectif initial de ce travail était de comparer les évolutions dans le temps de la flore intestinale selon les conditions d'élevage (cages vs bac) et le traitement alimentaire (témoin vs probiotique). Mais le traitement en cage n'a pu donner lieu à des résultats interprétables par PCR-DGGE (Figure 3.13), en raison d'un problème méthodologique d'amplification de l'ADN bactérien à partir du tractus intestinal des crevettes.

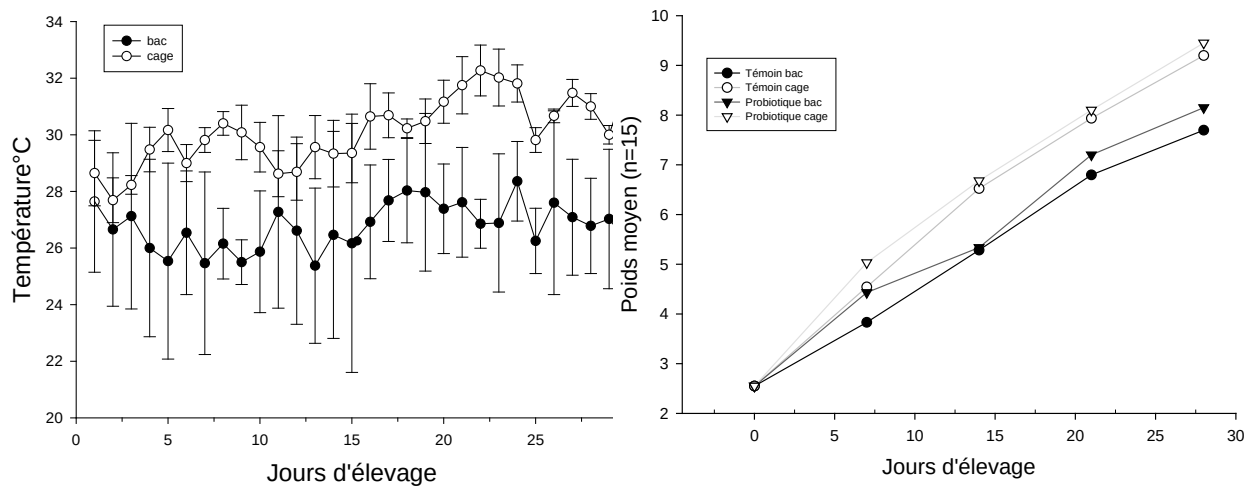


**Figure 3.12.** Evolution de la température de l'eau de mer et de la croissance des crevettes élevées en bacs ou en cages flottantes au cours de la deuxième série expérimentale.

Ce problème pourrait être lié à la présence d'un inhibiteur de PCR qui proviendrait des proies vivantes ingérées par la crevette. De fait le protocole d'extraction utilisé n'étant pas spécifique, les acides nucléiques provenant des proies vivantes ont pu interférer sur la capacité à amplifier l'ADN bactérien.

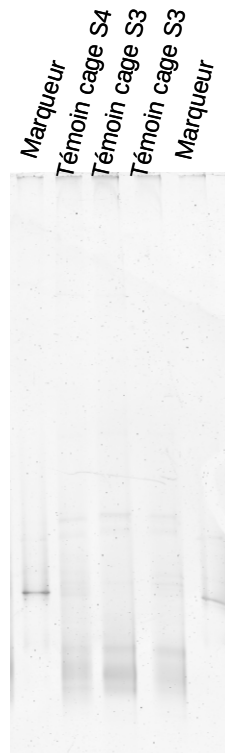
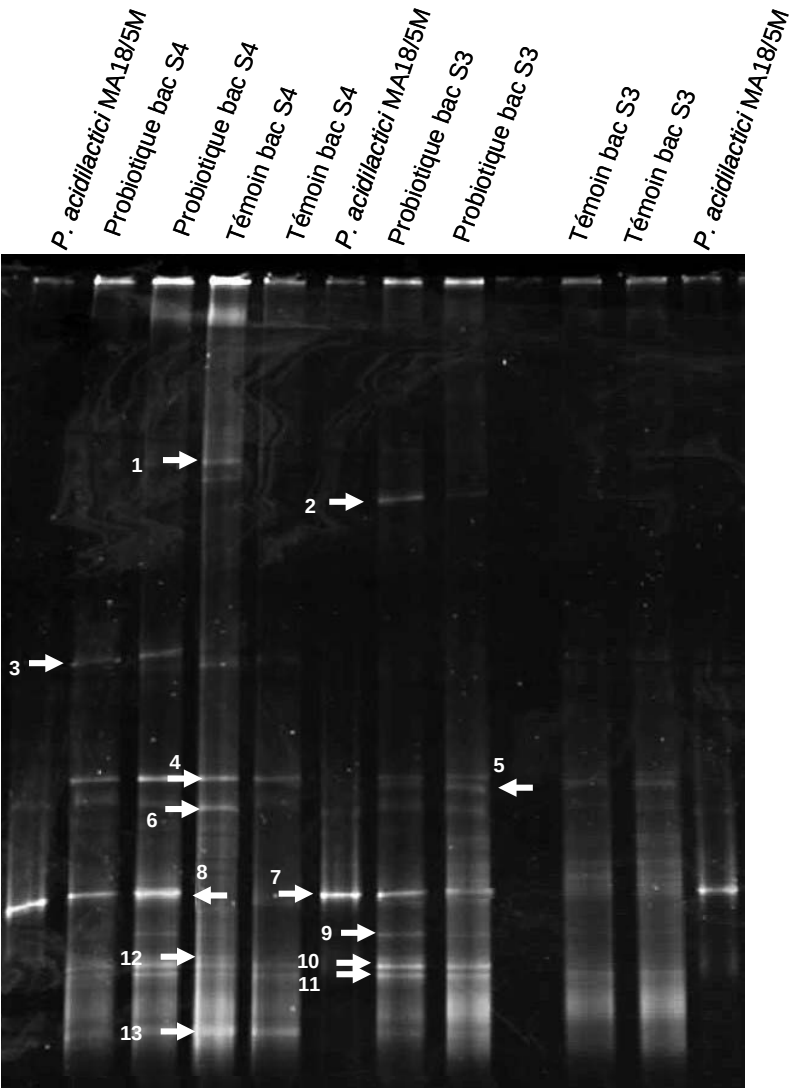


**Figure 3.13.** Exemple de profil des communautés bactériennes du tube digestif de crevettes obtenu après PCR-DGGE (gradient dénaturant 40\_80%) sur les échantillons obtenus dans les cages flottantes.

**Figure 3.14.** Profil des communautés bactériennes du tube digestif de *L. stylriostris* obtenu par PCR-DGGE (gradient dénaturant 40-80%) après trois et quatre semaines d'élevage en bacs expérimentaux. Les bandes repérées par des flèches ont été séquencées et les séquences analysées par la méthode des plus proches voisin. Le tableau associé présente les séquences les plus proches déterminées par BLAST.

| Numéro de la bande | ID     | Plus proche voisin                              | Origine                                                 | Numéro d'accès du plus proche voisin |
|--------------------|--------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1                  | MC1    | uncultured bacterium                            | environmental sample fom plant                          | EU290424                             |
| 2                  | MC2, 3 | uncultured bacterium                            | environmental sample fom plant                          | EU290425                             |
| 3                  | MC 4   | (organism Haslea crucigera)                     | Chloroplastes de diatomées                              | AF514849                             |
| 4                  | MC 9   | unidentified bacteria                           |                                                         |                                      |
| 5                  | MC11   | Uncultured Agarivorans sp.                      | Envionmental samples                                    | DQ647161                             |
|                    | MC10   | Pseudoalteromonas sp strain PKP                 | marine bacteria from tropical water                     | EF491995                             |
| 6                  | MC8    | Pseudoalteromonas spongiae strain UST010723-006 | from sponge samples                                     | AY769918                             |
| 7                  | MC31   | Pediococcus acidilactici strain BFE 8262        | Lactic Acid bacteria associated with cocoa fermentation | EU147316                             |
| 8                  | MC29   | Pediococcus acidilactici strain BFE 8262        |                                                         | EU147316                             |
| 9                  | MC26   | Rhodobacteraceae bacterium 2.3.053HS1           | Healthy coral in subtropical Australia                  | EU267669                             |
| 10                 | MC16   | Colwelliaceae bacterium strain 04OKA-12-54      | Marine fluids                                           | AB373956                             |
| 11                 | MC19   | Sphingomonas oligophenolica strain WR95         | rhizosphere soil                                        | AB365794                             |
| 12                 | MC21   | Vibrio fortis LMG 21557                         | Shrimp rearing tanks                                    | EU419926                             |
| 13                 | MC23   | Vibrio parahaemolyticus strain CM11             | Coral                                                   | EU660325                             |



Ainsi, nous avons obtenu des produits de PCR utilisables en DGGE uniquement pour les échantillons de crevettes provenant des élevages en bacs. Les analyses de ces échantillons indiquent une faible diversité de la flore intestinale des crevettes (Figure 3.14), caractérisée par la présence d'une dizaine de bandes sur les gels d'acrylamides. Ces résultats sont en accord avec ceux de Li *et al.* (2007) et de Johnson *et al.* (2008) chez *L. vannamei*. De façon intéressante, Johnson *et al.* (2008) montrèrent une bien plus grande diversité bactérienne dans le milieu d'élevage que dans le tube digestif de l'animal. Les séquences d'ADN obtenues à partir des bandes excisées sur les gels indiquent que la flore intestinale était constituée de bactéries appartenant aux Alphaprotéobactéria (*Caulobacter*, *Rhodobacter*, *Sphingomonas*) et aux Gammaprotéobacteria (*Ferrimonas*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*) ainsi que des microalgues (Figure 3.15). Ces résultats corroborent une fois de plus les deux travaux réalisés avec *L. vannamei*, cités précédemment.

Chez les animaux traités au probiotique, une bande migrant à la même hauteur que la bande correspondant à *P. acidilactici* a été systématiquement retrouvée. L'analyse des séquences a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de l'espèce *P. acidilactici*. Par ailleurs, les résultats de l'analyse montrent une faible influence du probiotique sur la composition de la flore intestinale. Cependant, une bande ayant une séquence proche de *Rhodobacter* sp. a été systématiquement retrouvée uniquement sur les profils du traitement probiotique. Or une souche de *Rhodobacter* sp. a récemment montré des effets bénéfiques sur la croissance et la digestion chez *L. vannamei* (Wang *et al.*, 2007). Enfin, une bactérie correspondant à l'espèce *V. parahaemolyticus* est apparue uniquement chez les animaux témoins à la quatrième semaine d'élevage.

En conclusion, les faibles différences entre les animaux témoins et traités au probiotique ne permettent pas, à ce stade de la recherche, de conclure quant à un effet significatif du traitement probiotique sur la composition de la flore intestinale de l'hôte.

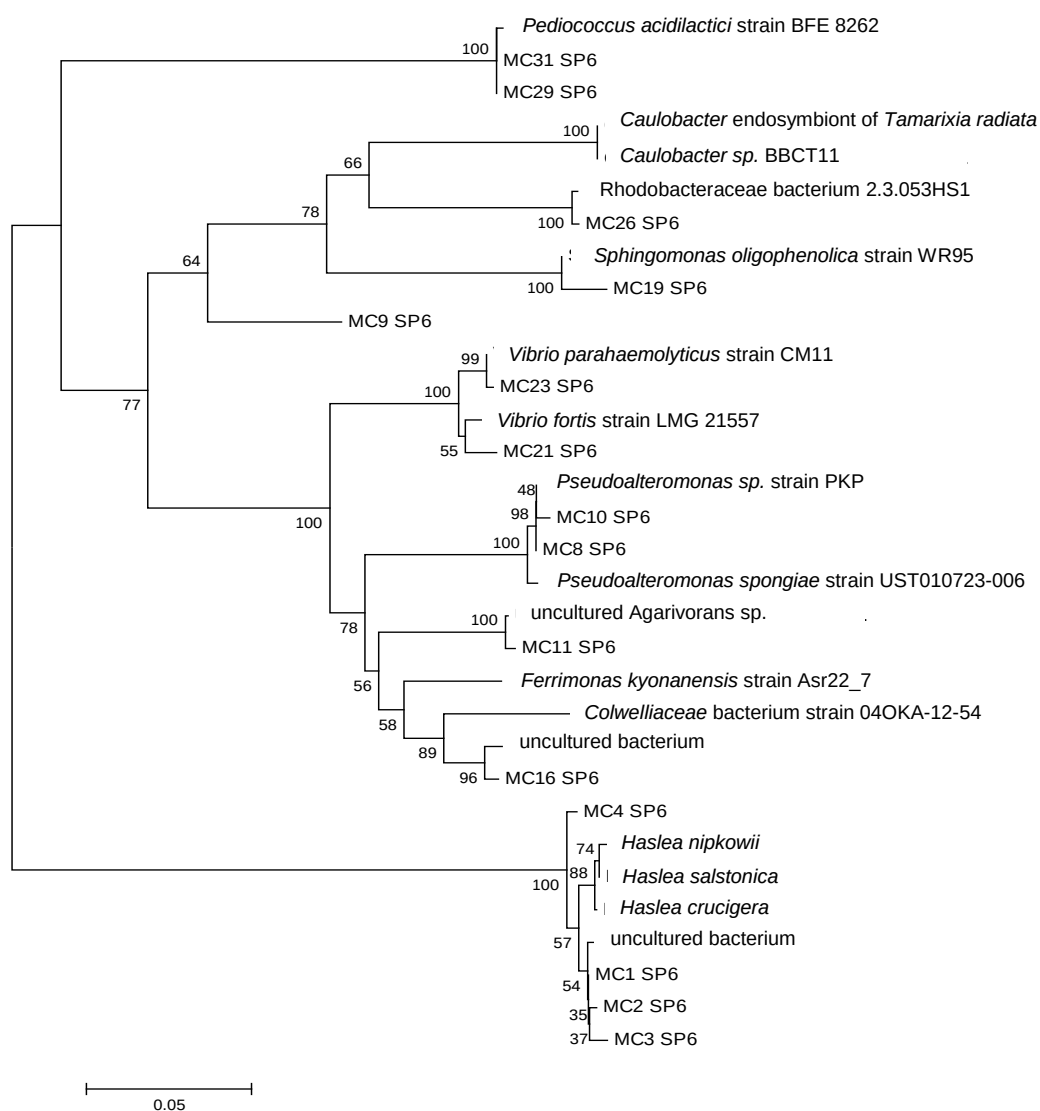


**Figure 3.15** Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse des séquences de l'ADNr 16S des bandes excisées sur gel d'électrophorèse (Méthode des plus proches voisins avec 500 bootstrap replicates)



## CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons réalisé un ensemble d'expériences préalables à l'évaluation des effets du probiotique sur l'animal. Ces études nous ont ainsi permis de déterminer les modalités d'administration du probiotique, à savoir une incorporation dans l'aliment à une concentration de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> (soit 1g.de Bactocell® par kg d'aliment) et une distribution à l'animal 4 fois par jour. Ce protocole d'administration a donc été utilisé pour toutes les études en laboratoire effectuées dans le cadre de cette thèse.

Au cours de ce travail préliminaire, nous avons également montré que *P. acidilactici* transite dans le tractus alimentaire sans parvenir à s'y implanter. Bien que sa survie au passage de la glande digestive et de l'estomac n'ait pas été déterminée, une concentration comprise entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> est généralement retrouvée plusieurs heures après le repas, indiquant une certaine viabilité de la souche. L'analyse biomoléculaire a de plus confirmé sa présence au sein du tractus intestinal de la crevette.

*P. acidilactici* se retrouve généralement à une concentration relativement faible par rapport au reste de la flore intestinale. Cependant sa présence régulière dans le tractus digestif des crevettes pourrait influencer la microflore d'autant plus que, comme nous le montrons, cette dernière serait peu diversifiée. En effet, des interactions microbiennes dans le chyme pourraient être déterminantes pour la colonisation des parois intestinales par la microflore autochtone comme cela a été postulé chez d'autres animaux aquatiques (Aubin *et al.*, 2005a). Ce postulat semble être confirmé ici par la diminution significative, chez les animaux nourris avec le probiotique, de la concentration bactérienne de la flore intestinale totale et vibrionacée, indiquant une certaine activité anti-bactérienne de *P. acidilactici*. Ainsi que nous l'avons discuté dans l'article 1, un effet de compétition-exclusion de la souche probiotique peut être supposé. Cependant, notre étude à l'aide de la DGGE n'a pas permis de conclure si cet effet d'antagonisme se traduisait également par une modification des communautés bactériennes intestinales. Il serait néanmoins souhaitable d'approfondir ce travail de caractérisation de la flore intestinale à l'aide de techniques de biologie moléculaire *ad hoc* afin (1) de démontrer que la souche probiotique a bien une activité au sein du tractus intestinal



et (2) de déterminer si *P. acidilactici* peut influencer durablement la flore intestinale des crevettes.

Dans les chapitres suivants, nous présenterons les résultats relatifs à l'évaluation des effets du probiotique, administré selon le protocole issu des présents travaux, sur la croissance, la nutrition, puis la résistance de *L. stylirostris* à une infection bactérienne.

---

**Deuxième chapitre :**

**Effet du probiotique *P.acidilactici* sur la croissance  
et la nutrition de la crevette  
*L. stylirostris***

---



## INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le probiotique *P. acidilactici* semble être majoritairement associé au bol alimentaire. De plus, une première étude (Article 1) avait montré qu'il améliorait la croissance et le taux de conversion de l'aliment. Ces premiers résultats et l'étude bibliographique présentée précédemment nous ont donc conduit à postuler que *Pediococcus acidilactici* pourrait avoir un effet nutritionnel chez les crevettes *via* une amélioration de l'utilisation de l'aliment ou *via* la production de substances favorables à leur nutrition et à leur croissance (Bairagi, 2002 ; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006 ; Doeschate et Coyne, 2008). Ainsi, nous avons entrepris d'étudier spécifiquement les effets de *P. acidilactici* sur la croissance, l'utilisation de l'aliment, et certains paramètres physiologiques relatifs à la nutrition de la crevette *L. stylirostris*.

Dans la plupart des travaux réalisés visant à évaluer les effets d'additifs alimentaires chez la crevette, les animaux sont nourris *ad libitum*. Dans ces conditions il est difficile, à moins de mesurer précisément l'aliment en excès, de connaître l'ingéré. Or ce paramètre est essentiel afin de déterminer les effets d'additifs sur l'utilisation de l'aliment et sur les besoins nutritionnels quantitatifs des animaux. Nous avons évité cette difficulté en adaptant, à la crevette, la méthode croissance-ration définie pour les poissons par Brett *et al.* (1979) (Article 2). Ce procédé permet notamment d'obtenir une mesure précise de l'ingéré pour des rations inférieures à la ration *ad libitum*, et de mesurer les besoins alimentaires des animaux pour l'entretien et la croissance optimale.

Cette méthode a donc été utilisée, couplée à des analyses biochimiques dans la glande digestive, à l'évaluation chez *L. stylirostris* de l'effet du probiotique sur la croissance et l'utilisation de l'aliment (Article 3). Dans cette étude, soulignons que nous avons raisonné à dose constante de probiotique apporté à l'animal quelle que soit la quantité d'aliment consommée ( $4.10^8$  UFC.jour<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> d'animal). En effet, des travaux préliminaires (non présentés dans cette thèse) indiquaient que la quantité de probiotique ingérée, et non pas sa concentration dans l'aliment, était déterminante quant à ses effets sur la croissance des crevettes.



**Article 2: Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* by using individual measurements and nested design<sup>1</sup>**

Liet Chim<sup>a\*</sup>, Mathieu Castex<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Jean-Charles Massabuau<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IFREMER, Département Aquaculture en Calédonie, B.P. 2059, 98846 Nouméa cedex,  
New Caledonia

<sup>b</sup>Université Bordeaux 1 and CNRS, Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, UMR 5805., Place du Dr B. Peyneau, 33120 Arcachon, France

\*Corresponding author. Tel : +687 35 25 74 ; fax : +687 35 11 77

Running title: Growth-ration curve with shrimp *Litopenaeus stylirostris*

Key words: Shrimp, growth, ration size, feed efficiency, individual measurement, nested design.

---

<sup>1</sup> Soumis dans « Aquaculture Nutrition »

## Abstract

We determined a Growth-Ration relation (G-R relation) for sub-adult penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In a first step, we used individual measurement and nested design in order to assess statistically the effect of the ration size on growth and to determine a continuous mixed model between the respective growth rate (RGR) and the ration size ( $RGR = -0.047R^2 + 0.554R - 0.660$ ). In a second step, as individual feed consumption is not measurable with group-reared shrimp, we considered a G-R relation that links the ration size to the mean relative growth rate per tank ( $RGR = -0.052x^2 + 0.598x - 0.698$ ;  $R^2 = 0.98$ ). From this G-R curve, we determined the ration size that was required for maintenance ( $R_m = 253.8 \text{ kJ.kg}^{-1}\text{shrimp.day}^{-1}$ ) and for optimal growth ( $R_{opt} = 706.8 \text{ kJ.kg}^{-1}\text{shrimp.day}^{-1}$ ), the scope for growth (SFG =  $303.5 \text{ kJ.kg}^{-1}\text{shrimp.day}^{-1}$ ), and the maximum conversion efficiency K1 and K2 ( $K1_{max} = 21.6 \%$ ;  $K2_{max} = 61 \%$ ). These data allowed us to draw up a partial energy budget based on an accurate estimate of the feed intake.

Finally, we further discuss the advantage of using a continuous mixed model to assess the effect of dietary treatments or environmental parameters and the use of the G-R relation in order to determine quantitative nutritional requirements.

## Introduction

At an early stage, studies on growth and nutrition of fishes were carried out to investigate the relationship between growth and ration size (G-R relation) (Thompson, 1941). Since then a large number of studies with several fish species have been based on this approach. Its main concern is to determine the quantitative daily nutritional and energy requirements for maintenance and growth (optimal and maximal) of the animals and to study the impact of environmental factors (Elliott, 1975; Staples and Nomura; 1976; Brett, 1979; Brett and Groves, 1979; Malloy and Targett, 1994 ; Gatlin *et al.*, 1986; McGoogan and Gatlin, 1998; Lupatsch *et al.*, 2003; Ozório *et al.*, 2008).

Surprisingly, this fundamental G-R relation has rarely been applied in studies on shrimp growth and nutrition, and quantitative requirements are generally not determined for penaeid shrimps. Sedgwick (1979) Wabete *et al.* (2006), and Chim *et al.* (2006) based their studies on the G-R relation to determine the effect of feeding frequency and natural productivity of the pond on growth and food efficiency of *Penaeus merguensis* and *L. stylirostris*. Kureshy and Davis (2002) used this same approach to estimate the daily quantitative protein requirements of juvenile *Litopenaeus vannamei*. However, most studies have evaluated the effect of variation in dietary nutrients level in the feed, such as protein (Colvin and Brand, 1977; Velasco *et al.*, 2001; Aranyakananda and Lawrence, 1993; Cousin *et al.*, 1993; Gauquelin *et al.*, 2007), on growth and feed conversion. Indeed, as mentioned by Krureshy and Davis (2002), research on protein requirements of penaeid shrimp has been largely concerned with evaluations of optimal dietary protein level and not with the quantitative protein requirement, since *ad libitum* feeding is generally used. The use of the G-R relation and the quantification of the daily requirements obtained from it could provide useful information to maximize penaeid shrimp production (Krureshy and Davis, 2002). Moreover, this method could be used to evaluate and optimize the use of dietary additives.

In addition, in many studies on crustaceans, a nutrition tank is generally used as the experimental unit and simple analysis of variance is applied to the tank means data. However, Ruohonen (1998) pointed out the advantage of using individual measurements and nested designs in aquaculture experiments. In order to analyze



such designs without pseudoreplication (Hurlbert, 1984), nested analysis of variance is the correct method to use (Sokal and Rohlf, 1995). Nested ANOVA maintains both between-tank and within-tank variability in the analysis, and therefore reduces the risk of drawing invalid conclusions as can happen when using simple analysis of variance (Ling and Cotter, 2003). New techniques and methods are now available for measuring several variables at the individual level, as mentioned by Ruohonen (1998) for fish. Individual tagging of the animals is one of these (Jobling and Koskel, 1996); however, its use for individual shrimp growth measurements is not documented.

The present study used sub-adult shrimps *L. stylirostris* to determine (i) a continuous growth-ration model using individual measurements in order to come up with a method for assessing the effect of nutritional or environmental factors on the growth-ration response, and (ii) the fundamental nutritional parameters (maintenance and optimal ration size, scope for growth, K1 and K2) from the growth-ration relation based on tank means data (Brett, 1979).

## **Materials and Methods**

### **1. Shrimps**

The sub-adult shrimps (initial mean body weight =  $16.92 \pm 0.22$  g) *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) were reared in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) for four months, starting at 20-day post-larvae (PL 20), and stocked at a density of 20 PL per m<sup>2</sup>. The shrimp were reared according to standard semi-intensive farming practices in New Caledonia until they reached the desired size: shrimp were fed twice a day with a commercial formulated feed. The feeding rate was adjusted weekly according to the estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding.

### **2. Rearing system**

The trial was carried out in circular polyester tanks (diameter, 118.5 cm; height, 69 cm; surface area at the bottom, 92 cm<sup>2</sup>; capacity, 536 litres) supplied with continuously-flowing seawater from the lagoon on the west coast of New Caledonia (Latitude 21°55' S, Longitude 166° 05' E ). The seawater was stored in an earthen reservoir built at 8 metres above sea level and fed by gravity into the tanks, after

passing through a sand filter. The water renewal rate in the tanks was 400% per day. Aeration was delivered by high pressure air. The temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset).

### 3. Feed

The experimental feed composition is shown in table 1. Feed was processed at the laboratory as follows: the ingredients were ground up in a laboratory grinder (Retsch®) with a 1 mm screen. The meal obtained was mixed with oil and water (30%) in a horizontal mixer (Mainca®) until the consistency was such that it could be pelleted. The mixture was then extruded in a meat grinder through a 3 mm die. The strands of feed were dried at 60°C for 24 h in a drying oven (Venticell® 222) until the residual moisture content was less than 10% and then they were broken up into pellets of 4 to 5 mm in length.

The energy content of the feed was calculated using physiological fuel values of 18.8, 14.6 and 35.5 kJ.g<sup>-1</sup> for protein, carbohydrate and fat respectively (Jauncey, 1982).

**Table 1:** Experimental feed composition: ingredients as feed basis and proximal composition on dry matter basis.

| Ingredients                                | %    | Nutrients                                  | n | Mean (%) | Std. Err. |
|--------------------------------------------|------|--------------------------------------------|---|----------|-----------|
| LT fish meal <sup>(a)</sup>                | 30   | Protein <sup>(h)</sup>                     | 5 | 43.8     | 0.2       |
| Soybean meal <sup>(b)</sup>                | 20   | Fat <sup>(i)</sup>                         | 5 | 10.0     | 0.3       |
| Wheat meal <sup>(c)</sup>                  | 37   | Fiber <sup>(j)</sup>                       | 5 | 2.0      | 0.3       |
| Wheat gluten                               | 7    | Ash <sup>(k)</sup>                         | 5 | 5.0      | 0.1       |
| Fish oil                                   | 2    |                                            |   |          |           |
| Soy oil                                    | 2    | GE <sup>(l)</sup> (kcal.kg <sup>-1</sup> ) |   | 4502     |           |
| Soy lecithin <sup>(d)</sup>                | 2    |                                            |   |          |           |
| Shrimp vitamin premix <sup>(e)</sup>       | 0.05 |                                            |   |          |           |
| shrimp trace mineral premix <sup>(f)</sup> | 0.10 |                                            |   |          |           |
| Stay C (330mg vit C/kg) <sup>(g)</sup>     | 0.04 |                                            |   |          |           |

<sup>(a)</sup> Chilean low temperature fishmeal from anchovy or Jack Marckerel

<sup>(b)</sup> Dehulled soybean meal solvent extracted

<sup>(c)</sup> Whole wheat gran for animal feed

<sup>(d)</sup> Ultralec® lecithin from ADM lecithin, Decatur, IL, USA.

<sup>(e)</sup> Vitamin premix from SICA Cie (Goodman Fielder)

<sup>(f)</sup> Mineral premix from SICA Cie (Goodman Fielder)

<sup>(g)</sup> Rovimix® Stay-C® 35 from DSM nutritional products Ltd

<sup>(h)</sup> ISO5983 standard

<sup>(i)</sup> NF V18-117/B standard

<sup>(j)</sup> NF VO3-040 standard

<sup>(k)</sup> NF V18-101 standard

<sup>(l)</sup> Gross Energy, sum of individual ingredient energy content

#### **4. Experimental design**

The shrimps were caught from the ponds using a cast net and transferred to the experimental tanks in 50 L plastic containers filled with seawater. Following the transfer, the shrimps were acclimated to the experimental conditions in tanks for one week prior to individual weighing and tagging. Weighing was carried out after carefully drying them in soft paper. The shrimps were tagged using sub-cuticle injection of a coloured elastomer (NMT ELASTOMER SYSTEM, Norwest Marine Technology, Shaw Island, Washington, 98286) within the dorsal region of the abdomen (Fig. 1). It was possible to distinguish 15 animals using 5 colours injected at 5 different positions of the abdomen. Fifteen tagged shrimps were randomly assigned to each tank. Then three tanks were randomly assigned to each treatment. The treatments were five different feeding rates per day (0.5%, 1%, 2%, 4%, 8%), expressed as a percentage of the shrimp initial biomass (% iBM) and determined for each tank. The daily pre-weighed rations for each tank were delivered in two equally-sized meals distributed at 8.00 am and 3.00 pm. The trial was conducted over 21 days and individual weights of the shrimp were measured ( $\pm 0.01$  g) at the beginning and at the end of the trial after carefully drying them in soft paper.



**Figure 1:** Shrimp tagging by sub-cuticle injection of a coloured elastomer.

#### **5. Parameters calculation, data analysis and statistical methods**

Statistical analyzes used R software (R Development Core Team, 2008). Prior to analysis, all data were systematically checked for normal distribution and variance

homogeneity. The percentage survival rates were normalized using an arcsine transformation before analysis. Data on survival rates were tested using a one-way analysis of variance followed by a Student's multiple comparison test to determine differences among ration sizes.

### **5.1. Ration size effect on growth**

Prior to starting the experiment, historical data on the variability of mean growth rates of shrimp grown in these outdoor tanks was analyzed to ensure that there was sufficient replication to provide adequate statistical power (80%) in the experimental design.

The relative daily growth rate (RGR) was expressed as a percentage of the initial body weight and calculated using the following equation:  $RGR = 100 * (fBW - iBW) / (d * iBW)$ , where iBW and fBW are the initial and final body weight respectively and d is the number of days between the measurements. For each ration size tested, RGR was measured at individual level (using individual iBW and fBW). Then data were analyzed with a nested analysis of variance including the effect of the ration size as fixed effect, and the effect of the tank nested into the ration size as random effect. The model used to analyze data from this hierarchical design was:  $Y_{ikn} = \mu + \alpha_i + B_{k(i)} + \varepsilon_{n(ik)}$

with k replicate tanks per ration sizes, n individuals within each tank, and ikn measurements on individuals, where  $\mu$  is the overall mean,  $\alpha_i$  the fixed effect of ration ( $i = 1-5$ ), and B is the effect of tank nested within each ration size, and  $\varepsilon_{n(ik)}$  is the random residual error. Consequently, the analyzed variable corresponded to the means of measurements carried out per experimental unit (the tank), adjusted by effects of other factors (Type III error Sum of Squares). The analysis of variance model being mixed, the ration size effect was tested from a test of hypothesis using the random effect [tank (ration size)] as error term. Finally, significant Nested ANOVAs were followed by a Student-Newman-Keuls test to determine the differences between ration sizes means.

### **5.2. Determination of the growth-ration response model**

We also determined a linear growth-ration response model which links the growth response (RGR) to the ration size. For this purpose, we used the individual RGR values and the ration size was considered, in this case, as a continuous variable. A

continuous mixed model was determined with R software (lme4 package). Using individual measurements allows the variability, i.e. the "random" part of the model, to be modelled. On this occasion, we specified a random tank effect without including hierarchical structure, as the variance between tanks was not affected by the ration size.

### **5.3. Determination of nutritional parameters from the growth ration curve**

Our experiment design did not allow the determination of the individual consumption of the shrimps; thus we cannot obtain nutritional parameters at the individual level. However the ration delivered, when completely consumed, gives a measurement of the feed consumption of the shrimps at the tank level. Then, to determine the parameters which follow, we considered a growth ration model determined from RGR means per tank. RGR were calculated using average iBW and fBW for each tank.

A polynomial regression was calculated to fit the data within the range of the ration sizes used in this experiment (0.5% to 8%). The model describing the response was:  $y = ax^2 + bx + c$ , where  $y$  is the tank average RGR;  $x$  is the ration size;  $a$  is the slope of the curve;  $c$  is the gain at  $x=0$ . The model was determined with R and plotted with Sigmaplot® software (SPSS Inc.).

*Maintenance and optimal rations* - We determined two specific rations that were defined by Brett (1979): (i) the maintenance ration ( $R_m$ ), which is the feed intake that just maintains the animal without any change in its body weight and (ii) the optimum ration ( $R_{opt}$ ) that represents the feed intake which produces the best increase in the body weight for the least feed intake, in other words optimal growth.

*Scope for growth (SFG)* was defined by Warren and Davis (1967) as “the difference between the energy of the food an animal consumes and all other energy utilisations and losses”. Brett (1976) was able to demonstrate that the difference between any rations ingested allowing growth and the maintenance ration ( $R_m$ ) gave a simple measurement of SFG. Indeed, only the part of the feed allocation that is in excess of the  $R_m$  will be available for growth. In our study we measured the SFG as the difference between the digestible fraction of the optimal ration ( $R_{opt} \times ADC$ ) and the digestible fraction of the maintenance ration ( $R_m \times ADC$ ) according to the following equation:  $SFG = ADC \times (R_{opt} - R_m)$ , where  $ADC$  is the Apparent Digestibility Coefficient of dry matter. The  $ADC$  of dry matter of the tested diet was previously

determined by the indicator method (Pond *et al.*, 1995), where the indicator used was celite® (Diatomaceous Earth) and the nutrient was dry matter. In this study, the average ADC value for the dry matter of the tested diet was estimated at  $67\% \pm 0.66$  (SD;  $n = 6$ ) within our experimental conditions (L. Chim, unpubl. data.).

*Food conversion ratio (FCR), gross and net conversion efficiency (K1 & K2)* - These parameters were determined for each tank. FCR expresses the quantity of food required per unit of weight gain. It is calculated according to the following equation:  $FCR = \overline{FI} / ((\overline{fBW} - \overline{iBW}) * n)$ , where  $\overline{FI}$ ,  $(\overline{fBW} - \overline{iBW})$ , and  $n$  are respectively the mean feed intake, the mean absolute weight gain, and the number of shrimp per tank. The gross conversion efficiency (K1) expresses the capacity to convert food into body tissues. It was calculated according to the following formula (Brett and Groves, 1979):  $K1 = (\overline{RGR}/R) \times 100$ , where  $\overline{RGR}$ , the mean relative daily growth rate for each tank and  $R$ , the ration size per tank, are expressed in the same units (%). An easy way to obtain a K-R relation is to derive it directly from the predicted values obtained from the growth-ration model. Another way is to fit a model from the observed K1 values. The net conversion efficiency (K2) provides a measure of the capacity to convert the amount of food available for growth, which is equal to the amount of feed consumed in excess of the maintenance ration ( $R_m$ ). It was calculated as  $K2 = (\overline{RGR}/(R-R_m)) \times 100$  (Brett and Groves, 1979).

Data on nutritional parameters (tank means for K1, K2 and FCR) were compared with non-parametric tests of Mann Whitney or Kruskal–Wallis (for more than 2 groups), and followed by a Student–Newman–Keuls test for significant differences between ration size means.

## Results

Growth performances and survival rates of the shrimps according to the ration size tested are presented in Table 2. At the start of the experiment, no significant differences in the initial body weight of the shrimps were recorded between the ration sizes tested. The overall final survival rate was of  $86 \pm 13\%$  (s.d.), and there was no significant difference between groups.

Final body weights and RGR were significantly affected by the ration size level ( $p < 0.001$ ). The shrimps receiving the lower ration sizes (0.5% and 1%) lost weight.

RGR and final body weight significantly increased from 0.5% to 4% ration size, while no significant differences were found between the two higher ration sizes (4% and 8%). Nested analysis of variance indicated that the tank variance was of low relative contribution to the overall variance, resulting in a non-significant tank effect within each ration size (tank (ration size) effect) (Table 2). Finally, shrimp initial body weight did not have a significant effect on RGR and was therefore excluded from the analysis. Indeed, no particular correlation was found between these two variables whatever the ration size.

**Table 2:** Survival rate, initial and final body weights, and respective growth rate (RGR) of shrimps according to ration size.

| RS <sup>(a)</sup> | (%iBM <sup>(b)</sup> ) | tank | Survival rate (%)                     | iBW <sup>(c)</sup> (g) | fBW <sup>(d)</sup> (g)  | RGR (%iBW.d <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|------------------------|------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|                   | 0.5                    | 3    | 82±14 <sup>a</sup>                    | 17.08±0.23             | 15.82±0.26 <sup>a</sup> | -0.36±0.04 <sup>a</sup>     |
|                   | 1                      | 3    | 96±8 <sup>a</sup>                     | 16.90±0.38             | 16.59±0.70 <sup>b</sup> | -0.20±0.04 <sup>b</sup>     |
|                   | 2                      | 3    | 87±13 <sup>a</sup>                    | 16.76±0.92             | 17.90±0.78 <sup>c</sup> | 0.27±0.04 <sup>c</sup>      |
|                   | 4                      | 3    | 78±10 <sup>a</sup>                    | 16.05±1.19             | 19.30±0.54 <sup>d</sup> | 0.82±0.08 <sup>d</sup>      |
|                   | 8                      | 3    | 87±18 <sup>a</sup>                    | 16.98±0.40             | 19.68±0.41 <sup>d</sup> | 0.77±0.06 <sup>d</sup>      |
| ANOVA             |                        |      | n.s.                                  |                        |                         |                             |
| Nested ANOVA      |                        |      | $\hat{\sigma}_\beta^2$ <sup>(d)</sup> |                        | 0.007                   | 0.0002                      |
|                   |                        |      | MS <sub>error</sub> <sup>(f)</sup>    |                        | 0.41                    | 0.0333                      |
|                   |                        | P    | Tank(ration size)                     |                        | n.s                     | 0.3791                      |
|                   |                        |      | ration                                |                        | ***<0.001               | ***<0.001                   |
|                   |                        |      | iBW                                   |                        | ***<0.001               | -                           |

<sup>(a)</sup> Ration size (feed with 10% moisture)

<sup>(b)</sup> Initial biomass

<sup>(c)</sup> Initial body weight

<sup>(d)</sup> Final body weight

<sup>(e)</sup> tank variance

<sup>(f)</sup> Error mean square: (  $\hat{\sigma}_\varepsilon^2$  )

### Growth-ration response model

Figure 2 presents the individual RGR (dots) plotted as a function of the ration size. From the growth-ration-response model determined with individual measurements we obtained the coefficient estimates for the fixed and the random effects. Fixed effects were found to fit a second order polynomial regression ( $RGR = -0.047 R^2 + 0.554 R - 0.664$ ) represented in Figure 2. The coefficients estimated by the model for the fixed effects, and the standard error of estimates, are presented in Table 3. The random effects results give information as to whether unexplained variance remains after the predictor variables have been included in the model. In this case, the results indicated

that unexplained variance at the tank level (random effect) is low compared to residuals.

### Nutritional parameters determined from the growth ration curve

*Consumption of the feed at different ration sizes* - The feed consumption is a function of the temperature (Chim *et al.*, 2004). During this experiment, the average temperature was  $27.2 \pm 0.6$  °C and the shrimp consumed all the feed given to them in the treatments where the rations were 4 % iBM.day<sup>-1</sup> or less. A ration size of 8 % iBM.day<sup>-1</sup> resulted in a portion of the daily ration being left uneaten. As the leftovers were not determined, FCR, K1 and K2 for tanks receiving the 8% ration size were apparent values and were not used for statistical comparisons.

**Table 3.** Estimated coefficients of the growth ration response model

| Fixed effect             | RGR         |                    |         |
|--------------------------|-------------|--------------------|---------|
|                          | Coefficient | SE                 | p-value |
| intercept                | -0,6603     | 0,0347             | <0.001  |
| Tank level fixed effects |             |                    |         |
| ration size              | 0,5543      | 0,0244             | <0.001  |
| ration size <sup>2</sup> | -0,0468     | 0,0028             | <0.001  |
| Random effect            | SD          | Variance component |         |
| Residuals                | 0.1825      | 0.0333             |         |
| Tank level               | 0.0249      | 0.0006             |         |

<sup>(a)</sup>  $y=ax^2+bx+c$ , where y is the RGR; x is the ration size level; a is the slope of the curve; c is the RGR at x=0.

<sup>(b)</sup> Estimated tank variance

<sup>(c)</sup> Error mean square: ( $\sigma^2$ )

*Growth according to the ration size* – At the tank level, the growth-ration relation (G-R relation), which links RGR to the ration (R), was found to fit a second order polynomial regression within the range of the ration size tested ((1):  $y = -0.052x^2+0.598x-0.698$ ,  $R^2=0.98$ ). Figure 3A represents the curve and the associated 95% confidence interval.

*Gross conversion efficiency (K1)* – The K1 means values (n=3) were negative for 0.5% and 1% iBW.d<sup>-1</sup> and were positive for the rations equal or greater than 2%



iBW.d<sup>-1</sup> (Table 4.). We obtained the K-curve from the predicted values of the G-R relation (Fig. 3B). The equation of the K-curve is then (2):  $y = -0.052 + 0.598x - 0.698x^2$ . From this curve we determined the maximum predicted K1 value as 21.7%.

*Net conversion efficiency (K2)* – K2 values were not calculated for the ration size of 0.5% and 1%, as the mean relative growth rates were negative for these treatments. Moreover, K2 was significantly higher at the ration size of 2% compared to 4% (Table 4).

From the G-R relation and/or the K-R relation, we can determined by calculation (or graphically from the curves) the daily rations for maintenance (R<sub>m</sub>) and for optimal growth (R<sub>opt</sub>). Daily R<sub>m</sub> corresponds to the ration for which the RGR and the K1 were null (Fig. 3A & 3B). It can be also obtained by solving equation (1) when x is null. R<sub>opt</sub> is the daily ration that gives maximum yield and is identifiable on the G-R curve as the ration for which the tangent crosses the origin (Fig. 3A). R<sub>opt</sub> is also determined as the ration for which the K-R curve reaches its maximum (Fig. 3B). In other words, it corresponds to the value of x when the first order derivative of equation (2) is null (i.e. when dK/dR=0). The values obtained by calculation were R<sub>m</sub> = 1.32% iBW.d<sup>-1</sup> (daily maintenance requirement) and R<sub>opt</sub> = 3.66% iBW.d<sup>-1</sup>.

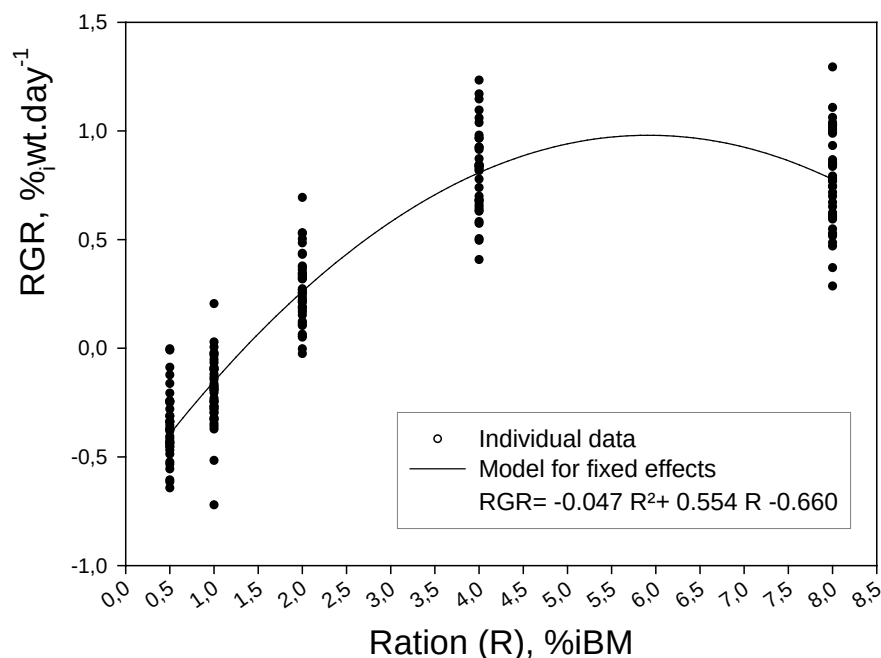


**Figure 2:** Changes in RGR with ration size (%). Dots represent the observed individual data. The line plot the equation of the fixed effect obtained by the linear mixed model:  $y = a R^2 + b R + c$  where  $y = \text{RGR}$ ,  $R = \text{ration size}$ , and  $a$ ,  $b$ ,  $c$  are the estimated coefficients for fixed effects determined by the model.  $\text{RGR} = 0.660 R^2 + 0.554 R - 0.047$ .

**Table 4.** Second trial: Mean values of Feed conversion ration (FCR), gross conversion efficiency (K1) and net conversion efficiency (K2) according to the ration size.

| RS <sup>(1)</sup> | (‰iBW) | FCR                  |                     | K1 <sup>(4)</sup> (%) |                     | K2 <sup>(5)</sup> (%) |                     |
|-------------------|--------|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
|                   |        | Mean                 | S.D. <sup>(3)</sup> | Mean                  | S.D. <sup>(3)</sup> | Mean                  | S.D. <sup>(3)</sup> |
| 0.5               |        | n.c.                 | n.c.                | -72.37 <sup>a</sup>   | 7.36                | n.c.                  | n.c.                |
| 1                 |        | n.c.                 | n.c.                | -25.09 <sup>b</sup>   | 5.85                | n.c.                  | n.c.                |
| 2                 |        | 4,11                 | 0,72                | 13.48 <sup>c</sup>    | 1.99                | 41.47                 | 6.13                |
| 4                 |        | 2,69                 | 0,3                 | 20.65 <sup>d</sup>    | 2.19                | 31.17                 | 3.31                |
| Significance      |        | *P<0.05 <sup>§</sup> |                     | **P<0.01 <sup>Φ</sup> |                     | *P<0.05 <sup>§</sup>  |                     |

Different superscript letters within the same line indicate significant differences among treatments.

<sup>(1)</sup> Ration size as % of initial body weight (feed with 10% moisture)

<sup>(3)</sup> Standard Deviation (n=3)

<sup>(4)</sup> Gross conversion efficiency

<sup>(5)</sup> Net conversion efficiency

<sup>§</sup> Mann-Whitney test

<sup>Φ</sup> Kruskal-Wallis test

**Table 5:** Daily feed intake and digested feed for maintenance and optimal growth (R<sub>m</sub>, R<sub>opt</sub>), daily weight gain (GR), feed conversion ratio (FCR) and gross conversion efficiency (K1), based on 1kg of sub-adult shrimp.

|                                      | Feed intake<br>(kg <sup>-1</sup> BM.day <sup>-1</sup> . <sup>(b)</sup> ) |       | Digested feed<br>(kg <sup>-1</sup> BM.day <sup>-1</sup> . <sup>(b)</sup> ) |       | GR <sup>(d)</sup><br>(g.kg <sup>-1</sup> BM.day <sup>-1</sup> . <sup>(b)</sup> ) | FCR <sup>(e)</sup> | K <sub>1</sub> <sup>(g)</sup><br>(%) |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
|                                      | g                                                                        | kJ    | g                                                                          | kJ    |                                                                                  |                    |                                      |
| Optimal ration (R <sub>opt</sub> )   | 36.6                                                                     | 688.1 | 24.5                                                                       | 461.1 | 7.9±0.8                                                                          | 4.6±0.5            | 21.6±2.4                             |
| Maintenance ration (R <sub>m</sub> ) | 13.2                                                                     | 248.2 | 8.8                                                                        | 166,3 |                                                                                  |                    |                                      |
| SFG <sup>(a)</sup>                   |                                                                          |       | 15.7                                                                       | 295   |                                                                                  |                    |                                      |
| SFG/Feed intake                      | 42.9%                                                                    |       |                                                                            |       |                                                                                  |                    |                                      |

<sup>(a)</sup> Scope for growth = digested feed at optimal ration - digested feed at maintenance ration

<sup>(b)</sup> BM = Shrimp Biomass

<sup>(c)</sup> Gross energy of the diet (18,8 kJ.g<sup>-1</sup>)

<sup>(d)</sup> Predicted optimal growth rate

<sup>(e)</sup> Feed Conversion Ratio

<sup>(g)</sup> Gross Conversion Efficiency

These rations were entirely consumed by the shrimps and represent an accurate measurement of the feed intake at the tank level. From the G-R relation, we can also estimate the RGR for a given ration. Hence the predicted optimal RGR obtained from  $R_{opt}$  was  $0.80 \pm 0.08\%$  iBW.day<sup>-1</sup> (predicted value  $\pm$  95% confident interval). The scope for growth (SFG) calculated by the difference between digested  $R_{opt}$  (2.45%) and digested  $R_m$  (0.88%) was 1.57% iBW.day<sup>-1</sup>.

Daily  $R_{opt}$ ,  $R_m$  and SFG can be also expressed in terms of the ingested feed dry weight or energy equivalent (kJ) for a biomass of 1kg of shrimp. This is presented in Table 5 with the ratio SFG/feed intake, which gives the proportion of the ingested feed allocated for growth, the daily growth rate, the FCR and K1 for 1kg of fresh shrimp.

## Discussion

In this study, we were able to determine the individual growth of the shrimps through individual tagging with coloured elastomer. This type of tagging is currently used in genetics studies carried out in our laboratory to distinguish the various families of *Litopenaeus stylirostris* (Goyard *et al.*, 2002). The tags can be inserted into small animals, from 1 g. Kneib and Huggler (2001) studied the effect of coded wire tags on survival and growth of juvenile *Litopenaeus setiferus* with the aim of determining the optimum location for the tag in the shrimp, as prerequisites for the design of a field mark-recapture study. Additionally, in a preliminary unpublished study we showed that there was no position effect of the tag on growth and survival of the shrimp *L. stylirostris*.

### Why were individual measurements used?

In most aquaculture studies, the animals are generally group reared (in aquaria, tanks, cages, pens, etc). In the case of shrimps, growth rate is generally calculated by using mean weight per tank; however, it is common to observe high variability in the initial weight of the shrimps available for experimental studies, especially when juveniles or sub-adult animals are used, as is the case in this study. Then, in order to increase precision in the determination of the growth per tank, selection of animals from a similar initial weight is generally applied. As mentioned by Ruohonen (1998), new

techniques and methods have made it possible to measure several variables at the individual level, such as final weights and growth rate. Individual tagging is one of these, and we showed in this study that it can be applied for growth studies with penaeid shrimps.

The first obvious advantage of using individual tagging is to get a more precise determination of the growth mean per tank. Another positive aspect is the avoidance of bias in the calculation of the average growth per tank when mortalities occur in the tanks (Ruohonen, 1998), especially when the shrimps have not been previously graded. These elements are of particular concern since studies carried out on sub-adult shrimps generally use a relative low number of shrimps per tank. Indeed, this practice allows the use of smaller containers (tanks or aquaria), easier management of such containers during the trial and a higher precision in the determination of food consumption, observation of the animals, recovering of dead animal, collection of faeces, etc.

The third advantage is that using replicate tanks and individual measurements per replicate makes it possible to maintain both levels of variability in the data analysis – between- and within-tank variability – by applying a hierarchical or nested ANOVA (Ruohonen, 1998). The variations between tanks represent a random nuisance factor that should be nested within the higher hierarchical level (i.e. the treatment). Moreover, some authors have shown in studies on fish growth and feed consumption that within-tank variability should be considered when drawing conclusions from the experiments (Jobling *et al.*, 1995; Jobling and Koskela, 1996).

By using individual animals as observations we can model the variability (the "random" part of the model). Then, as mentioned by Ling and Cotter (2003), nested ANOVA is the correct method to analyze this kind of design and to avoid invalid conclusions that can arise with simple ANOVA. The use of this kind of analysis is not always applied in aquaculture (Ling and Cotter, 2003) and as far as we know, in the case of shrimp, simple ANOVA on tank means are almost always used.

Some authors previously used balanced block design where treatments were randomly assigned to tanks within blocks (Burford *et al.*, 2004). The blocking design was used to determine and account for any position effect within a tank array. In the present study, based on our experimental facilities, we chose to use individual measurement rather than block design. We then carried out nested analysis of

variance to assess ration size effect on growth data. The model allows the tank variances to be estimated, and in the present experiment we showed that there was no significant tank effect ( $P > 0.05$ ). In the absence of tank effect, Ruohonen (1998) demonstrated that when the data are balanced (for example, when no mortality occurs), results from both ANOVA and nested ANOVA led to similar conclusions. However, he showed that simple ANOVA was sensitive to differences in the number of observations in each tank, i.e. when the data set is unbalanced. This is the case when differential mortality occurs between tanks, increasing the risk of accepting a false hypothesis (type I error) when simple ANOVA is used. In our experiment, mortality was low (about 15%) and not statistically different between tanks ( $P < 0.05$ ). Thus this experiment can be viewed as an “ideal case”, in the absence of tank effect and of a poorly balanced data set. However, the general principles still remain for using the nested ANOVA, as we do not know *a priori* about the presence or absence of tank effects and the occurrence of mortalities during a trial, especially when trials are carried out over a longer period of time, thereby making such risks higher. This was particularly the case in our last study, carried out to evaluate the effect of dietary probiotic on shrimp growth (Castex *et al.*, in prep.).

Finally, individual tagging allows us to determine the G-R relation by using a continuous mixed model. Such a model will be useful in order to compare the effect of different dietary treatments or environmental factors. This method was recently used in our laboratory and was effective for evaluating the effects of feeding frequency (Wabete *et al.*, 2006), the natural food contribution of the pond (Chim *et al.*, 2006), different genetic strains of shrimps (unpublished data) and the probiotic effect on the shrimp growth response (Castex *et al.*, in prep.).

Obviously the design of the experiments depends on the size of the effect to be detected but also on the within- and between-tank variance. One should pay attention in the determination of the experimental design, based on various constraints such as statistical power (Ling and Cotter, 2003). It is obvious that in the event of suspected large tank effect, the growth ration analysis will involve the use of a large number of replicates (per treatment and per ration size within each treatment), which can be regarded as a limiting factor for this kind of study. Even if limited in shrimp studies due to the frequent use of small containers, an increase in the number of shrimp per tank could be another way to increase statistical power when nested designs are used (Ruohonen, 1998).

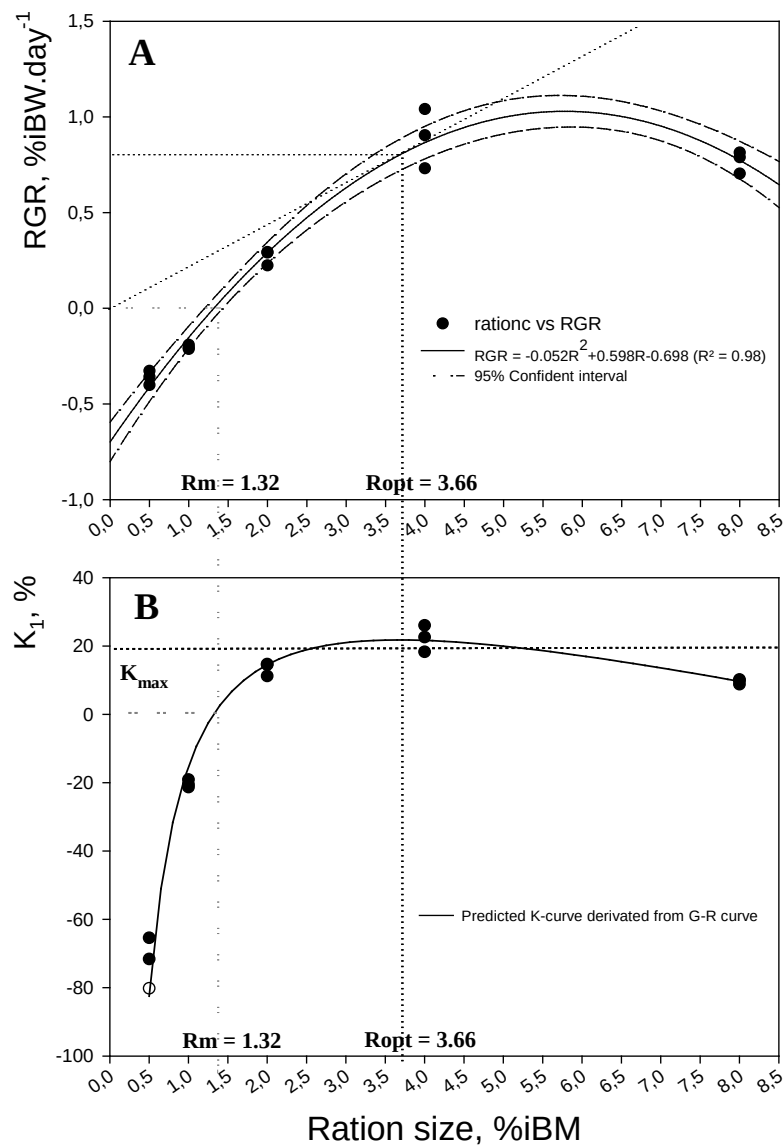


**Figure 3:** (A). Growth ration curve (G-R): Polynomial model fitting RGR (mean value for each tank) to ration size (%) with 95% confident interval (dotted line).  $RGR = -0.052 R^2 + 0.598 R - 0.698$  ( $R^2 = 0.98$ ). Larger dots represent the mean RGR for each tank. (B) Gross conversion efficiency curve (K-R) determined from the G-R curve. Larger dots represent the mean  $K_1$  for each tank.

More generally, the use of continuous mixed models could have wide applications in shrimp aquaculture studies because they allow much more flexible and complex experimental designs and increased precision in their analysis.

#### Determination of nutritional parameters from the G-R curve.

If one wants to determine nutritional parameters such as  $R_m$ ,  $R_{opt}$ ,  $K_1$  and  $K_2$ , one cannot use the G-R model obtained from individual measurements of grouped fed animals. Indeed, this would involve the determination of individual consumption of shrimps, which is impossible with this experimental design. One solution for obtaining these parameters is to consider the growth ration curve obtained from the mean RGR values per tank. Thus in our experimental conditions we determined the relation between ration size and RGR (G-R curve) and between ration size and gross conversion efficiency  $K_1$  (K-R curve). These relations are well documented for fish (Elliott, 1975; Staples and Nomura, 1976; Brett, 1979; Brett and Groves, 1979; Malloy and Targett, 1994). These fundamental G-R and K-R relations have rarely been applied in studies on shrimp growth and nutrition (Sedgwick, 1979; Kureshy and Davis, 2002; Wabete *et al.*, 2006; Chim *et al.*, 2006). Kureshy and Davis (2002) used various daily ration sizes to estimate the daily protein requirements of juvenile *Litopenaeus vannamei*. The G-R relation in *L. stylirostris* is similar in appearance to those described for some fishes (Brett, 1979; Cui and Wootton 1988; Jobling, 1994) and can be fitted to a second order polynomial regression. However, the literature is equivocal with respect to the shape of the feeding relationship of growth in marine fish with both linear (Staples and Nomura 1976, Malloy and Targett 1994) and non-linear (asymptotic) (Elliott 1975, Brett and Groves, 1979) relations.

From the G-R and the K-R curves, it is easy to determine graphically, or to calculate from the equations, the quantitative daily nutritional requirements of the shrimp for maintenance ( $R_m$ ) and optimal growth ( $R_{opt}$ ) (Brett and Groves, 1979). The maximum feed intake or the maximum ration ( $R_{max}$ ) which allows a maximum growth is more difficult to determine by using this method, as  $R_{max}$  would, in the case of this study, be between the two largest ration sizes tested: 4% iBW.d<sup>-1</sup>, which was entirely consumed by the shrimp, and 8% iBW.d<sup>-1</sup>, which was in excess. The determination of the maximum ration requires that the animals be fed *ad libitum* and that the amount of feed consumed be accurately quantified (Nunes and Parsons, 2000). To avoid this difficulty, in this study we considered only  $R_m$  and  $R_{opt}$ , which were determined from the curves G-R and K-R. These gave us a precise measurement of the amount of feed ingested, because these two rations were totally consumed. This is of particular importance as the precise quantification of feed intake is essential in any nutritional study and as this parameter is particularly difficult to measure in shrimp because of their slow-feeding behaviour.

The digestible part of  $R_m$  represents the routine metabolism of animal for spontaneous activities (feeding, moving, moulting, etc.), and reflects the metabolic rate under natural conditions. For 1 kg of shrimp, the digestible  $R_m$ , in the conditions of this study, is equal to 8.8 g of feed.d<sup>-1</sup> or 166 kJ.d<sup>-1</sup>. Those values are close to those estimated from oxygen consumption, which equals  $116 \pm 7.7$  and  $313 \pm 19.9$  kJ. d<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> shrimp for standard (resting animal) and postprandial metabolism respectively (shrimp of  $10.6 \pm 0.36$  g;  $n = 9$ , at 28°C; Wabete *et al.*, 2006). This result confirms the accuracy of the measurement of  $R_m$  from the G-R and K-R relations. However, it is important to specify that maintenance may also depend on the feeding rate of the shrimp and the diet composition to which the animals have been acclimated, as they have the ability to alter the levels of their standard metabolism and their activity in relation to the quantity and quality of food available, as it has been discussed for fishes (Fry, 1957; Richter *et al.*, 2002).

The scope for growth (SFG) estimated in our study for sub-adult *L. stylirostris* accounted for approximately 43% of the ingested optimal ration. This proportion of the ingested feed allocated to growth is consistent with the results obtained for *L. setiferus* juveniles, *Cherax destructor* and the crayfish Marron (*Cherax tenuimanus*), where the SFG represented 50% and 57.5%, respectively, of energy intake (Villarreal, 1991; Saoud and Anderson, 2004). However, it does differ from *L. vannamei* (Zhu *et al.*, 2004), *Penaeus chinensis* (Zang and Dong, 2002), and *Macrobrachium rosenbergii* (Clifford and Brick, 1979) juveniles, for which the SFG was between 15% and 33% of the energy intake. This difference may be explained by differences in the experimental conditions used in these studies, such as the development stage of the animals, temperature, and the different methods used to determine it. Usually metabolic requirements were estimated directly by measuring oxygen consumption rates and ammonia excretion. These measurements are experimentally accurate, but require the confinement of the shrimp in special apparatus which may affect the animal's response. Moreover, these measurements are usually recorded only over short periods of time (24 h to 48 h). In addition, metabolic requirements measured in these conditions may be over- or underestimated, if handling stress (Dall and Smith, 1986, Wabete, 2005) and the energy lost in exuviae (Saoud and Anderson, 2004) are not taken into consideration. In the present study, the SFG was estimated from feeding experiments (G-R and K-R curves) which covered a period of several weeks and integrated events associated with the shrimp's



metabolism (moulting cycle, feeding, growth, activity and rest), rearing factors (environmental and zootechnical factors) and shrimp population's variability.

The maximum gross conversion efficiency (K1) of sub-adult shrimp *L. stylirostris* measured in our experimental conditions is 21.6%. This value is about half of that measured in the same experimental conditions with younger *L. stylirostris* ( $7.9 \pm 0.4$  g,  $n = 150$ ;  $K1 = 40\%$ ; Wabete, 2005). In comparison, K1 values obtained from respirometer measurement for shrimp juveniles *Marsupenaeus japonicus* were around 31% and 44%. In our study, we observed a gradual decline in K1 for shrimp fed a ration size greater than the optimum ration. This phenomenon may be the result of nutrient loss and wastage when food is provided in excess. Unlike the gross conversion efficiency, the FCR obtained in this study is twice the one measured within the same conditions for juvenile shrimp ( $7.9 \pm 0.4$  g,  $n=150$ ,  $FCR = 2$ ; Wabete, 2005). The low K1 and the high FCR obtained in this study may reflect the weaker capacity of larger *L. stylirostris* shrimp to transform food in body tissues in comparison to smaller ones (Wabete, 2005).

The net conversion efficiency (K2) was higher at  $2\% \text{ iBW} \cdot \text{d}^{-1}$  and decreased at  $4\% \text{ iBW} \cdot \text{d}^{-1}$ . Shrimps seem to require less feed per unit of weight gain when the amount of feed provide is restricted (2% in this case). This observation was also made with *P. monodon* by Glencross *et al.* (1999). The maximum K2 obtained in our study (61%) is within the range of values obtained for the larval stage and juveniles of other crustaceans (Logan and Epifanio, 1978; Lemos and Phan, 2001; Sumule *et al.*, 2003).

### **Perspectives for the application of this method**

In this study, we determined a G-R model for shrimps *L. stylirostris* reared in experimental tanks. We suggest the use of a continuous mixed model to evaluate the effect of dietary treatments or environmental factors on the shrimps' growth-ration response. As we mentioned above, this model maintain both levels of variability in the data analysis – between- and within-tank variability – and will avoid invalid conclusions that can occur with simple ANOVA. In the event of a significant treatment effect being detected, it would be interesting, taking into account the considerations presented in this work, to determine the nutritional key parameters from the G-R and K-R curves, and to calculate a partial energy budget including the ingested energy, the energy for maintenance and the energy for growth allocation.

This information would provide further useful knowledge, particularly within the framework of the evaluation of feed additives as probiotics (Castex *et al.*, in prep.).

Another advantage of this G-R and K-R approach, which takes into account the feed intake, is the determination of daily quantitative requirements for nutrients and energy, as has been carried out on the shrimp *L. Vannamei* (Kureshy and Davis, 2002) and several fish species (Lupatsch *et al.*, 2003). In their study, Kureshy and Davis (2002) reported maintenance protein requirements for sub-adult *L. vannamei* in the range of 1.5-2.1g of dietary protein (DP) per kg of shrimp body weight per day. In our study, we found a higher value of 5.8 g DP. Kg BW<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> for sub-adult *L. stylirostris*. These results confirm the different feeding habits of these two species: *L. Vannamei* is a less carnivorous species than *L. Stylirostris* (Martinez-Cordova *et al.*, 2003). Nevertheless, the observed differences may also be partly due to different experimental conditions (salinity, temperature, composition of the experimental diet, etc.). Indeed, shrimp protein requirements change with dietary characteristics and biotic and abiotic factors (Guillaume, 1997). For instance, in our study we used a higher protein level (43%) compared to Kureshy and Davis (2002), who tested 16-32% protein diets.

The practical implications of this research will be to provide a simple and accurate method for simple studies designed to evaluate the effect of feed additives and/or environmental factors on the optimal feeding level and the quantitative nutritional daily requirements for growing penaeid shrimps.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr David Smith from SCIRO (Australia) for his kind advice and corrections of the manuscript. Particular thanks are due to Dr Kari Ruohonen, Professor Nigel Ling and Dr Benoit Beliaeff (IFREMER) for their advice on the statistical part of this study. The authors would also like to thank all IFREMER zootechnical staff for their assistance throughout the experiments.

## References

- Boghen, A.D.; Castell, J.D. (1979) A recirculating system for small-scale experimental work on juvenile lobsters (*Homarus americanus*). *Aquaculture*, 18(4), 383-389.
- Brett, J.R. (1976) Scope for metabolism and growth of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, and some related energetics. *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 307-313.
- Brett J.R. (1979) Environmental factors and growth. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish physiology*, Vol VIII. Academic press, New York, p 595-675.
- Brett J.R., Groves T.D.D. (1979) Physiological energetics. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish physiology*, Vol VIII. Academic press, New York, p 279-352.
- Chim, L., Galois, R., Martin, J.L.M., Lemaire, P., Wabete, N., Massabuau, J.C., Cuzon, G. (2004) Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution de l'aliment en fonction de la saison d'élevage. In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie 505 (Ed. Ifremer), Actes Colloq. 99-105.
- Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P., Della-Patrona, L., Massabuau, J.C. (2006) Growth-ration relationship in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Effect of natural food from the pond on maintenance energy requirement and scope for growth. Book of Abstract WAS Annual Meeting, 9-13 May 2006. Florence, Italy.
- Chim, L., Castex, M., Pham, D., Brun, P., Lemaire, P., Wabete, N., Schmidely, P., Mariojouis, C. (2008) Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. *Aquaculture* 279, 63-69.
- Clifford, H.C., Brick, R.W. (1979) A physiological approach to the study of growth and bioenergetics in the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Proc. World Maricul. Soc.* 10 : 701-719.
- Cui, Y., Wootton, R.J. (1988) Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus*, the effect of ration, temperature and body size on food consumption, faecal production and nitrogenous excretion. *Journal of Fish Biology* 33:431-443.
- D'Abramo, L.R., L. Reed and J.M. Heinen (1988) A culture system for nutritional studies of crustaceans. *Aquaculture* 72:379-389
- D'Abramo, L.R., Castell, J.D., (1997) Research methodology. In *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*. Ed Louis R. D'Abramo, Douglas E. Conckin, Dian M. Akiyama. World Aquaculture Society. 6:3-20.
- Dall, W., Smith, D.M. (1986) Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*. 55(1) : 23-33.
- Elliott J.M. (1975) The growth rate of brown trout (*Salmo trutta* L.) fed on reduced rations. *J Anim Ecol.* 44:823-842.
- Fry, F.E.J. (1957) The aquatic respiration of fish. In: M.E. Brown (Editor), *The Physiology of Fish*. Fvol.1. Academic Press, New York, pp. 1-63.
- Gatlin, D.M., Poe, W.E., Wilson, R.P. (1986) Protein and energy requirements of fingerling channel catfish for maintenance and maximum growth. *J. Nutr.* 116, 2121-2131.
- Glencross, B.D., Smith, D.M., Tonks, M.L., Tabrett, S.J., Williams, K.C. (1999) A reference diet for nutritional studies of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*. 5, 33-39.
- Goyard, E., Patrois, J., Peignon, J.-M., Vanana, V., Dufour, R., Viallona J., Bédier, E. (2002) Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. *Aquaculture*, 204, 461-468
- Jauncey, K. (1982) The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture*, 27 : 43-54.
- Jobling, M. (1994) *Fish bioenergetics*. Chapman and Hall, London.

- Jobling, M., Arnesen, A.M., Baardvik, B.M., Christiansen, J.S., Jørgensen, E..H. (1995) Monitoring feeding behaviour and food intake: methods and applications. *Aquacult. Nutr.* 1, 131–143.
- Jobling, M., Koskela, J. (1996) Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *J. Fish Biol.* 49, 658–667.
- Kneib, R.T. and Huggler, M.C. (2001) Tag placement, mark retention, survival and growth of juvenile white shrimp (*Litopenaeus setiferus* Perez Farfante, 1969) injected with coded wire tags. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 266, pp. 109–120.
- Koshio, S. (1985) The effects of eyestalk ablation, diets and environmental factors on growth, survival and energy utilization of juvenile american lobster, *Homarus americanus*, as applied to aquaculture. PhD Thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.
- Kureshy, N., Davis, A., (2002) Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204: 125-143.
- Lemos D, Phan V.N., (2001) Energy partitioning into growth, respiration, excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfantapenaeus paulensis*. *Aquaculture*; 199:131-143.
- Ling, N., Cotter, D. (2003) Statistical power in comparative aquaculture studies. *Aquaculture* 224, 159–168.
- Logan, D.T., Epifanio, C.E. (1978) A laboratory energy balance for the larvae and juvenile of the American lobster *Homarus americanus*. *Mar. Biol.*; 47:381-389.
- Lupatsch, I., Kissil G.W., Sklan, D. (2003) Comparison of energy and protein efficiency among three fish species gilthead sea bream (*Sparus aurata*), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and white grouper (*Epinephelus aeneus*): energy expenditure for protein and lipid deposition. *Aquaculture* 225, 175-189.
- Malloy K.D., Targett T.E. (1994) Effects of ration limitation and low temperature on growth, biochemical condition, and survival of juvenile summer flounder from two Atlantic coast nurseries. *Trans Am Fish Soc* 123:182-193
- Martinez-Cordova, L.R., Campana Torres, A., Porchas-Cornejo, M.A. (2003) Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition* 9, 155-166.
- McGoogan, B.B., Gatlin, D.M. (1998) Metabolic requirements of red drum, *Sciaenops ocellatus*, for protein and energy based on weight gain and body composition. *J. Nutr.* 128, 123-129.
- Nunes, A.J.P., Parsons G.J. (2000) Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187:133-151.
- Ozório, R.O.A., Valente, L.M.P., Correia, S., Pousão-Ferreira, P., Damasceno-Oliveira, A., Escórcio, C., Oliva-Teles, A. (2008) Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00570.x.
- Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R. (1995) *Basic Animal Nutrition and Feeding*, 4th edn. John Wiley and Sons Inc., New York 615 pp.
- R Development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Richter, H., Francis, G., Becker, K. (2002) A reassessment of the maintenance ration of red tilapia. *Aquaculture International* 10: 1-9.
- Ruohonen, K. (1998) Individual measurements and nested designs in aquaculture experiments: a simulation study. *Aquaculture* 165, 149–157.
- Saoud, I.P., Anderson, G. (2004) Using scope-for-growth estimates to compare the suitability of feeds used in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35 : 523-528.
- Searcy-Bernal, R. (1994) Statistical power and aquaculture research. *Aquaculture* 127, 371– 388.

- Sedgwick, R.W. (1979) Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* de Man. *Aquaculture*, 16 : 279-298.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York, 887 pp.
- Staples D.J., Nomura M. (1976) Influence of body size and food ration on the energy budget of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol* 9:29-43
- Sumule, O., Koshio, S., Teshima S.-I., Ishikawa M. (2003) Energy budget of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae fed highly unsaturated fatty acid-enriched and non-enriched artemia nauplii. *Fisheries science*; 69:706-715.
- Thompson, D.H. (1941) The fish production of inland streams and lakes. *Symp. Hydrobiol. Univ. Wis., Madison* 205-217.
- Villarreal, H. (1991) A partial energy budget for the Australian crayfish *Cherax tenuimanus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 22 : 252-259.
- Wabete, N.(2005) Etude écophysiologique du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Thesis presented at Université Bordeaux 1. Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
- Wabete, N., Chim L., Lemaire P., Massabuau J-C. (2006) Growth Ration relationship in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: effect of feeding frequency on maintenance energy requirement and scope for growth. Book of Abstract WAS annual meeting AQUA 2006, May 9-13. Florence, Italy.
- Warren, C.E., Davis, G.E. (1967) Laboratory studies on the feeding bioenergetics and growth of fishes. In "The biological basis of Freshwater fish production" (S.D. Gerking, ed.). pp. 175-214. Blackwell, Oxford.
- Zhang, S., Dong, S. (2002) The effects of food and salinity on energy budget of juvenile shrimp of *Penaeus chinensis*. *J. Dalian Fish. Univ.* 17 (3), 227-233.
- Zhu, C., Dong, S., Wang, F., Huang, G. (2004) Effects of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 234, 485-496.

**Article 3: Effects of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth and nutritional status in shrimp *Litopenaeus stylirostris* based on a growth-ration size approach<sup>1</sup>**

Mathieu Castex<sup>a,b\*</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Catherine Mariojouis<sup>b</sup> and Liet Chim<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98.46 Nouméa cedex, New Caledonia.

<sup>b</sup>AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, Cedex 5, France

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 84 ; fax : +687 35 11 77

E-mail address: [Mathieu.Castex@ifremer.fr](mailto:Mathieu.Castex@ifremer.fr)

Running title: *Pediococcus acidilactici* effects on *Litopenaeus stylirostris* nutrition and growth

Key words: Probiotic, *Pediococcus acidilactici*, shrimp, growth, ration size, feed efficiency, carbohydrate, antioxidant status.

---

<sup>1</sup> Soumission prévue dans « Aquaculture Nutrition »

## **Abstract**

In this study we used the growth-ration relation for juvenile penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in order to assess the effect of the dietary probiotic *Pedicococcus acidilactici* on growth and feed requirements for maintenance and optimal growth of the shrimps. The probiotic significantly enhanced the growth of the shrimps and allowed the feed requirements for maintenance and optimal growth to be reduced. Indeed the gross and net conversion efficiency (K1 & K2) were significantly higher for shrimps fed the probiotic diet. Interestingly, the determination of some physiological parameters such as free glucose, glycogen, digestive enzyme activities and total antioxidant status in the shrimps' digestive gland and haemolymph suggested that the probiotic effect might reside in a better use of the carbohydrates from the feed.

## Introduction

Aquaculture is today one of the most important options in animal protein production, and requires high-quality feeds as well as complementary additives, such as probiotics, to keep organisms healthy and favour growth. Research into the use of probiotics for aquatic animals is increasing with the demand for environment-friendly sustainable aquaculture (Gatesoupe, 1999). Probiotics were originally defined as microbial dietary supplements which bring beneficial effects to the host (Fuller, 1989). Today probiotics are commonly viewed as prophylactic supplements in human health (Mombelli and Gismondo, 2000; Ouwehand *et al.*, 2002; Reid, 2008). They are also commonly used as growth promoting agents in farmed animals (Jin *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 1998) and as digestibility enhancers to improve diet digestibility in ruminant applications (Guedes *et al.*, 2007). Furthermore, several studies have reported that probiotic bacteria are good candidates for improving the digestion of nutrients and growth of aquatic organisms (Tovar *et al.*, 2002; Lara-Flores *et al.*, 2003; Venkat *et al.*, 2004; Wang, 2007; Suzer *et al.*, 2008). Benefits to the host have been reported to consist in an improved feed utilisation and feed value by supplying beneficial dietary compounds (vitamin B12, biotin, carotenoids, amino acids), by detoxifying potentially harmful compounds in feeds and/or by an enzymatic contribution to digestion (Irianto and Austin, 2002). For example, Doeschate and Coyne (2008) showed that abalone (*Haliotis midae*) fed a kelp diet supplemented with *Pseudoalteromonas* sp. strain C4 exhibited an increased growth rate compared to abalone fed standard kelp. They suggested that the probiotic can play an important role in the nutrition of farmed abalone in three ways: (i) pre-digestion of alginate in kelp-based feed, (ii) increased alginate lyase activity in the abalone digestive tract and (iii) utilisation of strain C4 as a protein source. Moreover, it is also thought that probiotics influence digestive processes by enhancing the population of beneficial micro-organisms (Bomba *et al.*, 2002), microbial enzyme activity and by improving the intestinal microbial balance, consequently improving the digestibility and absorption of feed. However, at this stage, probiotic studies carried out with shrimps have mainly focused on increased resistance to disease (Vershuere *et al.*, 2000) and probiotic effects on growth of shrimps have rarely been specifically studied.



A number of studies have been conducted over the last decade with the aim of selecting potential probiotic strains and investigating their effects on aquatic species. Several reviews (Vine *et al.*, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) detail the various developments made in the application of probiotics in aquatic cultured species, including shrimp. In aquaculture, probiotics are usually associated with bio control agents for preventing disease and/or increasing resistance to pathogens (Verschuere *et al.*, 2000). In regard to the action mechanisms, even if only partial explanations are available, several possible benefits to the health of the host have been suggested. Among these, competitive exclusion of pathogenic bacteria (Vine *et al.*, 2004) and enhancement of the immune response against pathogenic micro-organisms (Scholz *et al.*, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2002) have been widely invoked to explain the probiotic effect related to an increased resistance to pathogens. For instance, the probiotic strain *Pediococcus acidilactici* MA18/5M has been subjected to a number of evaluations in regard to the health of the penaeid shrimp *L. stylirostris*, and its dietary use has shown beneficial effects in increasing resistance to vibriosis (Castex *et al.*, 2008, submitted).

There have been only a few studies carried out on the effects of probiotics on development and growth performances of fishes (Tovar *et al.*, 2002; Lara-Flores *et al.*, 2003; Wang and Xu, 2006; Wang *et al.*, 2008) and shrimps (Venkat *et al.*, 2004; Ziaeid-Nejad *et al.*, 2006; Wang, 2007). In regard to shrimps, these studies have generally reported probiotic effects on general growth and nutritional parameters such as final weight, weight gain and feed conversion ratio (FCR). For instance, we showed a beneficial effect of *P. acidilactici* on FCR in *L. stylirostris* (Castex *et al.*, 2008).

The aim of the present study was to specify the effect of *P. acidilactici* on growth and nutrition of the shrimp *L. stylirostris*. To this end we determined the quantitative feed requirements for maintenance and optimal growth, and feed utilisation in *L. stylirostris* by means of the growth ration method proposed by Brett (1979) for fish and adapted to shrimps according to Chim *et al.* (submitted). This simple method allows a precise measurement of key parameters such as the maintenance and the optimal rations, the scope for growth and the gross and net conversion efficiency, and will be useful in the determination of quantitative feed requirements. Furthermore, biochemical analysis in the haemolymph and digestive gland was carried out in order to gain more insight into the probiotic effect at the physiological level.

## 1. Materials and Methods

### 1.1. Rearing system

The trial was carried out in 30 circular polyester tanks (diameter, 118.5 cm; height, 69 cm; surface area at the bottom, 92 cm<sup>2</sup>; capacity, 536 litres) supplied with continuously-flowing seawater from the lagoon on the west coast of New Caledonia (Latitude 21° 47' S, Longitude 165° 45' E). The seawater was stored in an earthen reservoir built 8 metres above sea level and fed by gravity into the tanks, after passing through a sand filter. The water renewal rate in the tanks was 400% per day. Aeration was delivered by high pressure air. The temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset).

### 1.2. Shrimps

The sub-adult shrimp *Litopenaeus stylirostris* were reared in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) for four months, starting as 20-day post-larvae (P20) stocked at a density of 20 post-larvae per m<sup>2</sup>. The shrimp were reared according to standard semi-intensive farming practices in New Caledonia until they reached the desired size: shrimp were fed twice a day with a commercial formulated feed. The feeding rate was adjusted weekly according to the estimated mean body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays two hours after feeding.

### 1.3. Experimental feed

The experimental feed composition is shown in Table 1. Feed was processed at the laboratory as follows. The ingredients were ground up in a laboratory grinder (Retsch®) with a 1 mm screen. The meal obtained was mixed with oil and water (30%) in a horizontal mixer (Mainca®) until the consistency was such that it could be pelleted. The mixture was then extruded in a meat grinder through a 3 mm die. The strands of feed were dried at 60° C for 24h in a drying oven (Venticell® 222) until the residual moisture content was less than 10% and then they were broken up into pellets of 4 to 5mm in length. The energy content of the feed was calculated using

physiological fuel values of 18.8, 14.6 and 35.5 kJ.g<sup>-1</sup> for protein, carbohydrate and fat respectively (Jauncey, 1982).

**Table 1.** Formulation (%), proximate composition (%) and energy content of the tested feed.

| Ingredients                                | %    |
|--------------------------------------------|------|
| LT Fish meal <sup>(a)</sup>                | 30   |
| Soy bean meal <sup>(b)</sup>               | 20   |
| Wheat meal <sup>(c)</sup>                  | 37   |
| Wheat Gluten                               | 7    |
| Fish oil                                   | 2    |
| Soy oil                                    | 2    |
| Soy lecithin <sup>(d)</sup>                | 2    |
| Shrimp vitamin premix <sup>(e)</sup>       | 0.05 |
| Shrimp trace mineral premix <sup>(f)</sup> | 0.1  |
| Stay C (330 mg/kg) <sup>(g)</sup>          | 0.04 |
| Compostion (analysed, dry matter basis)    |      |
| Protein <sup>(1)</sup> (%)                 | 43.8 |
| Fat <sup>(2)</sup> (%)                     | 10   |
| Fiber <sup>(3)</sup> (%)                   | 2    |
| Ash <sup>(4)</sup> (%)                     | 6.9  |
| Gross energy (Kcal.kg-1)                   | 4502 |
| Digestible energy (Kcal.kg-1)              | 3376 |
| LDM (%) <sup>(5)</sup>                     | 12   |

<sup>(a)</sup>Chilean low temperature fish meal from achovy and Jacl Marckereel

<sup>(b)</sup>Dehulled soybean meal solvent extracted

<sup>(c)</sup>Whole wheat gran for animal feed

<sup>(d)</sup>Ultrales® lecithin from ADM lecithin, Decatur, IL, USA

<sup>(e)</sup>Vitamin premix SICA Cie

<sup>(f)</sup>Mineral premix SICA Cie

<sup>(1)</sup>ISO5983 standard

<sup>(2)</sup>NF V18-117/B standard

<sup>(3)</sup>NF V03-040 standard

<sup>(4)</sup>NF V18-101standard

<sup>(5)</sup>Loss of dry matter (LDM %) of the experimental diets

**Table 2.** Concentration of *P. acidilactici* in experimental diets prepared for each ration size tested.

| Probiotic Diet | <i>P. acidilactici</i> concentration per gram of experimental feed (x 10 <sup>7</sup> CFU.g <sup>-1</sup> ) |           |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                | Expected                                                                                                    | Measured  |
| 1%             | 4                                                                                                           | 3.8±0.4   |
| 2%             | 2                                                                                                           | 2.5±0.2   |
| 3%             | 1.33                                                                                                        | 1.5±0.3   |
| 4%             | 1                                                                                                           | 0.87±0.05 |
| 6%             | 0.67                                                                                                        | 0.65±0.05 |

#### 1.4. Experimental design

The shrimps were caught from the ponds using a cast net and transferred to the experimental tanks in 50 L plastic containers filled with seawater. Following the transfer, the shrimps were acclimated to the experimental conditions in tanks for one week prior to individual weighing and tagging. Weighing was carried out after carefully drying the animals in soft paper. The shrimps were tagged using sub-cuticle injection of a coloured elastomer (NMT ELASTOMER SYSTEM, Norwest Marine Technology, Shaw Island, Washington, 98286) within the last segment of the abdomen, just above the telson. It was possible to distinguish 5 animals using 5 colours injected. Then five shrimps and one another untagged (but handled and injected according the same procedure) shrimp were randomly assigned to each tank. The experiment was carried out with 180 juvenile shrimps with an initial individual average body weight of  $10.93 \pm 1.78$ g.

##### *Determination of the growth-ration curve and dietary treatments*

The experiment comprised two treatments (probiotic vs control) and five daily ration sizes by treatment expressed as percentages of the shrimp biomass per tank (% BM.day<sup>-1</sup>) (1%, 2%, 3%, 4%, 6%). Three tanks were randomly assigned to each ration size. The daily pre-weighed rations for each tank were delivered in four equally-sized meals distributed at 7.00am, 1.00pm, 7.00pm and 1.00am using automatic feed deliver. The trial was conducted over 27 days, and the weights of the shrimp were measured ( $\pm 0.01$  g) at the beginning and at the end of the trial. Shrimps were sampled on the 28<sup>th</sup> day at 8.00am, approximatively seven hours after the last feeding.

Growth ration curves were determined for both treatments: shrimps fed with the standard diet and shrimps fed the same diet enriched with Bactocell<sup>®</sup> PA 10 (Lallemand S.A.S, Blagnac, France). Bactocell<sup>®</sup> PA 10 is a commercial product formulated with live freeze-dried *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M (Institut Pasteur, Paris, France) at a concentration of  $10^{10}$  CFU.g<sup>-1</sup>. For the treated group, probiotic (powder form) was top-coated on the pellets using 3% of fish oil as a carrier. In order to keep constant the amount of ingested probiotic ( $4.10^8$  CFU.day<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> of shrimp) whatever the ration size distributed, feeds with

different probiotic concentrations were prepared (Table 2). Probiotic concentrations in each diet were checked after processing by counting *P. acidilactici* strains on MRS plates using serial dilution. The control diet was also top-coated with 3% fish oil and, prior to use, checked for possible contamination by the probiotic strain. All the feeds were then stored in 5-litre boxes at 20°C until use.

### **1.5. Growth and nutritional parameters calculation and data analysis**

Statistical analyses used R software (R Development Core Team, 2008). Prior to analysis, all data were systematically checked for normal distribution and variance homogeneity. The percentage survival rates were normalized using an arcsine transformation before analysis. Data on survival rates were tested using a one-way analysis of variance followed by a Student's multiple comparison t-test to determine differences among ration sizes and treatments.

#### *Ration size and probiotic effects on growth*

The relative daily growth rate (RGR) was expressed as a percentage of the initial body weight and calculated using the following equation:  $RGR = 100 * (fBW - iBW) / (d * iBW)$ , where iBW and fBW are the initial and final body weight respectively and d is the number of days between measurements. For each modality (treatment and ration size), RGR was determined at both individual and tank levels.

In order to assess the effect of dietary treatment, ration size and their interaction on final body weight and RGR, tank mean data were first analysed by a two-way analysis of variance, and the initial body weight was included in the model as a covariate. In addition, individual data were also analysed with a two-way nested analysis of variance in order to take into account a possible significant random tank effect. Indeed, variations between tanks can represent a random nuisance factor that can lead to invalid conclusions if simple ANOVAs are used (Ling and Cotter, 2003). The analysis of variance model being mixed, the ration size and dietary treatment effects were tested from a test of hypothesis using the random effect (tank effect) as error term. Individual iBW was also used as a covariate in the model. Finally, significant nested ANOVAs were followed by a Student-Newman-Keuls test to

determine the differences between ration sizes and treatment means. All data in the tables and text are given as tank means  $\pm$  standard deviation (n=3).

#### *Determination of nutritional parameters from the growth-ration curve*

Our experiment design did not allow the determination of the individual consumption of the shrimps. Thus, we cannot obtain nutritional parameters at the individual level. However, the ration delivered, when completely consumed, gives a measurement of the feed consumption of the shrimps at tank level. Then in order to determine the parameters which follow, we considered a growth ration model determined from RGR means per tank.

For each treatment, the relationship between RGR and ration size was analysed with a non-linear regression and G-R curves were plotted. The regressions were calculated to fit the data within the range of the ration sizes tested (1% to 6%). The model describing the response was: (1) GR:  $y = y_0 + a*(1-b^x)$ , where y is the tank average RGR, x is the ration size, and a, b are constants determined by the regression. The models were determined and plotted with Sigmaplot® software (SPSS Inc.). From the GR curves, the maintenance and optimal rations, and the gross and net conversion efficiency (K1&K2) were determined in accordance with Chim *et al.* (submitted).

*Gross conversion efficiency (K1).* This parameter was determined for each tank. K1 expresses the capacity to convert food into body tissues. It was calculated according to the following formula (Brett and Groves, 1979):  $K1 = (\overline{RGR}/R) \times 100$ , where  $\overline{RGR}$ , the mean relative daily growth rate for each tank, and R, the ration size per tank, are expressed in the same units (%). The KR curves were plotted by using the predicted values from the growth-ration model: (2) KR:  $y/x = (y_0 + a*(1-b^x))/x$ .

*Maintenance and optimal rations.* We determined two specific rations that were defined by Brett (1979): (i) the maintenance ration (Rm), which is the feed intake that just maintains the animal without any change in its body weight, and (ii) the optimum ration (Ropt) that represents the feed intake that produces the greatest increase in the body weight for the least feed intake, in other words optimal growth. Daily Rm was calculated from the GR equation. Indeed Rm corresponds to the ration for which the RGR is null and can be obtained by solving equation (1) when y is null. Ropt is identifiable on the GR curve as the ration for which the tangent crosses the origin.

Ropt was determined as the ration for which the K-R curve reaches its maximum, in other words, the value of x for which the first order derivative of equation (2) is null (i.e. when  $dK/dR=0$ ).

*Net conversion efficiency (K2)*. This parameter provides a measure of the capacity to convert the amount of food available for growth, which is equal to the amount of feed consumed in excess of the maintenance ration ( $R_m$ ). It was calculated as  $K2 = (\overline{RGR}/(R-R_m)) \times 100$  (Brett and Groves, 1979).

K1 and K2 data were determined for each tank and compared with the non-parametric tests of Mann Whitney and Kruskal–Wallis to assess respectively the differences between treatments at each ration size and the overall effect of the ration size for each treatment.

## **1.6. Physiological parameters and data analysis**

### *Tissue sampling*

After weighing, four shrimps per tank were immediately sampled for biochemical analysis of the haemolymph and digestive gland. Only shrimps in intermoult (stage C-D0) were used, since digestive enzyme activity and other physiological parameters change with the moulting stage. 200  $\mu$ L haemolymph were withdrawn from the ventral sinus cavity of individual shrimps. The samples were collected using a 23-gauge needle and 1 mL syringe. Haemolymph samples were immediately diluted in pre-cooled trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA. Samples were then immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assays were conducted. Digestive glands were removed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For the assay, the organ was defrosted, divided into two parts, and each part was weighed. One part was homogenised in Tris buffer 10 mM, 1 mM DTPA, 1 mM PMSF, pH 7.4 for enzymes, glucose, glycogen and protein assays and the other part in trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA specifically for Total Antioxidant Status (TAS) determination. The diluted haemolymph and digestive gland homogenates were then centrifuged at 4000 rpm for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatant was subjected to analysis. Samples from two shrimps from the same tank were pooled for subsequent analysis.

### *Biochemical analysis*

Total soluble proteins were determined in accordance with Lowry *et al.* (1951) with BSA standard. Trypsin was assayed by its amidase activity using benzoyl-Arginine-p-nitroanalide (BAPNA) as substrate following the method 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-nitroanalide was measured at 410 nm over 15 min. A positive control of 3 mg mL<sup>-1</sup> trypsin (SIGMA) was used. One activity unit was expressed as 1 µmol of p-nitroanilide released min<sup>-1</sup>.

The α Amylase activity was assayed by Bernfeld's (1955) method, using 1% soluble starch (SIGMA) as substrate in phosphate buffer 20 mM, pH 7, and reacting it 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 enzyme activities were expressed both as total (U/mg of organ) and specific (U/mg of protein) activities.

Glycogen was extracted in the presence of sulphuric acid and phenol (Dubois *et al.*, 1965). Samples were first homogenised in trichloro-acetic acid (TCA 5%) for 2min at 16000 rpm. After centrifugation 5 min at 3000 rpm, the supernatant was quantified. This procedure was carried out twice. 500 µl of supernatant was pipetted into a tube and mixed with five volumes of 95% ethanol. The tubes were then placed in an oven for 3 hours at 37°C. After precipitation, the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The glycogen pellet was dissolved by addition of boiling water and concentrated sulphuric acid and phenol. Then the content of the tubes were transferred in a microplate reader (with four replicate per sample) and read at 490nm.

Commercial kits (Biomérieux) adapted to a microplate were used for glucose determination in the haemolymph and digestive gland. TAS was determined in the haemolymph and digestive gland using the Randox Kit, referred to as the “Total Antioxidant Status Kit” (Randox Co., Antrim, UK). This kit allowed the measurement of the total amount of blood antioxidants by inhibition of the transformation of 2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS®) into the radical cation (ABTS®<sup>•+</sup>) in the presence of a peroxidase (metmyoglobin) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### *Data analysis*

The effects of treatments and ration size on the physiological parameters studied were assessed by two-way analysis of variances. Pairwise comparisons were made using Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) and statistically significant differences among experimental groups were reported at  $P < 0.05$ , if not otherwise stated.

## **2. Results**

### **2.1. Survival and Growth**

During this experiment, the average temperature was of  $27.2 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ , and the shrimp consumed all the feed given to them in the groups where the ration sizes were 3% iBM.day<sup>-1</sup> or less. A ration size of 4% iBM.day<sup>-1</sup> resulted in a small amount of the daily ration being left uneaten and 6% was in obvious excess. As the feed leftovers were not determined, K1 and K2 values determined at in the groups fed in excess (4% and 6% BM) were only apparent values, and were excluded from the statistical analysis if not otherwise stated.

Zootechnical results at the end of the 27<sup>th</sup> day trial are shown in Table 3. The mean final survival rate was of  $81.6 \pm 15.0\%$  and no significant effect of treatment and ration size was recorded on this parameter even at a low feeding rate. The mean initial body weight of shrimps was  $10.93 \pm 1.78\text{g}$ , and no significant difference was found among the 30 tanks. However, significant differences due to the random allocation of shrimps to ration size and treatment groups were detected (Table 3). Thereafter, initial body weight was used as a covariate in order to assess statistically the overall effect of ration size and treatments on fBW. RGR was used for *a posteriori* analysis in order to compare growth of the shrimps according to treatment and ration size. No random tank effect was detected when individual RGR data were used with a mixed ANOVA. Ration size has significant effects on shrimp RGR (Table 3 & 4, Figure 1). *A posteriori* tests indicated a significant increase in RGR between 1, 2 and 3% rations for probiotic treatment and between 1, 2, 3 and 4% rations for control (Figure 1). Further, RGR was found to reach an upper limit at rations of 3 and 4% respectively

for the probiotic and the control treatments (Figure 1). Finally, no statistical difference was found between RGRs at 4% and 6% BM.

The probiotic treatment resulted in higher RGR compared to the control at certain ration sizes. Indeed, the Student-Newman-Keuls test showed significant higher RGR at 1, 2, 3% ( $P < 0.01$ ) and 4% ( $P < 0.05$ ) for the probiotic treatment compared to the control (Table 3). However, no significant differences were found between treatments at the ration size of 6% BM. Similar results were obtained when adjusted final body weight was used in the analysis (data not shown). Furthermore, the probiotic treatment effect was detected on fBW only when mixed ANOVA was used (Table 4). Indeed, a significant random tank effect was detected when individual final body weight data were used, an effect which was not detectable in the analysis with a classic ANOVA.

For both treatments, the growth ration curves were found to fit non-linear regressions which plateaued for ration size over 3%. The equations of the curves obtained for each treatment are indicated in the Figure 1, and adjusted R squares were found to be 99% for both regressions. From these equations,  $R_m$  and  $R_{opt}$  were obtained by calculation. For the probiotic treatment,  $R_m$  was of 0.96% and  $R_{opt}$  was 1.88%, and for the control treatment,  $R_m$  was 1.12% and  $R_{opt}$  was 2.08%.

KR curves obtained from the predicted values of the growth-ration are expressed by equation (2):  $y = (y_0 + a \cdot (1 - b^x)) / x$ . (Figure 1). Ration size and treatment have significant effects on K1 (Table 4). K1 increases significantly from 1 to 2% ration size and decreases thereafter with increased ration size (Figure 1). K1 reaches maximum at  $R_{opt}$ , with values of 16.2% and 23.2% respectively for the control and probiotic treatment. No significant differences for K1 were found between 3% and 4% ration size whatever the treatment. At ration size of 6% the values of K1 were apparent as the feed was distributed in excess. Probiotic group compared to the control exhibited significant higher K1 at 1, 2 and 3% ration sizes while no significant difference was detected for larger ration sizes (Table 5). In addition K1 differences between both treatments were found to decrease significantly as ration size increased (Table 4).

**Table 3.** Individual initial body weight (g.shrimp<sup>-1</sup>), final body weight (g.shrimp<sup>-1</sup>), and relative daily growth rate (% iBW.d<sup>-1</sup>) of *L.stylirostris* fed at different ration levels for both treatments (mean±S.D.; n=3). (\*\*p<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. not significant).

| Daily Ration size<br>(%BM <sup>(1)</sup> ) | tank | Survival rate (%)  |                    | iBW <sup>(2)</sup> (g)  |                         | fBW <sup>(3)</sup> (g) |            | RGR (%iBW.d <sup>-1</sup> ) |                        |
|--------------------------------------------|------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------|-----------------------------|------------------------|
|                                            |      | Control            | Probiotic          | Control                 | Probiotic               | Control                | Probiotic  | Control                     | Probiotic              |
| 1                                          | 3    | 83±17 <sup>a</sup> | 83±17 <sup>a</sup> | 11.55±0.10 <sup>a</sup> | 11.02±0.31 <sup>b</sup> | 11.25±0.07             | 10.66±0.40 | -0.08±0.03 <sup>a</sup>     | 0.03±0.03 <sup>b</sup> |
| 2                                          | 3    | 75±12 <sup>a</sup> | 78±10 <sup>a</sup> | 10.70±1.42 <sup>a</sup> | 11.68±0.44 <sup>a</sup> | 11.64±1.54             | 13.47±0.22 | 0.33±0.02 <sup>a</sup>      | 0.47±0.06 <sup>b</sup> |
| 3                                          | 3    | 78±25 <sup>a</sup> | 83±17 <sup>a</sup> | 11.88±0.59 <sup>a</sup> | 10.70±0.31 <sup>b</sup> | 13.70±0.60             | 12.15±0.50 | 0.40±0.05 <sup>a</sup>      | 0.56±0.02 <sup>b</sup> |
| 4                                          | 3    | 89±19 <sup>a</sup> | 83±29 <sup>a</sup> | 11.15±0.41 <sup>a</sup> | 10.31±0.69 <sup>a</sup> | 12.03±1.55             | 11.81±0.67 | 0.45±0.08 <sup>a</sup>      | 0.61±0.07 <sup>b</sup> |
| 6                                          | 3    | 83±0 <sup>a</sup>  | 78±10 <sup>a</sup> | 10.84±1.19 <sup>a</sup> | 9.62±0.43 <sup>a</sup>  | 12.07±1.01             | 11.06±0.98 | 0.45±0.04 <sup>a</sup>      | 0.59±0.09 <sup>a</sup> |
| ration size effect                         |      | n.s                | n.s                | n.s                     | **                      | -                      | -          | ***                         | ***                    |

Values within the same raw with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

<sup>(1)</sup> Biomass per tank

<sup>(2)</sup> Initial body weight

<sup>(3)</sup> Final body weight

**Table 4.** Statistical significance (P value) of body weight, ration size, and treatment effects for each growth parameter determined based on type III sum of squares from factorial ANOVA. When nested ANOVA were applied, ration size and treatment effects were systematically tested from a test of hypothesis using the tank random effect as the error term (\*P<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. not significant).

| Parameter                        | Effect    |             |                     |                       |             |
|----------------------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------------------|-------------|
|                                  | Treatment | Ration size | Initial body weight | Ration size*Treatment | Tank effect |
| Final Body weight <sup>(1)</sup> | ***       | ***         | ***                 | n.s                   | **          |
| RGR <sup>(1)</sup>               | ***       | ***         | n.s                 | n.s                   | n.s         |
| K1 <sup>(2)</sup>                | ***       | ***         | -                   | *                     | -           |
| K2 <sup>(2)</sup>                | **        | ***         | -                   | n.s                   | -           |

(1) Two way mixed analysis of variance with initial body weight use as a covariate

(2) Two way analysis of variance

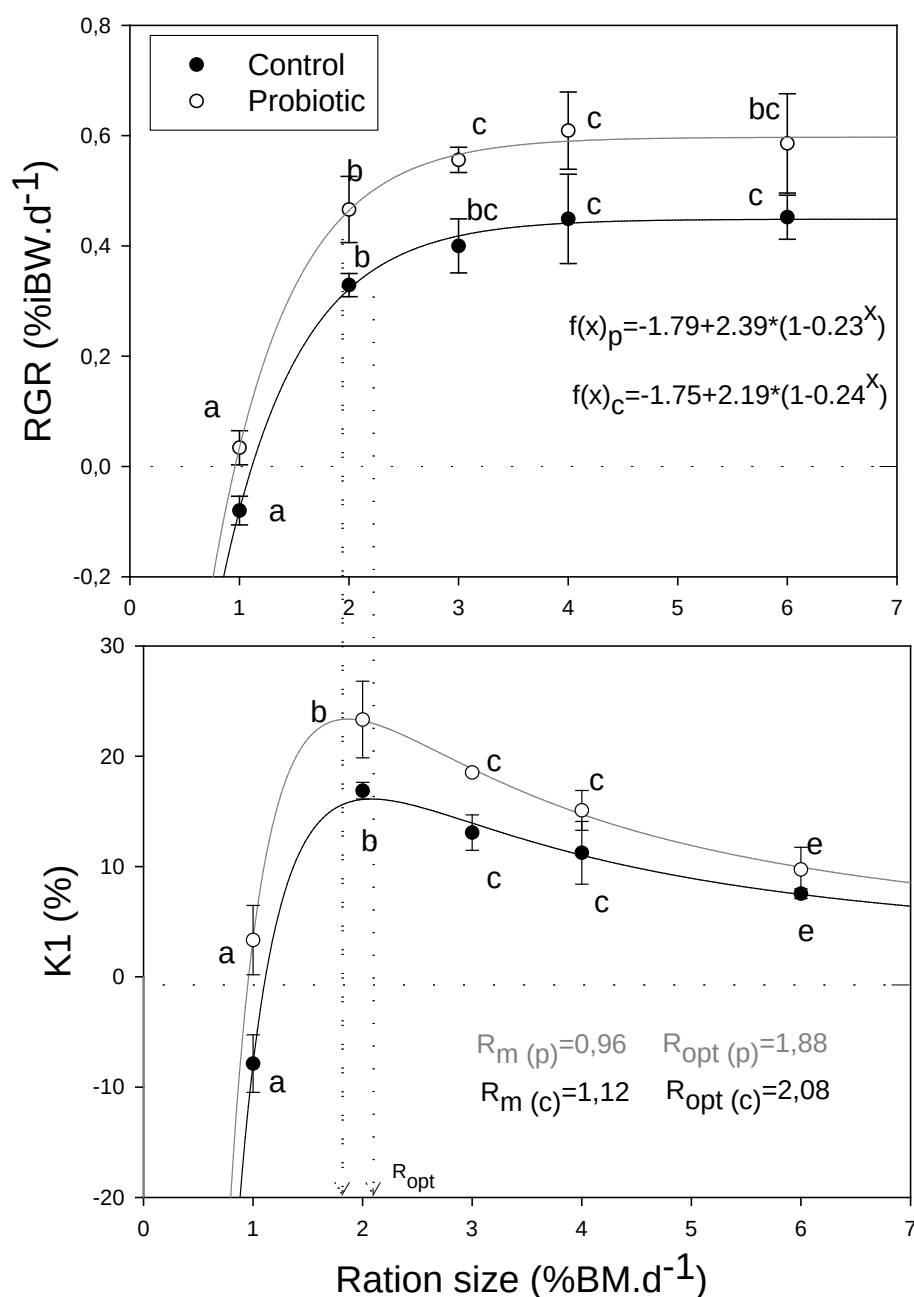


**Figure 1:** (A). Growth rate curves (GR) determined for each treatment from tank mean data. (B) Gross conversion efficiency rate curves (KR) determined for each treatment from respective G-R curves. For both treatments, optimum ration size for growth ( $R_{opt}$ ) indicated by broken lines were calculated from the first order derivative of the K-R equation (i.e. when  $(dRGR/x)/dT=0$ ). In both graphs, error bars indicate standard deviation of mean ( $n=3$ ). Different letters on the curves at each ration size indicated significant differences in RGR according to ration size. Comparisons were made with the Student-Newman-Keuls test.

**Table 5.** Gross conversion efficiency and net conversion efficiency of the feed by *L.stylirostris* fed at different ration levels for both treatments (mean±S.D., n=3). (\*P<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. not significant).

| Daily Ration size<br>(%BM <sup>(1)</sup> ) | K1 (%) <sup>(2)</sup>   |                         | K2 (%) <sup>(3)</sup>   |                         |
|--------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                            | Control                 | Probiotic               | Control                 | Probiotic               |
| 1                                          | -7.87±2.61 <sup>a</sup> | 3.33±3.14 <sup>b</sup>  | -                       | 83.33±45.3              |
| 2                                          | 16.88±0.75 <sup>a</sup> | 23.33±3.47 <sup>b</sup> | 36.30±1.88 <sup>a</sup> | 49.74±6.68 <sup>b</sup> |
| 3                                          | 13.08±1.61 <sup>a</sup> | 18.53±0.19 <sup>b</sup> | 20.87±2.57 <sup>a</sup> | 27.25±0.27 <sup>b</sup> |
| 4                                          | 11.25±2.85 <sup>a</sup> | 15.09±1.80 <sup>a</sup> | 15.62±3.96 <sup>a</sup> | 19.86±2.37 <sup>a</sup> |
| 6                                          | 7.54±0.45               | 9.73±2.01               | 9.27±0.55               | 11.59±2.40              |
| ration size effect <sup>§</sup>            | *                       | **                      | *                       | *                       |

For each parameters, values within the same raw with different superscript letters are significantly different (P<0.05). Comparisons achieved with Mann Whitney test

<sup>(1)</sup> Biomass per tank

<sup>(2)</sup> Gross conversion efficiency.  $K1 = (RGR/R) \times 100$

<sup>(3)</sup> Net conversion efficiency.  $K2 = (RGR/(R-R_m)) \times 100$

<sup>§</sup> Kruskal Wallis test to assess overall effect of ration size

K2 values were not calculated for the control group fed at the ration size of 1%, as the mean relative growth rate was negative for this group. K2 was found to significantly decrease with increase ration size (Table 4&5) and was significantly higher at the ration size of 2% compared to 3%. The probiotic group exhibited significant higher K2 values than the control at feeding rates of 2% and 3% BM. Finally, except for K1, no significant interaction effects between treatments and ration sizes were detected for any of the variables tested (Table 4).

## 2.2. Biochemical analysis

### *Glucose and glycogen content*

Glycogen content in the digestive gland was found to increase with ration size and appeared to reach saturation from ration size of 4% (Figure 2.A). Statistical analysis indicated significant effects of ration size and treatment on this variable (Table 6). Glycogen content was found to statistically increase up to 4% BM and 2% BM respectively for the control group and the probiotic group. Moreover, the probiotic group exhibited significantly higher glycogen content compared to the control at ration sizes 1, 2 and 3%, while no difference was detected for higher feeding rates.

Free glucose in the digestive gland was also higher in shrimp fed the probiotic diets for ration sizes of 1, 2 and 3% BM (Figure 2.B). No significant overall effect of the ration size on free digestive gland glucose was detected (Table 6). However, its level increased with ration size in the digestive gland of the control shrimps as significant differences were detected between the ration size of 1% BM and 3, 4, and 6% BM. In the probiotic group, the free glucose level remained unchanged whatever the ration size.

In the haemolymph, free glucose was found to slightly but significantly increase up to ration sizes of 3% and 2% respectively in the control and probiotic treatment (Table 6; Figure 2.C). At these ration sizes, free glucose in the haemolymph reached a saturation level close to  $1\text{mg.ml}^{-1}$ . The probiotic treatment resulted in significantly higher haemolymph glucose concentration at ration sizes of 1% and 2%.

### *Digestive enzymes*

Ration size was found to exert a significant effect on trypsin and  $\alpha$  amylase specific activities (Table 6).

**Table 6.** Statistical significance (P value) of ration size, dietary treatment and the interaction of both effects determined with a two way ANOVA for each biochemical parameter measured in the blood and digestive gland (\* $p < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

| Parameter                                             | Effect      |           |                       |
|-------------------------------------------------------|-------------|-----------|-----------------------|
|                                                       | Ration size | Treatment | Ration size*Treatment |
| Glucose in hemolymph ( $\text{mg.g ml}^{-1}$ )        | *           | *         | n.s.                  |
| Glucose in DG ( $\text{mg.g organ}^{-1}$ )            | n.s.        | **        | n.s.                  |
| Glycogène in DG ( $\text{mg.g organ}^{-1}$ )          | **          | *         | n.s.                  |
| Trypsine activity ( $\text{U.mg prot}^{-1}$ )         | **          | n.s.      | *                     |
| $\alpha$ amylase activity ( $\text{U.mg prot}^{-1}$ ) | ***         | ***       | n.s.                  |
| Amylase/Trypsine                                      | n.s.        | n.s.      | n.s.                  |
| TAS in DG ( $\mu\text{mol.g organ}^{-1}$ )            | ***         | ***       | n.s.                  |
| TAS in hemolymph ( $\mu\text{mol.g ml}^{-1}$ )        | n.s.        | *         | n.s.                  |

$\alpha$  amylase specific activity in the digestive gland decreased as ration size increased from both treatments (Figure 2.D). Moreover, significant higher activities were measured for the probiotic groups at ration sizes of 1, 2 and 3% BM. Enzyme activity remained higher in the probiotic group at 4 and 6%, but the differences were not statistically significant (Table 7).

Trypsin, in the control group, was also found to decrease when ration size increased, with twice as much enzyme activity in the digestive gland of shrimps fed at 1% compared to those

fed at 6% (Table 7). On the contrary, in the probiotic group, trypsin activity did not seem to be affected in a particular way by ration size ( $P>0.05$ ).

Finally, variation in the amylase/trypsin ratio was not explained by any of the parameters tested (Table 6). Only one significant difference between treatments was found at 1% ration size, where probiotic fed shrimps showed higher values for this ratio (Table 7).

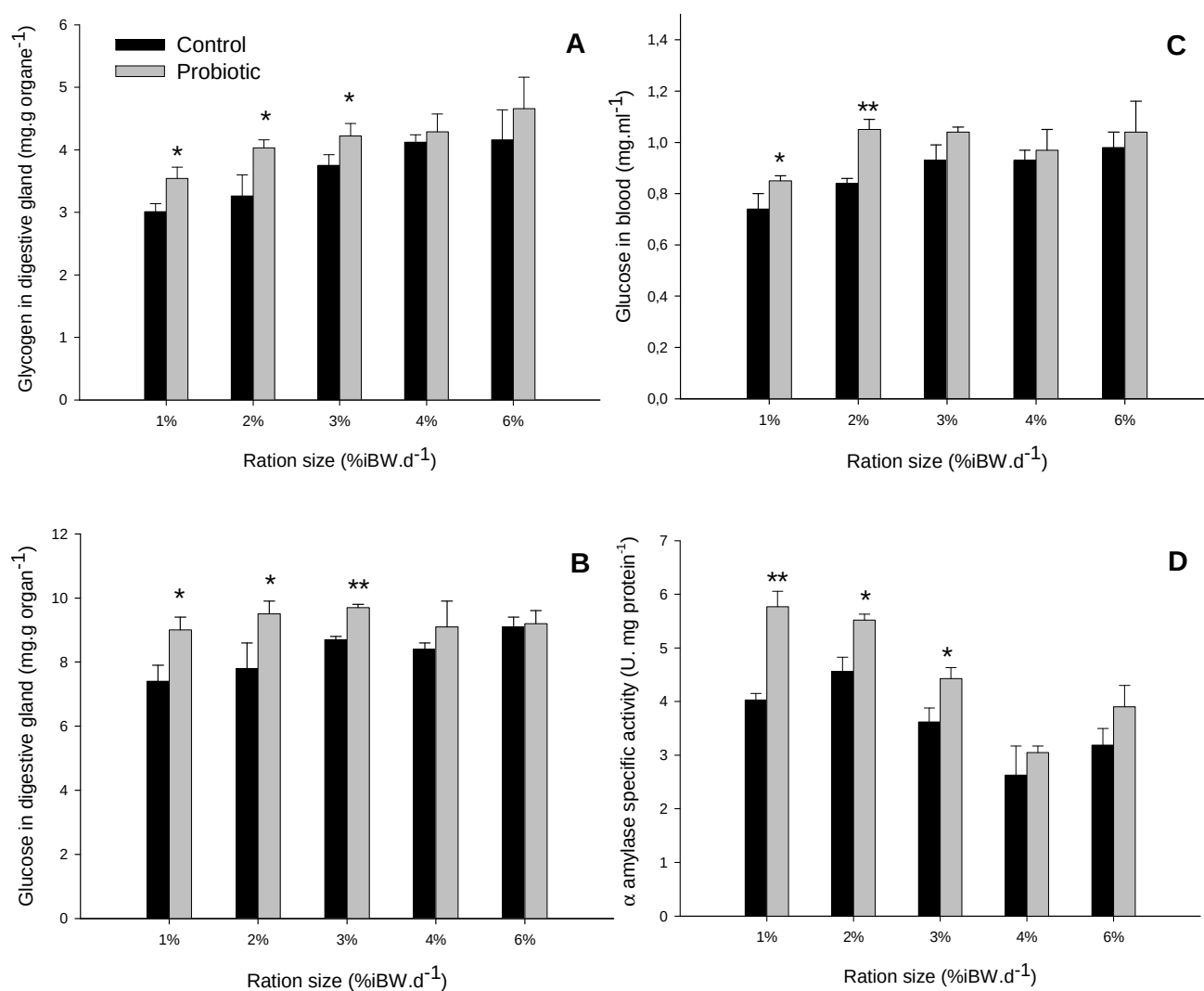


**Figure 2.** Changes in physiological parameters of *L. stylirostris* according to ration size in each dietary treatment. Values are means of three replicate tank values per treatment and ration size ( $n=3$ ) and error bars indicate standard deviation. Stars indicate that the difference between the probiotic and control group statistically differed at 5% significance level (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ).

*Total antioxidant status*

TAS in the digestive gland was found to decrease with ration size (Figure 3), with significant lower values at 3, 4 and 6% compared to 1 and 2% in both treatments. On the other hand, TAS in plasma was not found to be affected by the ration size (Table 7).

TAS in the digestive gland and haemolymph showed significant higher values in the probiotic group compared to the control (Figure 3) whatever the ration size tested, except for shrimps fed at 6%.

**Table 7.** Specific activities of digestive enzymes in the digestive gland of *L.stylirostris* fed different ration sizes with or without probiotic (Mean±S.D, n=3). (\*P<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*P<0.001, n.s. not significant).

| Ration size<br>(%iBW.d <sup>-1</sup> ) | $\alpha$ amylase (U.mg <sup>-1</sup> prot) <sup>(1)</sup> |                        | Trypsine (U.mg <sup>-1</sup> prot) <sup>(2)</sup> |                        | Amylase/Trypsine        |                         |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                        | Control                                                   | Probiotic              | Control                                           | Probiotic              | Control                 | Probiotic               |
| 1%                                     | 4.03±0.12 <sup>a</sup>                                    | 5.77±0.29 <sup>b</sup> | 0.38±0.04 <sup>a</sup>                            | 0.33±0.04 <sup>a</sup> | 11.96±1.16 <sup>a</sup> | 18.50±2.26 <sup>b</sup> |
| 2%                                     | 4.56±0.27 <sup>a</sup>                                    | 5.52±0.11 <sup>b</sup> | 0.30±0.03 <sup>a</sup>                            | 0.38±0.05 <sup>a</sup> | 16.00±1.80 <sup>a</sup> | 16.29±0.73 <sup>a</sup> |
| 3%                                     | 3.62±0.26 <sup>a</sup>                                    | 4.43±0.2 <sup>b</sup>  | 0.31±0.03 <sup>a</sup>                            | 0.27±0.02 <sup>a</sup> | 11.99±2.47 <sup>a</sup> | 16.91±1.45 <sup>a</sup> |
| 4%                                     | 2.63±0.54 <sup>a</sup>                                    | 3.05±0.12 <sup>a</sup> | 0.22±0.04 <sup>a</sup>                            | 0.23±0.01 <sup>a</sup> | 12.69±1.36 <sup>a</sup> | 13.4±0.66 <sup>a</sup>  |
| 6%                                     | 3.19±0.31 <sup>a</sup>                                    | 3.90±0.40 <sup>a</sup> | 0.18±0.02 <sup>a</sup>                            | 0.32±0.06 <sup>b</sup> | 17.80±2.61 <sup>a</sup> | 15.60±4.63 <sup>a</sup> |
| ration size effect                     | ***                                                       | **                     | **                                                | n.s.                   | n.s.                    | n.s.                    |

<sup>(1)</sup>One unit is defined as 1 mg of maltose liberated per minute

<sup>(2)</sup>One unit is defined as 1 µmol of p-nitroanilide released per minute

Values within the same column with different superscripts are statistically different (P<0.05).

## Discussion

Probiotic studies carried out with shrimps have mainly focused on increased resistance to disease, while the probiotic effects on growth have been rarely specifically studied. Venkat *et al.* (2004), Ziaei-Nejad *et al.* (2006) Yu *et al.* (2008) and Wang (2007) investigated the effect of *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.* and photosynthetic bacteria (*Rhodobacter sphaeroides*) on the growth of *Macrobrachium rosenbergii*, *Fenneropenaeus indicus* and *Litopenaeus vannamei*. In those experiments shrimps were fed *ad libitum* and the probiotic effect was measured on growth rate, feed conversion ratio and digestive enzymes such as protease, lipase and/or amylase. These authors linked the probiotic benefit effect on growth to enhanced digestion and increased absorption of food due to the secretion of digestive enzymes by the probiotic strain and/or stimulation of endogenous enzymes produced by the shrimp.



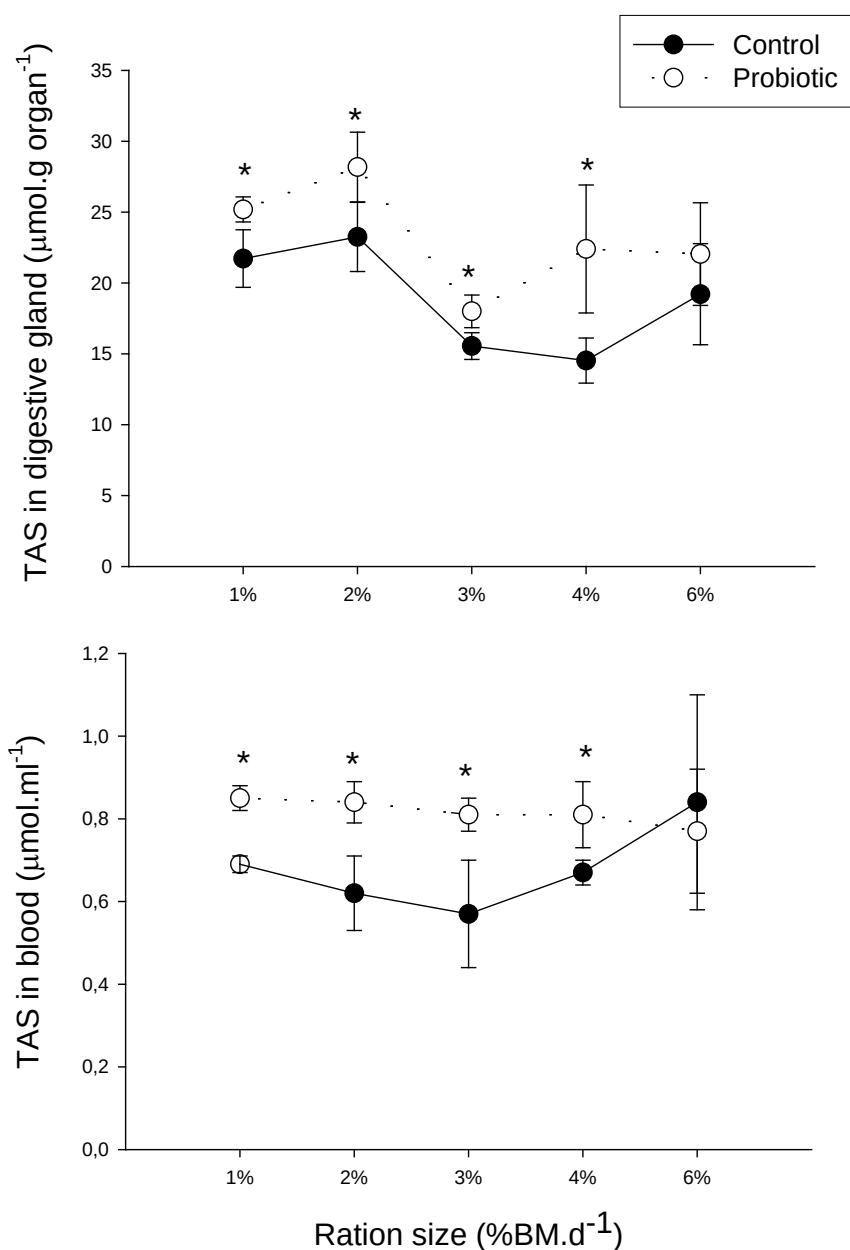


**Figure 3.** Total Antioxidant Status (TAS) in the digestive gland and haemolymph of shrimps from each treatment according to each ration size. Each value is the mean of three replicate tank values per treatment and ration size (n=3) and error bars indicate standard deviation. and/or amylase. These authors linked the probiotic benefit effect on growth to enhanced digestion and increased absorption of food due to the secretion of digestive enzymes by the probiotic strain and/or stimulation of endogenous enzymes produced by the shrimp.

In the present study, we examined the dietary administration of *P. acidilactici* at a constant dose on the growth-ration (GR) and the K1-ration (KR) functions (Brett, 1979). These fundamental GR and KR relations have rarely been applied in studies on shrimp growth and nutrition (Sedgwick, 1979; Kureshy and Davis, 2002; Wabete *et al.*, 2006). From these

relations it is possible to determine precisely the quantitative feed intake for maintenance ( $R_m$ ) and optimal growth ( $R_{opt}$ ) and then to obtain gross conversion efficiency ( $K_1$ ) and net conversion efficiency ( $K_2$ ) (Brett and Groves, 1979; Chim *et al.*, submitted).

The growth ration curves of *L. stylirostris* obtained in this study were found to fit a non-linear regression in the range of the ration size tested. The models seem to be consistent, as RGR values determined from the models for a 0% feeding rate were equal for both treatments (-1.79 % iBW and -1.75% iBW respectively for the probiotic and control groups). In previous studies where higher ration sizes were tested (i.e. 8% BM), the growth ration curve for *L. stylirostris* was found to fit a polynomial regression with a decrease in the RGR for larger ration size (Chim *et al.*, submitted). In the present case, we did not measure any fall in RGR at 6% BM, but it cannot be excluded that this could have happened if larger ration size had been used. The absence of any statistical difference between RGR measured at 2% and 6% in the probiotic group might indicate such a trend. However, the literature is still equivocal with respect to the shape of the feeding relationship of growth in marine fish with both linear (Staples and Nomura 1976, Malloy and Targett 1994) and non-linear (asymptotic) (Elliott 1975, Brett and Groves, 1979) relations. Moreover, the growth ration model determined in our experiment can only be used in the range of the ration size tested here, and cannot be used for prediction at larger ration sizes. This makes it impossible to determine precisely from our study the ration allowing maximal growth. However, based on statistical analysis, RGR was found to plateau at a lower ration size (3% BM) for the probiotic group compared to the control (4% BM). This result might suggest that treated shrimps, when fed *ad libitum*, require less feed than the control shrimps. Thus it is possible that shrimps fed *P. acidilactici* would reach maximum growth for a smaller ration size. Moreover, the higher RGR was measured for the probiotic group fed at 4% BM. This is in accordance with a previous study suggesting that maximum growth of *L. stylirostris* was close to 4% BM under similar conditions (Chim *et al.*, submitted).

The GR curves obtained for both treatments seem to be parallel, with the probiotic curve on top. The probiotic stimulates shrimp growth at all the ration sizes tested, although the difference between groups was not significant at 6% BM. As feed distributed to shrimps at ration size below 4% was completely consumed, we were able to calculate feed quantitative requirements for maintenance ( $R_m$ ) and optimal growth ( $R_{opt}$ ) and the corresponding gross

and net conversion efficiency (K1 and K2). We thus observed that Rm and Ropt were reduced and K1 and K2 were increased for shrimps fed with the probiotic diets. At the optimal ration size, the probiotic treatment resulted in increased shrimp RGR for more than 36% compared to control ( $4.5\text{g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$  vs  $3.3\text{ g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$  for the control shrimps). Besides K1 max was improved of 38% which indicates a better transformation of the feed into shrimp growth. These results indicate that the probiotic treated shrimps need less feed to reach maintenance and optimal growth and that such effect may be related to a better use of the feed. In the second part of the present study we investigated such hypothesis by measuring several physiological parameters in the digestive gland and the blood of the shrimps.

Besides, we also showed that (i) K2 was improved of 37% at the optimal ration size compared to control, traducing a better transformation of the feed part allocated to growth, and that (ii) at 1% ration size, shrimps fed the probiotic diet did not loose weight while control shrimps did ( $0.3\text{g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$  vs  $-0.8\text{g.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$  for the control shrimps). Those results led to the conclusion that a better use of the feed would be unlikely the only mechanism responsible of the probiotic effect on growth. We assumed that the probiotic might also provides some growth factors or essential nutrients favouring growth, as demonstrated with other probiotic strains (Doeschate and Coyne, 2008), and/or plays an action on the metabolism as suggested by the lower feed requirement for maintenance and by the fact that probiotic fed shrimps did not lose weight at 1% BM.

Beyond the determination of the GR and KR curves, we then looked at the effects of the probiotic on physiological parameters in the haemolymph and digestive gland of shrimps fed the different ration sizes in order to gain more insight into the probiotic effect at the nutritional level. The values for glycogen and free glucose determined in our study were in the same ranges as the ones recorded in previous studies with *L. vannamei* (Sanchez-Paz *et al.*, 2007). In animals fed smaller rations (1, 2 and 3%), glycogen and glucose in the digestive gland were significantly higher in the probiotic groups compared to the control. Moreover, in the control groups, glycogen content tended to increase as ration size increased and reached a saturation level for ration size over 3%. A similar trend was observed for free glucose. On the other hand, probiotic fed shrimps showed relatively constant levels of glucose and glycogen (higher than  $4\text{ mg.g}^{-1}$ ) despite a significant increase in glycogen content from 1% to 2% BM. Rosas *et al.* (2000) reported a saturation curve in glycogen level in the digestive gland of *L. stylirostris* fed diets with dietary carbohydrate levels higher than 21%. They suggested that

this level could be used as a maximum shrimp dietary carbohydrate (CBH) level based on the capacity of shrimps to utilise CBH. However, in their studies shrimps were fed *ad libitum* and feed intake was not measured, making quantitative requirements for CBH impossible to determine. The same authors also reported a saturation curve in glycogen level for diets with dietary CBH levels higher than 33% with *L. vannamei* (Rosas *et al.*, 2002). Interestingly, they showed that saturation was measured at the same CBH level in fasting (for 12h) and feeding shrimps.

In our experiment, based on the saturation recorded for glycogen content in the digestive gland, we assume that the control shrimps may have reached their maximum capacity to use CBH when feed intake is close to 4% BM. However, this maximum capacity was recorded for lower ration size, at about 2%, in shrimp fed probiotic. Therefore the probiotic treatment may have in some way increased the utilisation of dietary CBH resulting in a higher assimilation of glucose. This would be in accordance with the absence of a significant effect of the probiotic on glycogen and glucose concentration above a ration size of 3%. Then at 4% and 6% BM the probiotic effect may have been masked by increased CBH intake and would then be saturated. Interestingly, we also observed a reduction in the probiotic effect on growth and gross feed efficiency for these rations.

In shrimps, after feed ingestion, starch is first processed by  $\alpha$  amylase to produce oligosaccharides and then glucose through  $\alpha$  glucosidase. This system gives rise to the slow liberation of glucose into the blood and explains why starch is viewed as an efficient CBH source in shrimp feeds (Cousin *et al.*, 1996). Rosas *et al.* (2000, 2002) showed that in *L. stylirostris* and in *L. vannamei* hydrolysis of dietary starch by  $\alpha$  amylase could be limited by dietary CBH. They also reported that  $\alpha$  glucosidase was directly related to dietary CBH level and not limited by it. In addition to glycogen saturation in digestive gland, the  $\alpha$  amylase enzyme dietary CBH capacity was then proposed as another factor controlling the use of CBH (Rosas *et al.*, 2002). These authors reported a saturation of both glycogen and  $\alpha$  amylase specific activity above the same level of dietary CBH (Rosas *et al.*, 2000). In our study, higher glycogen and glucose contents in the digestive gland of probiotic-fed shrimps at restricted rations (1, 2 and 3% BM) were associated with higher  $\alpha$  amylase specific activity. However, we were not able to show the saturation of  $\alpha$  amylase specific activity, but we report a decrease of this activity for ration size higher than 3% BM. This result may be due to adaptation mechanisms between the increased intake of nutrients and digestive enzyme activities (Lee and Lawrence, 1985). Nevertheless, our results are consistent with the

hypothesis of a better utilisation of dietary CBH through *P. acidilactici*. Indeed, the probiotic may in some way stimulate  $\alpha$  amylase specific activity. However, the direct link between digestive enzyme activity and increase in starch metabolism remains to be demonstrated in shrimps (Rosas *et al.*, 2002).

Several authors (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Wang, 2007) have assumed that probiotics may stimulate the production of endogenous enzymes by the shrimp. It is possible that the probiotic produces substances, such as vitamins, which will specifically influence some digestive enzyme activities. For instance, vitamin C has been found to increase the activity of amylase (Maugle *et al.*, 1982) in shrimps, and growth factors presented in some feed ingredients have increased specific activities of amylase, trypsin and total proteases in *Marsupenaeus japonicus* (Van Wormhoudt *et al.*, 1986). Moreover, in a recent unpublished study, Cecile (2006) was able to show that some extracellular products of protein nature secreted by *Lactobacillus farciminis* MA27/6R and *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B were able to enhance specifically trypsin and  $\alpha$  amylase activity in *Artemia*. Additionally, a more indirect effect involving a modification of the digestive microflora composition can also be postulated. Indeed, in a recent experiment we showed slight modification of the gut microflora of shrimps by *P. acidilactici*, favouring for example the presence of a strain of *Rhodobacter sp.* (unpub. results). Interestingly, a bacterium from the same genera has been found to increase digestive enzyme activities, including amylase, in the gut of *L. vannamei* (Wang, 2007).

Moreover, as for amylase, trypsin activity decreases with increased feeding rate. This result may partly explain the lower feed efficiency recorded for larger ration sizes, even if the decrease in K1 values recorded in both treatments as the feeding rate increased may also be the result of nutrient loss and wastage when food is provided in excess. Furthermore, the stability of the amylase/trypsin ratio is consistent with the fact that its modification would be mainly linked to changes in dietary composition, as previously reported in *L. vannamei* (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003). Values of amylase/trypsin were slightly higher but of the same order as those previously recorded for *L. vannamei* shrimps with similar body weights (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003).

Once glucose is produced in the digestive gland, it can be used as an energy source after phosphorylation to glucose-6-P. Glc-6-P is then delivered to the blood to be used as a source of energy in tissue via the glycolysis or the pentose pathway (synthesis of nucleotides, ribose units and NADPH). Several authors have shown that glycemia increases with an increase in

dietary CBH (Cousin, 1995, Rosas *et al.*, 2000, 2002). According to Abdel Rahman *et al.* (1979) and Cousin (1995), glucose is quickly released into the blood and remains high for several hours. In the present study, free glucose in haemolymph was found to slightly increase with ration size (Figure 2.C and Table 6). Rosas *et al.* (2002) showed a small increase in haemolymph glucose in *L. vannamei* fed diets with CBH levels from 0% to 33%. This result may suggest a control of glycemia in shrimps, as shown by other authors (Gutiérrez *et al.*, 2007). In our study, higher glycemia of the probiotic-treated shrimp fed at rations of 1 and 2% BM again suggests an effect of *P. acidilactici* on the use of dietary CBH.

Lygren and Hemre (2001) have previously shown a link between dietary CBH levels, glycogen content and antioxidant status in the liver of Atlantic salmon. These authors assumed that the liver CBH status highly influences the activity of key enzymes in the pentose-phosphate shunt, which is the link between CBH metabolism and the cellular redox status via the regeneration of NADPH (Fynn-Aikins *et al.*, 1992; Kashiwagi *et al.*, 1997). They showed that increased glycogen liver contents due to increased dietary CBH in the feed resulted in a decrease in the main antioxidant enzyme activities (Superoxide dismutase and Catalase). To explain their results, Lygren and Hemre suggested the effect of free glucose as a scavenger of OH-radicals (Sagone *et al.*, 1983) and as a stimulant of pentose phosphate activity (Kashiwagi *et al.*, 1997). Interestingly, we previously reported a decrease of these two antioxidant enzymes in shrimps *L. stylirostris* fed *P. acidilactici* compared to untreated animals (Castex *et al.*, submitted). Then, during the present study we measured the Total Antioxidant Status (TAS) of the shrimps in both the haemolymph and the digestive gland to assess whether the probiotic effect on dietary CBH utilization would have implication with regard to the antioxidant status of the shrimps.

Total antioxidant status (TAS) is an overall indicator of the antioxidant status of an individual (Rice-Evans and Miller, 1994). As the value increases, the antioxidant defence against oxidative stress increases. Using TAS to detect the actual antioxidant status in crustaceans has been limited to evaluations of the effects of astaxanthin on thermal, osmotic response and ammonia stress (Chien *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003). First of all, it is interesting to report that TAS measured in the digestive gland was found to decrease for larger ration sizes (3, 4 and 6%). Mean values of TAS recorded at 3, 4 and 6 % were similar to those reported previously ( $12.88 \pm 0.63 \mu\text{mol.g organ}^{-1}$ ) for shrimps *L. stylirostris* fed *ad libitum* (Castex *et al.*, submitted). It has been demonstrated that feed intake and digestion result in an increased

aerobic metabolism in shrimp *L. stylirostris* (Wabete, 2005). Interestingly, this phenomenon has been shown to rise with increased ingested feed in isopod *Ligia pallarii* (Carefoot, 1990). Thus a higher production of ROS in animals as ingested feed increases might explain the decreased TAS values observed in our study. Moreover, in crustaceans the composition of the digestive gland, mainly accumulating lipid (Luvizotto-Santos *et al.*, 2003) might also explain those results, as more antioxidants will be mobilized to face increased threat for lipid peroxidation at larger ration sizes.

We showed that the probiotic diet significantly increased TAS in both the haemolymph and the digestive gland except at the highest ration size (6%). This result confirms our previous study (Castex *et al.*, submitted). Then, according to the work of Lygren and Hemre (2001), the effect of *P. acidilactici* on the antioxidant status of the shrimp can be related to the suggested better use of dietary CBH. However, the significant improvement of TAS in the haemolymph and digestive gland of shrimps fed at 4% BM, although we postulated a saturation of the probiotic effect at this feeding rate, may also indicate the implication of other mechanisms. Indeed the specific action mechanisms of probiotic activity are probably very diverse and a combination of several action mechanisms is probably involved (Gatesoupe, 1999). For instance, the probiotic effect on antioxidant status might also be based on antioxidant properties of the strain as observed for other lactic acid bacteria used as probiotic (Kullisaar *et al.*, 2003),

In conclusion, the growth-ration method appears to be an interesting method that could be proposed as a way of understanding how a feed additive can influence nutrition and growth of the shrimp. Moreover, the original effect of *P. acidilactici* on CBH metabolism, and the way it may stimulate  $\alpha$  amylase activity in shrimp, should be further studied.

## Acknowledgments

We thank the technical staff of the experimental facilities at St Vincent, New Caledonia for their help.

## References

- Abdel Rahman, S.H., Kanazawa, A., Teshima, S. (1979). Effect of dietary carbohydrates on the growth and the level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 1491–1494.
- Abe, F., Ishibashi, N., and Shimamura, S. (1998). Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.*, 2838-2846.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 149–158.
- Bomba, A., Nemcoá, R., Gancarčíková, S., Herich, R., Guba, P., Mudroňová, D. (2002). Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition* 88, 95-99.
- Brett J.R. (1979) Environmental factors and growth. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish physiology*, Vol VIII. Academic press, New York, p 595-675.
- Brett J.R., Groves T.D.D. (1979) Physiological energetics. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds) *Fish physiology*, Vol VIII. Academic press, New York, p 279-352.
- Carefoot, T.H., 1990. Specific dynamic action (SDA) in the supralittoral isopod, *Ligia pallasii*: Effect of ration and body size on SDA. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 95, 317-320.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojouis, C. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182-193.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status in *Litopenaeus stylirostris* shrimp. *Aquaculture*, submitted.
- Cecile, S. (2006). Utilisation d'un bioessai *Artemia* pour caractériser les molécules actives d'une préparation microbienne commerciale à base de lactobacilles sur la physiologie digestive de crustacés. Mémoire de MASTER Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie - Spécialité Océanographie et Environnements Marins, Université Pierre et Marie Curie. pp. 71.
- Chien, Y.H., Pan, C.H., Hunter, B. (2003). The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture* 216, 177– 191.
- Cousin, M. (1995). Contribution à l'étude de l'utilisation des glucides et du rapport protéine/énergie chez *P. vannamei* et *P. stylirostris*. INA/PG thesis, Paris, Nov. 1995, 201 pp.
- Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., Aquacop. (1996). Digestibility of starch in *P. vannamei*: *in vitro* and *in vivo* study on eight samples of various origin. *Aquaculture* 140, 361–372.
- Doeschate ten, K.I., Coyne, V.E. (2008). Improved growth rate in farmed *Halilutis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174–179.
- Dubois, M.K., Lilles, L.A., Hamilton, J.C., Rebers, P.A., Smith, F. (1965). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Elliott J.M. (1975). The growth rate of brown trout (*Salmo trutta* L.) fed on reduced rations. *J. Anim. Ecol.* 44, 823-842.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of 2 chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Fynn-Aikins, K., Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H. (1992). Growth, lipogenesis and liver compositions of juvenile surgeon fed different levels of D-glucose. *Aquaculture* 105, 61-72.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P., Haard, N.F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J. Agric. Food. Chem.* 42, 1456–1461.
- Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.



- Guedes, C.M., Gonçalves, D., Rodrigues, M.A.M. (2008). Effects of age and mannanoligosaccharides supplementation on production of volatile fatty acids in the caecum of rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.10.004
- Gullian, M., Thompson, F., Rodríguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1–14.
- Gutiérrez, A., Nieto, J., Pozo, F., c, Stern, S., Schoofs, L. (2007). Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology* 153, 170–175.
- Irianto, A., Austin, B. (2002). Review probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633.
- Jauncey, K. (1982). The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture* 27, 43-54.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, L.A., Jalaludin, S. (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science Technology* 70, 197-209.
- Kashiwagi, A., Nishio, Y., Asahina, T., Ikebuchi, M., Harada, N., Tanaka, Y. (1997). Pyruvate improves loading in Atlantic salmon during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 61, 145-157.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, J., Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., and Zilmer, M. (2003). Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition* 90, 449-456.
- Kureshy, N., Davis, A., (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204, 125-143.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193-201
- Lin, H.Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W., Li, Z.J. (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone *Aquaculture Research* 35, 1441-1447.
- Ling, N., Cotter, D. (2003). Statistical power in comparative aquaculture studies. *Aquaculture* 224, 159-168.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S. (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Pereira-Branco, Z., Bianchini, A., Maia-Nery, L.E. (2003). Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295A, 200-205.
- Lygren, B., Hemre, G-I. (2001). Influence of dietary carbohydrate on antioxidant enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture International* 9, 421-427.
- Malloy, K.D., Targett, T.E. (1994) Effects of ration limitation and low temperature on growth, biochemical condition, and survival of juvenile summer flounder from two Atlantic coast nurseries. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 182-193.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T., Simpson, K.L. (1982). Effect of short necked clams diet on shrimp growth and digestive enzyme activities. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 48, 1758-1764.
- Mombelli, B., Gismondi, M.R. (2000). The use of probiotics in medical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16, 531-536.
- Ouweland, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 279–289.
- Pan, C-H, Chien, Y-H., Hunter, B. (2003). The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297, 107-118.

- R Development Core Team. (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234, 279–293.
- Reid, G. (2008). Probiotics and prebiotics. Progress and challenges. *International Dairy Journal* 18, 969–975.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191, 271–288.
- 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.
- Sagone, A.L. Jr., Greenwald, J., Kraut, E.H., Bianchine, J., Singh, D. (1983). Glucose: A role as free radical scavenger in biological system. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 101, 97–103.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Marine Biol.* 340, 184–193.
- Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L.E., Vargas-Albores, F., Latchford, J. (1999). Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 176, 271–283.
- Staples D.J., Nomura M. (1976). Influence of body size and food ration on the energy budget of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 9, 29–43.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, S., Firat, K., Otgucuoğlu, O., Küçüksarı, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140–145.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino, I.J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 234, 415–427.
- Van Wormhoudt, A., Cruz, E., Guillaume, J., Favrel, P. (1986). Action de l'inhibiteur trypsique de soja sur la croissance et l'activité des enzymes digestives chez *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda): rôle éventuel des hormones gastro-intestinales. *Oceanis*, 12, 305–319.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 501–507.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27, 319–326.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 404–427.
- Wabete, N. (2005) Etude écophysiologique du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Thesis presented at Université Bordeaux 1. Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
- Wang, Y.B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259–264.
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1–4.
- Wang, Y.B., Xu, Z.R. (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127, 283–292.

- Yu, M.C., Li, Z.L., Lin, H.Z., Wen, G.L., Ma, S. (2008). Effects of dietary *Bacillus* and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity, and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.* 16, 471-480.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516-524.

## CONCLUSION

Le méthode croissance-ration, adaptée ici à la crevette, se révèle être particulièrement sensible et adéquate pour mesurer les besoins nutritionnels et la transformation de l'aliment.

Un premier résultat est qu'en travaillant avec des animaux marqués individuellement et regroupés en bacs, nous avons pu déterminer la relation croissance-ration à l'aide d'un modèle linéaire mixte ( $RGR = \text{croissance relative journalière} = -0,052 x^2 + 0,554 - 0,660$ , pour des crevettes sub-adultes de  $16,92 \pm 0,22\text{g}$  élevées à  $27^\circ\text{C}$ ). Les modèles mixtes sont rarement utilisés pour les recherches sur la nutrition des crevettes (Burford *et al.*, 2004) mais offrent pourtant l'intérêt de tenir compte d'un effet « aléatoire » modélisant un possible effet bac (Jobling & Koskela, 1996). Selon Ling et Cotter (2003) ces modèles devraient être systématiquement utilisés pour analyser les données d'expérimentations dans lesquelles les animaux sont regroupés au sein d'unités expérimentales (bacs ou blocs). Par ailleurs, nous concluons qu'un modèle mixte continu, tel que celui utilisé dans ce travail (Article 2), serait le plus adapté pour tester statistiquement l'effet d'un traitement alimentaire sur la réponse croissance-ration. Cependant cette méthode ne permet pas de déterminer la quantité d'aliment ingéré par un animal élevé en groupe, et il n'est donc pas possible d'utiliser un tel modèle pour calculer les besoins nutritionnels au niveau individuel. Pour ce faire, nous proposons d'utiliser un modèle linéaire à effet fixe utilisant cette fois le bac comme unité expérimentale.

Nous avons ainsi déterminé que 24 % ( $166,3 \text{ KJ} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ ) de l'énergie digestible ingérée est allouée à l'entretien et 43 % ( $294,8 \text{ KJ} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$ ) à la croissance chez des crevettes de 17 g élevées à  $27^\circ\text{C}$  (Article 2). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que des mesures directes en respirométrie ont abouti à des valeurs équivalentes du métabolisme d'entretien ( $116$  et  $313 \text{ KJ} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$  respectivement au repos et après un repas) (Wabete, 2005).

Nous avons ensuite appliqué cette méthode à l'étude du probiotique (Article 3), cependant nous nous sommes limités à l'utilisation d'un modèle mixte à variables discrètes car la relation croissance-ration, déterminée dans les conditions de cette expérimentation, n'était pas linéaire, et aurait nécessité la contribution d'un statisticien (Gurka & Edwards, 2008). Notons aussi que, pour ce travail, nous avons raisonné en terme de quantité de probiotique ingérée constante quelle que soit la ration d'aliment ( $4 \cdot 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ).

L'effet du probiotique s'est traduit ici par un gain de croissance ( $4,5 \text{ g.Kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  contre  $3,3 \text{ g.Kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  chez les animaux témoins à la ration optimale), et par une baisse des coefficients brut et net d'efficacité alimentaire (respectivement K1 & K2). Le K1 max a ainsi été amélioré de près de 38 %, ce qui indique clairement une meilleure transformation de l'aliment. Quant au K2, il a été amélioré de 37 % à la ration optimale ( $R_{\text{opt}}$ ), suggérant une meilleure transformation de la part de l'aliment ingéré allouée à la croissance (Scope for growth). En outre, le probiotique a entraîné une diminution des besoins alimentaires nécessaires à l'entretien ( $R_m$ ) et à la croissance optimale ( $R_{\text{opt}}$ ).

Comme suggéré dans l'article 3, ces résultats pourraient s'expliquer par trois mécanismes indépendants ou associés: (i) une meilleure utilisation de l'aliment, (ii) un effet au niveau du métabolisme d'entretien, et (ii) un apport de facteurs de croissance et/ou de nutriments essentiels (Figure 3.16).

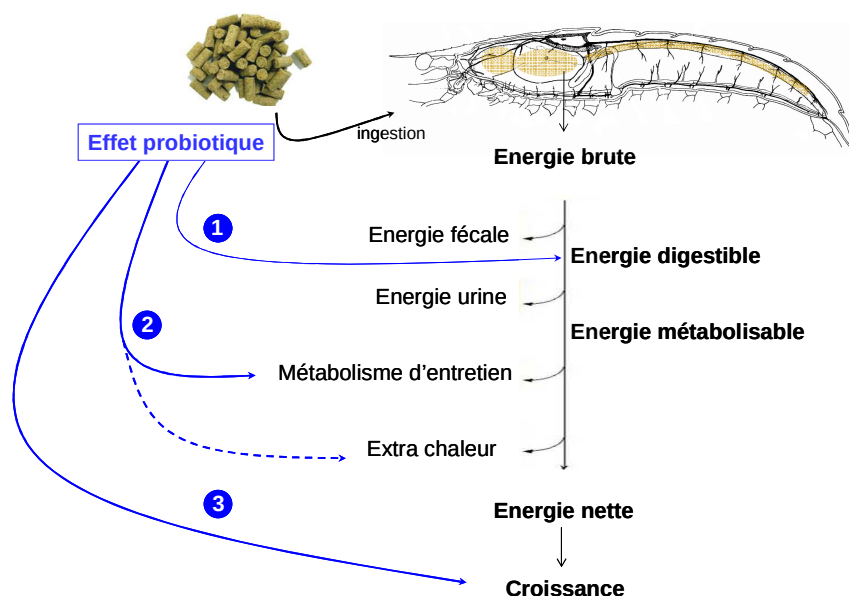


**Figure 3.16.** Représentation schématique des différentes hypothèses formulées afin d'expliquer l'effet du probiotique sur l'efficacité alimentaire et la croissance des crevettes. **1** Amélioration de l'utilisation de l'aliment en augmentant la fraction d'énergie digestible. D'après nos résultats il semblerait que *P. acidilactici* permette une meilleure utilisation des carbohydrates. Cet effet passerait notamment par une stimulation de l'activité digestive et notamment de l' $\alpha$  amylase. **2** Effet du probiotique sur l'activité métabolique. La réduction des besoins alimentaires nécessaires à l'entretien, déterminée à l'aide de la courbe croissance-ration, suggère que le probiotique abaisserait la demande métabolique pour l'entretien des animaux. Un effet sur le métabolisme pourrait également se traduire par une réduction, au moment de la digestion, du pic d'extra-chaleur non mesuré au cours de cette étude. **3** Enfin le probiotique pourrait (i) constituer une source de nutriments essentiels à la crevette et/ou (ii) produire des substances favorisant la croissance de l'animal (vitamines, facteurs de croissance...).

Au cours de notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à **la première hypothèse**. En effet, il est couramment supposé que l'effet des probiotiques sur la croissance reposerait sur une amélioration de l'utilisation de l'aliment par une stimulation de l'activité digestive de l'hôte et/ou par l'apport additionnel d'enzymes exogènes (amylases, protéases, lipases, alginate lyase,...) produites par le probiotique (Lara-Flores *et al.*, 2003 ; Ziaie-Nejad *et al.*, 2006 ; Wang, 2007 ; Doeschate and Coyne, 2008). Les résultats obtenus au cours de cette étude sont en accord avec ces travaux. En effet, l'amélioration significative de l'efficacité de conversion brute (K1) de l'aliment des animaux nourris au probiotique a été associée ici à une plus grande activité  $\alpha$  amylasique. De plus, les mesures des teneurs en glycogène et en glucose dans la glande digestive et l'hémolymph ont conduit à penser que cet effet pourrait reposer sur une meilleure digestion des carbohydrates (CBH) alimentaires (Voir figure 3.17). Cependant, le mécanisme par lequel *P. acidilactici* agit sur l'activité  $\alpha$  amylasique, à l'origine de cette hypothèse, reste inconnu. Certains auteurs ont attribué des effets similaires à une production d'enzymes exogènes par la bactérie (Bairagi *et al.*, 2002, 2004 ; Ochoa-Solano and Olmos-Soto, 2006). Cependant il est fréquemment rapporté que ce phénomène ne pourrait pas, à lui seul, expliquer les différences quantitatives observées, ce qui suggère qu'il y aurait également une stimulation de l'activité des enzymes digestives de l'hôte (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006). Ainsi, Cecile (2006) a montré que des produits extracellulaires de nature protéique sécrétés, dans certaines conditions, par *Lactobacillus farciminis* MA27/6R et *Lactobacillus rhamnosus* MA27/6B, pouvaient stimuler l'activité trypsique et  $\alpha$  amylasique chez l'Artémia. Ainsi, il serait intéressant de réaliser le même type d'étude avec *P. acidilactici* afin d'investiguer le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) il exercerait son action sur l'activité digestive de la crevette.

De plus, les résultats sur le statut antioxydant total (TAS) dans la glande digestive et l'hémolymph viennent renforcer l'hypothèse d'une meilleure digestion des CBH alimentaires. En effet Lygren et Hemre (2001) ont montré, chez le saumon Atlantique, une relation entre la disponibilité en CBH alimentaires et le niveau des défenses antioxydantes. Ces auteurs invoquèrent le lien entre le métabolisme des CBH et le statut antioxydant de l'animal via la régénération de NADPH et la capacité du glucose à piéger certains radicaux libres. L'amélioration du statut antioxydant, et la meilleure utilisation des CBH des crevettes nourries avec le probiotique, vont dans le sens de cette hypothèse. Néanmoins, l'augmentation de la TAS pourrait aussi avoir d'autres origines, comme par exemple un effet direct du probiotique via des propriétés antioxydantes (Kullisaar *et al.*, 2003).

Avant de conclure quant à cette première hypothèse, notons que des mesures de digestibilité pour les différentes classes de nutriments seraient particulièrement utiles. Des études préliminaires au laboratoire ont permis de déterminer le coefficient apparent de digestibilité (CAD) de notre aliment expérimental à l'aide de la méthode indirecte, en utilisant la célite® comme marqueur inerte. D'après Smith et Tabrett (2004) cette méthode est fiable si les fécès sont collectés pendant au moins 5 jours à l'aide de 8 bacs contenant 2 crevettes, ou pendant 10 jours à l'aide de 6 réplifications. Malheureusement, par manque de temps nous n'avons pas pu réaliser une telle étude en vue de comparer la digestibilité de l'aliment standard et de l'aliment supplémenté en probiotique. Précisons que, chez les crevettes, très peu d'études se sont attachées à mesurer les effets de probiotiques sur la digestibilité de l'aliment (Lin *et al.*, 2004), cela pouvant probablement s'expliquer par la difficulté expérimentale à obtenir des mesures fiables du CAD.

**La seconde hypothèse** concernant un effet sur le métabolisme a été suggérée par deux observations, (i) des besoins d'entretien inférieurs chez les animaux recevant le probiotique, et (ii) une perte de poids des animaux témoin nourris à la ration 1 % contrairement à ceux nourris à la même ration supplémentée en probiotique. A notre connaissance, un tel résultat n'a jamais été rapporté dans la littérature. Afin de tester cette hypothèse, des études comparatives du métabolisme de base et post-prandiales par des mesures de respirométrie pourraient être envisagées. Cependant la sensibilité de ces mesures devra être suffisamment élevée pour détecter des différences correspondant à un gain d'environ 0.1 % du poids des animaux par jour. Soulignons qu'un niveau de métabolisme abaissé chez les animaux nourris au probiotique entraînerait une baisse de la production de ROS par le métabolisme aérobie et expliquerait aussi l'élévation du statut antioxydant mesurée chez ces derniers.

Enfin, **la dernière hypothèse** faisant intervenir l'apport de facteurs de croissance ou de nutriments essentiels par la bactérie probiotique devrait également être considérée. L'élévation du coefficient net d'efficacité alimentaire, qui signifie une meilleure transformation de la part de l'aliment retenu pour la croissance, semble aller dans le sens de cette hypothèse. Il est admis que la flore intestinale serait une source supplémentaire de nutriments et pourrait fournir des vitamines, des enzymes ou encore des acides aminés essentiels (Dall and Moriarty, 1983). Au travers de leurs études chez les *Artemii* et les rotifères, Gorospe *et al.* (1996) et Yu *et al.* (1998) proposèrent que l'effet probiotique pouvait

être fondé sur un apport supplémentaire en protéines, ou en acides aminés essentiels, et en vitamines (vitamine B12).

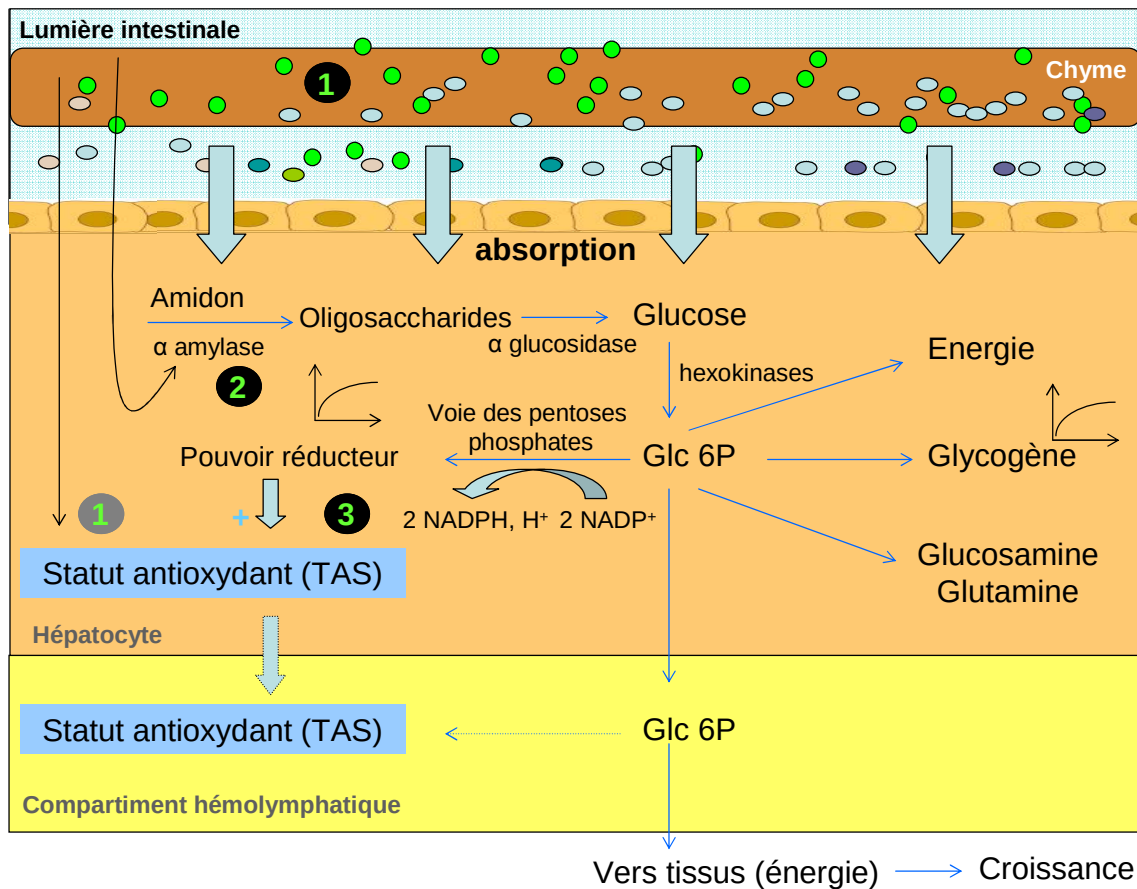


**Figure 3.17.** Scénario explicatif des effets mesurés de *P. acidilactici* sur la croissance, l'utilisation de l'aliment et la nutrition de *L. stylirostris*. ❶ Le probiotique pourrait tout d'abord exercer une action de pré-digestion de l'aliment par la production d'enzymes exogènes.

❷ Il pourrait aussi stimuler l'activité  $\alpha$  amylasique de l'hôte par un mécanisme inconnu et conduire à une meilleure utilisation des carbohydrates (CBH). Ceci permettrait une plus grande disponibilité en substrat énergétique (Glucose 6 phosphate (Glc 6P)) et une mise en réserve plus importante (glycogénolyse). Chez *L. stylirostris*, l'activité de l' $\alpha$  amylase et la concentration en glycogène dans la glande digestive saturer au-delà de certaines teneurs en carbohydrates (CBH) alimentaires (Rosas *et al.*, 2000). Ces deux éléments contrôlraient l'utilisation des CBH chez la crevette (Rosas *et al.*, 2002). Ainsi, au delà du seuil de saturation, le probiotique ne pourrait plus exercer son effet, et c'est ce que nous observons pour une ration alimentaire de 4% et plus. ❸ Une plus grande absorption de glucose conduirait aussi à une élévation du pouvoir réducteur via la voie des pentoses phosphates (régénération de NADPH). Le rôle du glucose dans le piégeage de certains radicaux libres serait également impliqué.

❶ Finalement, le probiotique pourrait aussi exercer une action directe sur la TAS via ses propriétés antioxydantes (Kullisaar *et al.*, 2003).



Ceci a notamment été démontré par Doeschate and Coyne (2008) chez l'ormeau. Cependant, d'une manière générale peu de travaux sur cet aspect existent chez la crevette, cela étant probablement dû à la difficulté à démontrer *in vivo* ce type de mécanisme. Il serait intéressant de réaliser un travail de caractérisation des produits extracellulaires de *Pediococcus acidilactici*, comme cela a précédemment été réalisé par Cecile (2006) chez d'autres bactéries lactiques utilisées comme probiotiques. Enfin, une production de facteurs de croissance par le probiotique n'est pas non plus à exclure, bien qu'à notre connaissance, aucun travail chez les Crustacés n'ait mis en évidence un tel phénomène.

Avant de conclure, précisons aussi qu'un effet indirect du probiotique à ces différents niveaux (utilisation de l'aliment, métabolisme et apport nutritionnel direct), *via* une modification de la flore intestinale, pourrait être envisagé. Bien que le travail sur le sujet ait été limité au cours de cette thèse, une meilleure caractérisation des actions du probiotique sur les communautés bactériennes intestinales permettrait d'apporter des éléments de réponse complémentaires. L'utilisation de la DGGE a en effet permis de montrer quelques différences dans la composition intestinale de la flore des animaux traités au probiotique, avec notamment la présence d'une bande correspondant à *Rhodobacter sp.* Notons qu'il a été rapporté que des souches appartenant à cette espèce avaient des effets probiotiques chez la crevette, comme par exemple une stimulation de l'activité digestive de l'hôte montré récemment par Wang (2007).

En conclusion, ce chapitre a permis d'évaluer les effets du probiotique sur la nutrition et la croissance de la crevette, et de proposer des pistes quant aux mécanismes mis en jeu. Ainsi, un premier scénario de ses effets au niveau de l'utilisation des carbohydrates, en relation avec le statut antioxydant, a été proposé. A ce stade, il nous a semblé intéressant d'approfondir la question du statut antioxydant, et d'étudier l'influence du probiotique sur ce dernier chez des crevettes saines et infectées par un vibrio pathogène.

---

**Troisième chapitre :**

**Effets du probiotique *P.acidilactici* sur le statut antioxydant de *Litopenaeus stylirostris* et sur le stress oxydant induit par une infection bactérienne**

---



## INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux effets du probiotique sur la physiologie de la crevette au travers de l'étude de ses défenses antioxydantes et des dégâts oxydatifs induits par le stress oxydant suite à une infection bactérienne. Chez la crevette, quelques rares travaux ont montré qu'une infection par des pathogènes pouvait conduire à un stress oxydant *via* une accumulation de ROS liée à la réponse immunitaire (Mathew *et al.*, 2007). L'espèce qui nous intéresse ici, *L. styirostris*, serait d'autant plus exposée à ces attaques radicalaires que son métabolisme de base est particulièrement élevé (Wabete, 2005).

Par ailleurs, certains auteurs ont montré un effet des probiotiques sur la réponse immunitaire et la production de ROS chez la crevette (Rengpipat *et al.*, 2000). Cependant aucune étude spécifique n'a évalué l'interaction des effets d'une infection bactérienne et d'un traitement probiotique sur le stress oxydant.

Notre travail s'est ici organisé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous nous sommes attaché à évaluer l'effet du probiotique sur le statut antioxydant et le niveau de stress oxydant chez des crevettes saines. Parallèlement nous avons mesuré cet effet chez des animaux infectés naturellement par *V. nigripulchritudo* (Article 4). Enfin, nous avons suivi la réponse antioxydante et le développement du stress oxydant au cours d'une infection expérimentale par le pathogène *V. nigripulchritudo* SFn1 (Article 5).



**Article 4: Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*<sup>1</sup>**

Mathieu Castex<sup>a\*</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup> and Liet Chim<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD/NC),  
Campus de l'IRD, Anse Vata, BP 2059, 98848 Nouméa Cedex, New-Caledonia.

Keywords: shrimp, probiotic, oxidative stress, antioxidant defences, vibriosis

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 76 ; fax : +687 35 11 77

E-mail address: [mcastex@ifremer.fr](mailto:mcastex@ifremer.fr)

---

<sup>1</sup> Sous presse « Aquaculture »





Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)

# Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*

Mathieu Castex\*, Pierrette Lemaire, Nelly Wabete, Liet Chim

IFREMER, Département Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD/NC), Campus de l'IRD, Anse Vata, BP 2059, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 September 2008

Received in revised form 8 June 2009

Accepted 9 June 2009

Available online xxxx

### Keywords:

Shrimps

Probiotic

Oxidative stress

Antioxidant defences

Vibriosis

## ABSTRACT

In this study we evaluated the effects of the probiotic *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (also called *Penaeus stylirostris*), first on antioxidant defences and secondly on the oxidative stress status in the shrimps' haemolymph and digestive gland.

We conducted two experiments with the same protocol in which shrimps were fed two diets for three weeks: a control diet and a probiotic diet containing 1 g of live *P. acidilactici* MA18/5M kg<sup>-1</sup>. In the first experiment, the shrimps were found to be healthy over the trial period; no mortalities and non-detectable signs of infection were recorded. These resulted in high final survival rates (above 90% in both treatments). On the other hand, during the second trial, carried out at a period of increased risk for an outbreak of the summer syndrome, higher mortalities were recorded, associated with high *V. nigripulchritudo* prevalence and loads in the shrimp haemolymph. In healthy shrimps (trial 1), no detectable response of the antioxidant defence system and of oxidative stress bio-indicators were observed. However, feeding the probiotic significantly increased the total antioxidant status (TAS) and glutathione peroxidase activity, while all other parameters remained significantly unchanged.

In the shrimps exposed to *V. nigripulchritudo* (trial 2), the antioxidant response was characterized by higher antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase and catalase) and higher oxidative stress level in the digestive gland (higher oxidized/reduced glutathione ratio, higher malondialdehyde and carbonyl protein contents) compared to levels found in trial 1. However, shrimps fed the probiotic diet exhibited (i) significantly higher final survival rates (67 ± 3%) compared to the control (47 ± 4%) and (ii) a lower prevalence of *V. nigripulchritudo* throughout the trial. Moreover, the antioxidant response and the oxidative stress level recorded in the digestive gland with shrimps submitted to the probiotic diet were lower.

In the light of these results, we confirm that *P. acidilactici* enrichment in shrimps' diet seems an effective way of reducing the susceptibility of shrimps to bacterial pathogens.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Marine shrimps, like other aquatic animals, are constantly threatened by micro-organisms such as fungi, bacteria and protozoa, which can greatly affect their health and well-being. Under farming conditions, pathogen pressure can be higher leading, in some cases, to dramatic crop failures, as observed over the past three decades with marine shrimp cultures affected by vibriosis (Lightner, 1988; Lin, 1995).

Shrimp farming in New Caledonia today faces two main challenges in terms of diseases implicating bacterial pathogens: the "Syndrome 93" (Mermoud et al., 1998) and the "summer syndrome" (Goarant et al., 2006). The latter phenomenon is causal linked to infectious identified to be due to strains of *V. nigripulchritudo* (Goarant et al., 2006). In recent years, biological control of these diseases, affecting aqua-cultured species especially bacteriological disorders including environmentally friendlier

methods such as the use of probiotics, has become an important subject of investigations (Gatesoupe, 1999; Vershuere et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Vine et al., 2006). Recent works carried out in farm-scaled studies have demonstrated the beneficial effects of feeding the probiotic strain, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, to shrimps *Litopenaeus stylirostris* (also called *Penaeus stylirostris*) naturally infected with *Vibrio nigripulchritudo* (Castex et al., 2008).

Apart from pathogen pressure, reared shrimps are also subject to temperature changes and other environmental perturbations which can severely affect their physiological state (Le Moullac and Haffner, 2000; Wabete et al., 2008). An emerging field of study in physiology of aquatic species is therefore increasingly focusing on "oxidative stress", especially since many authors have reported the effect of environmental perturbations on oxidative stress. Such studies include elucidation of the presence of a wide range of contaminants (xenobiotics) (Winston and Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001; Manduzio et al., 2005; Ferreira et al., 2005), UV radiation, hypoxia and hyperoxia (Halliwell and Gutteridge, 1999; Zenteno-Savín et al., 2006), and other environmental physico-chemical

\* Corresponding author. Tel.: +687 35 25 76; fax: +687 35 11 77.

E-mail address: [mcastex@ifremer.fr](mailto:mcastex@ifremer.fr) (M. Castex).



parameters (Le Moullac and Haffner, 2000; Abele et al., 2002; Lesser, 2006) being linked to changes to physiological states of shrimps.

Oxidative stress results from either increased exposure or production by the organism of reactive oxygen species (ROS) or from a decrease in the antioxidant defences due to exposure, resulting in oxidative damage to lipids, protein and nucleic acid. ROS include several reactive oxygen intermediates (ROIs) such as superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $OH^\bullet$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and singlet oxygen ( $O_2^1$ ). ROS are continually produced in animals during normal aerobic metabolism (Livingstone, 2001). However, the rate or amount of ROS production depends on the metabolic rate of the species under consideration and can be increased by environmental stress, as shown for penaeid shrimps (Zenteno-Savín et al., 2006; Wang and Chen, 2006; Cheng et al., 2007; Lemaire and Chim, 2007). The reported exceptionally high oxygen consumption capacity of the shrimp, *L. stylirostris* (Wabete et al., 2006) makes this species particularly sensitive to oxidative stress.

ROS production is also implicated in the immune response mechanism to both prokaryotic and eukaryotic pathogens (Adema et al., 1991). In crustaceans, once a pathogen enters the haemolymph, NADPH-oxidase is activated in the hemocyte of the host, which in turn reduces oxygen and subsequently produces several reactive oxygen intermediates. This process, known as respiratory burst, is well documented for aquatic species and recently demonstrated in penaeid shrimps (Muñoz et al., 2001). The immune system and the antioxidant defence system are closely linked to responses due to pathogens and other stress-related issues that might lead to respiratory burst (Holmblad and Söderhäll, 1999). It has even been suggested that the antioxidant and oxidative responses could become useful parameters for evaluating the *in vivo* immune response(s) in cultured organisms exposed to given environmental perturbations due to biotic parameters or pathogenic micro-organisms (Campa-Cordova et al., 2005).

Many studies have also examined antioxidants pressures in aquatic invertebrates, but few have focused on crustaceans (Holmblad and Söderhäll, 1999). With respect to shrimps, most of these studies have evaluated the effect of pollutant or environmental parameters on “oxidative stress” (Gonzalez-Rey et al., 2006; Zenteno-Savín et al., 2006; Li et al., 2008). However, very few have reported the effect of pathogen infection on antioxidant defences in penaeid shrimps (Rameshthangam and Ramasamy, 2006; Liu et al., 2007a; Zhang et al., 2008; Hsieh et al., 2008). Most of the scientific studies carried out to evaluate the effect of probiotics on aquatic farmed animals, apart from demonstrating improvement in survival and growth of the host species have generally focused on nutrition, antagonism toward pathogens, and immunity of the host (Rengpipat et al., 2000; Alavandi et al., 2004; Li et al., 2007; Rodríguez et al., 2007). However, there are very few articles reporting on the effects of dietary additives on oxidative status of cultured shrimps (Liu et al., 2007b; Chiu et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate, firstly, the possible effect of dietary *P. acidilactici* supplementation on the antioxidant defences and oxidative stress status in *L. stylirostris*. This effect was evaluated in two different situations: healthy shrimps and shrimps infected by *V. nigripulchritudo*. We also looked at oxidative damage to lipids and proteins to evaluate oxidative stress status by measuring respectively malondialdehyde (MDA), which is a commonly used indicator to evaluate lipid peroxidation, and carbonyl proteins which is recently being used as biomarker of oxidative damage to protein in fish (Parvez and Raisuddin, 2005).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Shrimps

The shrimps *L. stylirostris* used in our experiments were reared semi-intensively (without aeration) in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) at the Saint-Vincent station (Ifremer). The ponds were stocked with 20-day post-larvae (PL20), at a density of 20 animals m<sup>-2</sup>. It usually takes 3 to

4 weeks for the animals to reach 1 g. Thereafter the growth rate is estimated to be approximately 1 to 1.4 g per week. The experiments in this study were carried out with shrimps of  $12.79 \pm 2.72$  g and  $6.2 \pm 0.7$  g for the first and second trials respectively.

### 2.2. Feeds tested

Shrimps were fed an experimental feed produced in the laboratory (Table 1): the ingredients were ground up in a laboratory grinder (Retsch®) with a 1 mm 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 in a meat grinder through a 3 mm die. Next, the entire mixture was dried in a drying oven (Venticell® 222) until a residual humidity less than 10% was obtained, and then broken up into pellets of 4–5 mm in length. The commercial probiotic diet preparation tested was Bactocell® PA 10 (Lallemand Animal Nutrition S.A., Blagnac, France) formulated with live *P. acidilactici* MA18/5M (Institut Pasteur, Paris, France).

For the treated group, 1 g kg<sup>-1</sup> of the probiotic (powder form) was top-coated on the laboratory produced feed pellets using 2% of fish oil as a carrier, giving a final concentration of  $1.8 \pm 10^7$  CFU and  $9.5 \pm 10^6$  CFU of *P. acidilactici* per gram of diet for trials 1 and 2 respectively. The probiotic concentration in the feed was checked after diet formulation by counting *P. acidilactici* strains on MRS plates using serial dilution. The control diet was also top-coated with 2% fish oil and, prior to use, checked for possible contamination by the probiotic strain. The feed was then stored in 5-litre boxes at 20 °C until use.

### 2.3. Experimental design

In this study, two trials were conducted. Both trials (trial 1 and trial 2) were carried out using the same protocol. *L. stylirostris* obtained from the earthen ponds were transferred into 8 circular polyester tanks (capacity 1600 l). The animals were caught in the ponds using a cast net and transferred to the tanks in plastic containers (50 l) filled with seawater. One hundred individuals were put into each tank and acclimatized for one week prior to the beginning of the experiment using a previously described protocol, to reduce stress of transfer and

**Table 1**  
Composition of the experimental diet.

| Ingredients                                     | %    |
|-------------------------------------------------|------|
| LT Fish meal <sup>a</sup>                       | 30   |
| Soy bean meal <sup>b</sup>                      | 20   |
| Wheat meal <sup>c</sup>                         | 37   |
| Wheat gluten                                    | 7    |
| Fish oil                                        | 0    |
| Soy oil                                         | 2    |
| Soy lecithin <sup>d</sup>                       | 2    |
| Shrimp vitamin premix <sup>e</sup>              | 0.05 |
| Shrimp trace mineral premix <sup>f</sup>        | 0.1  |
| Stay C (330 mg/kg) <sup>g</sup>                 | 0.04 |
| <i>Composition (analysed, dry matter basis)</i> |      |
| Protein <sup>h</sup> (%)                        | 43.8 |
| Fat <sup>i</sup> (%)                            | 10   |
| Fiber <sup>j</sup> (%)                          | 2    |
| Ash <sup>k</sup> (%)                            | 6.9  |
| Gross energy (kcal kg <sup>-1</sup> )           | 4502 |

<sup>a</sup> Chilean low temperature fish meal from anchovy and Jack Mackerel.

<sup>b</sup> Dehulled soybean meal solvent extracted.

<sup>c</sup> Whole wheat grain for animal feed.

<sup>d</sup> Ultrales® lecithin from ADM lecithin, Decatur, IL, USA.

<sup>e</sup> Vitamin premix SICA Cie.

<sup>f</sup> Mineral premix SICA Cie.

<sup>g</sup> ISO5983 standard.

<sup>i</sup> NF V18-117/B standard.

<sup>j</sup> NF V03-040 standard.

<sup>k</sup> NF V18-101 standard.

associated subsequent mortalities (Wabete et al., 2006). Each tank was continuously oxygenated by injection of high pressure air and supplied with seawater pumped into the lagoon with a water renewal rate of 200% per day. Temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset).

From the first day of the trial to the end, shrimps were assigned to two treatments with four replicate ( $n=4$ ) tanks per treatment: shrimps were fed with the control diet versus the probiotic diet. Shrimps from both treatments were fed *ad libitum* four times a day and the amount of feed was adjusted daily to minimise left-overs. Following the 22-day feeding period, shrimps at the inter-moult stage were randomly sampled after 12 h starvation for microbiological and biochemical analysis in the haemolymph and digestive gland.

Both trials were conducted during the summer season with water temperature above 25 °C. The first trial was carried out in early November ( $25.9 \pm 1.9$  °C), with the second carried out in February when the summer syndrome linked to proliferation by *V. nigripulchritudo* is known to occur. Indeed during this period, the temperature is optimal ( $27.2 \pm 2.0$  °C in this experiment) in terms of encouraging the risk of the outbreak of “summer syndrome” (Lemonnier et al., 2006). Smaller animals ( $6.2 \pm 0.7$  g), were used in this second trial as outbreaks related to the summer syndrome have been most frequently observed during this phase of shrimp's rapid growth (Lemonnier et al., 2006).

#### 2.4. Microbiological count in haemolymph

When experiments are conducted during the summer season in New Caledonia with sand-filtered sea water, the prevalence and load of *V. nigripulchritudo* in the haemolymph of the shrimps (healthy and moribund) are systematically determined as a routine measurement, in order to assess the presence and the implication of the *Vibrio* species if relatively higher mortalities have occurred. In this study, *V. nigripulchritudo* prevalence and load were determined at the start (day 0), mid-term (day 11) and at the end of the trials (day 22). The haemolymph were collected from the ventral-sinus cavity (venous blood), using a 1 ml sterile needle and syringe, from 5 and 10 shrimps per tank at days 11 and day 22 respectively after rinsing the shrimps with sterile seawater. Samples were then plated on Marine Agar (w/v) 2% glycerol added (MAG), on which *V. nigripulchritudo* colonies produce grey to black pigments (Baumann and Schubert, 1984). At day 0, a total of 30 shrimps were sampled and analysed in the same way. Plates were incubated for 72 h to 96 h at 29 °C. Putative *V. nigripulchritudo* colonies were counted and recorded *per animal*. The prevalence was determined as the percentage of animals presenting at least one *V. nigripulchritudo* species colony, and the load as the number of colonies per infected animal. During trial 2, moribund shrimps ( $n=4$ ) were sampled, irrespective of the treatment, and their haemolymph were subjected to haemoculture.

#### 2.5. Measurement of oxidative stress parameters

Antioxidant defenses were measured by the level of production of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), glutathione levels (reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms) and total antioxidant status (TAS).

##### 2.5.1. Sampling and preservation

On day 22 in both trials, ten shrimps per tank were randomly sampled in order to measure oxidative stress parameters. Only shrimps in the inter-moult (stage C-D0) were used. This was to minimize internal variations, and because changes in physiological functions are generally observed during the moulting stage in crustaceans. Individual shrimps were caught and 100 µl of haemolymph were withdrawn from the ventral sinus cavity using a 23-gauge needle and 1 ml syringe. Then 10 µl haemolymph of the samples were immediately diluted in 100 µl pre-cooled Tris buffer 10 mM, 1 mM

DTPA, 1 mM PMSF, pH 7.4 and 25 µl was further diluted in 25 µl trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA. Samples were then immediately frozen and stored at  $-80$  °C until assays were required to be conducted.

The digestive gland were also removed from sampled shrimps and immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at  $-80$  °C. For the assays, the organs were first defrosted, divided into two parts and each part weighed. One part was homogenized in Tris buffer 10 mM, 1 mM DTPA, 1 mM PMSF, pH 7.4 and the other part in trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA specifically for total antioxidant status (TAS) determination. The diluted haemolymph and digestive gland homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatants kept at  $-80$  °C until required to be analysed. For glutathione assays, the supernatants were neutralised with 6% metaphosphoric acid before storage.

#### 2.5.2. Biochemical analysis

**2.5.2.1. 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 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  $H_2O_2$  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  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 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 standard. All of these methods have been adapted for the micro-plate reader Synergy HT (Biotek®). Enzymatic activities units were all expressed as specific activities (IU mg of protein $^{-1}$ ).

##### 2.5.2.2. Glutathione assays and total antioxidant status determination.

The total amounts of GSH and GSSG were determined spectrophotometrically using 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid according to the method of Akerboom and Sies (1981). The GSSG/GSH ratio, a valuable biomarker of oxidative stress, positively correlated with oxidative stress level (Storey, 1996), was systematically calculated.

TAS is a quantitative measurement which represents the total contribution from a wide range of antioxidant molecules (Prior and Cao, 1999). As the value increases, the antioxidant defences against free radical reaction increases. 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). Total antioxidant status (TAS) was determined using the Randox Kit, referred to as the “Total Antioxidant Status Kit” (Randox Co., Antrim, UK). 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 the measurement of the total amount of blood antioxidants by inhibition of the transformation of 2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS®) into the radical cation (ABTS® $^{+}$ ) in the presence of a peroxidase (metmyoglobin) and  $H_2O_2$ .

**2.5.2.3. 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, supernatants were incubated at room temperature for 1 h with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNTP) dissolved in 2 M HCl to allow DNTP to bind to the carbonyl groups (Levine et al., 1994). Blanks were run with HCl only. Afterwards, proteins were

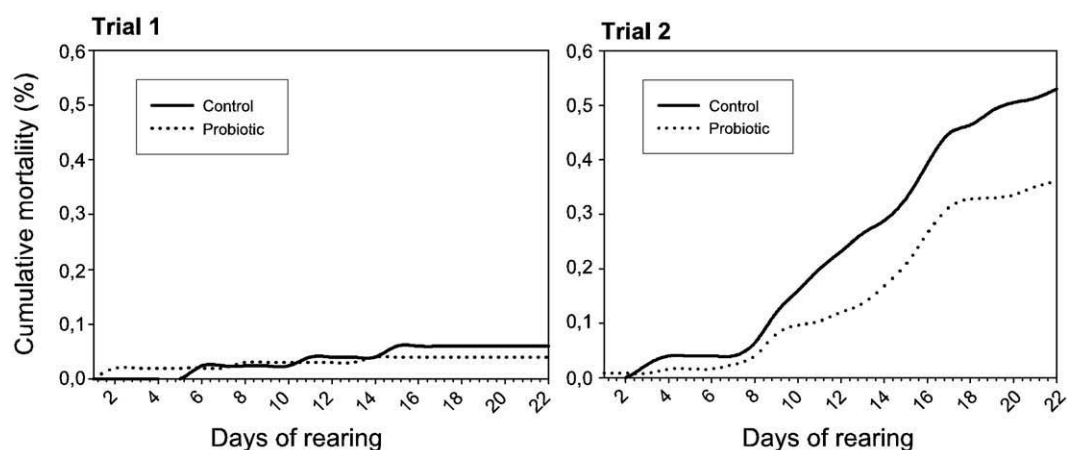


Fig. 1. Cumulative mortalities of control and probiotic treated shrimps during both experiments.

precipitated with 6% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged for 10 min at 11000g. The protein pellets were washed three times with ethanol/ethylacetate (1:1), re-suspended in 6 M guanidine hydrochloride, 50% formic acid, incubated at 37 °C until complete re-suspension. The carbonyl content was measured spectrophotometrically (Synergy HT, Biotek) in the resulting suspensions at 370 nm (molar extinction coefficient 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). The results were expressed as nano-moles of DNPH incorporated mg protein<sup>-1</sup>. The total protein content was determined for each sample according to Lowry et al. (1951).

## 2.6. Statistical analysis

The data obtained were statistically analysed with the statistical package StatView (SAS Inc., Cary, NC, USA). Percent data (survival rate) were normalised using an arcsine transformation before analysis. For means with homogeneous variance, pair-wise comparisons were obtained using Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) to determine differences between treatments. When this was not possible, comparisons were made using the Mann–Whitney non-parametric test (for treatment comparison of oxidative stress parameters within the same trial) and the Kruskal–Wallis test (for bacterial load in the haemolymph between sampling times).

## 3. Results

### 3.1. Trial 1

#### 3.1.1. Survival and *V. nigripulchritudo* prevalence in the haemolymph

No obvious signs of infection or mortalities were detected during the first trial (Fig. 1). Final survival rates were high, as much as 90%,

Table 2

Final survival and prevalence and load of *V. nigripulchritudo* in shrimps over the course of the trials.

| Trial   | Day    | Survival (%)         |                     | Prevalence (% of the sampled shrimps infected) |                      | Load (number of <i>V. nigripulchritudo</i> colonies/infected shrimp) |                          |
|---------|--------|----------------------|---------------------|------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|         |        | Control              | Probiotic           | Control                                        | Probiotic            | Control                                                              | Probiotic                |
| Trial 1 | Day 0  |                      |                     | 0                                              | 0                    | 0                                                                    | 0                        |
|         | Day 22 | 94 ± 10 <sup>a</sup> | 96 ± 8 <sup>a</sup> | 0                                              | 0                    | 0                                                                    | 0                        |
| Trial 2 | Day 0  |                      |                     | 0                                              | 0                    | 0                                                                    | 0                        |
|         | Day 11 |                      |                     | 90 ± 15 <sup>a</sup>                           | 63 ± 8 <sup>b</sup>  | 41.5 ± 16.6 <sup>a</sup>                                             | 21.7 ± 14.0 <sup>b</sup> |
|         | Day 22 | 47 ± 6 <sup>c</sup>  | 64 ± 7 <sup>b</sup> | 90 ± 8 <sup>a</sup>                            | 45 ± 12 <sup>b</sup> | 13.5 ± 15.9 <sup>c</sup>                                             | 8.6 ± 2.6 <sup>c</sup>   |
|         | S      |                      |                     | n.s.                                           | n.s.                 | *                                                                    | n.s.                     |

For each parameter, data within the same line with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are tank means ± s.d. ( $n = 4$ , stars indicate “significant” differences between sampling times ( $*p < 0.05$ ), n.s., non significant). S = significance.

with no differences observed between treatments (Table 2). Final load and prevalence of *V. nigripulchritudo* in the haemolymph were observed to be null for both treatments at the three sampling. No single black to grey colony was observed on MAG.

#### 3.1.2. Probiotic effect on oxidative stress indicators

TAS in both the haemolymph and digestive gland were significantly higher for shrimps fed the probiotic diet (Table 3). Similarly, GPx exhibited higher specific activity in the treated shrimps compared to the control ( $p < 0.05$ ). There were no differences between the experimental groups with regards to levels of other antioxidant enzymes. With regard to oxidative damage, no significant differences were observed with regards to MDA and carbonyl protein contents in the digestive gland of the animals from both groups (Table 4). Mean values were of  $81.6 \pm 7.0$  nmol g<sup>-1</sup> for MDA and  $4.40 \pm 0.28$  nmol mg protein<sup>-1</sup> for carbonyl proteins respectively.

### 3.2. Trial 2

#### 3.2.1. Survival and *V. nigripulchritudo* prevalence in the haemolymph

One week after the start of the second trial, relatively higher mortalities were observed in all the tanks subject to the experiment. Cumulative mortalities for both the probiotic and the control groups

Table 3

Mean values of the antioxidant defences parameters for the control and the probiotic groups in both trials.

|                                                        | Trial 1      |              |      | Trial 2      |              |      |
|--------------------------------------------------------|--------------|--------------|------|--------------|--------------|------|
|                                                        | Control      | Probiotic    | S    | Control      | Probiotic    | S    |
| <b>Haemolymph</b>                                      |              |              |      |              |              |      |
| TAS (μmol ml <sup>-1</sup> )                           | 0.33 ± 0.01  | 0.42 ± 0.02  | **   | 0.28 ± 0.06  | 0.56 ± 0.07  | **   |
| SOD (U ml <sup>-1</sup> )                              | –            | –            |      | 283.7 ± 44.3 | 153.7 ± 25.4 | **   |
| <b>Digestive gland</b>                                 |              |              |      |              |              |      |
| TAS (μmol g organ <sup>-1</sup> )                      | 12.88 ± 0.63 | 14.98 ± 0.46 | *    | 8.5 ± 1.61   | 13.25 ± 1.50 | *    |
| SOD (U mg protein <sup>-1</sup> )                      | 1.28 ± 0.07  | 1.31 ± 0.07  | n.s. | 3.53 ± 0.52  | 1.96 ± 0.36  | **   |
| CAT (μmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) | 0.62 ± 0.03  | 0.66 ± 0.14  | n.s. | 3.08 ± 0.75  | 1.34 ± 0.11  | *    |
| GPx (nmol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> ) | 13.85 ± 0.17 | 14.54 ± 0.26 | *    | 69.5 ± 8.0   | 95.9 ± 6.3   | **   |
| GSH (nmol mg protein <sup>-1</sup> )                   | 3.15 ± 0.38  | 2.88 ± 0.19  | n.s. | 4.43 ± 0.62  | 4.93 ± 1.32  | n.s. |
| GSSG/GSH                                               | 0.22 ± 0.03  | 0.25 ± 0.02  | n.s. | 0.58 ± 0.07  | 0.36 ± 0.04  | **   |

S = significance. Values are tank means ± s.d. ( $n = 4$ , stars indicate “significant” differences between treatments ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ), n.s., non significant).



**Table 4**

Mean values of the oxidative stress parameters for the control and the probiotic groups in both trials.

|                                                      | Trial 1     |             |      | Trial 2     |             |      |
|------------------------------------------------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|------|
|                                                      | Control     | Probiotic   | S    | Control     | Probiotic   | S    |
| MDA<br>(nmol g organ <sup>-1</sup> )                 | 85.1 ± 6.5  | 78.4 ± 13.0 | n.s. | 99.3 ± 16.0 | 70.8 ± 15.6 | n.s. |
| Carbonyl protein<br>(nmol mg protein <sup>-1</sup> ) | 4.03 ± 0.40 | 4.82 ± 0.35 | n.s. | 7.71 ± 0.99 | 3.01 ± 0.63 | ***  |

S = significance. Values are tank means ± s.d. (n = 4, stars indicate “significant” differences between treatments (\*\*\*p < 0.001, n.s., non significant).

are shown in Fig. 1. Two peaks were detected at days 11 and 17, and then mortalities fell but continued until the end of the experiment. During the trial, the number of dead shrimps was found to be lower in the probiotic treatment group (Fig. 1). At the end of the trials, tanks fed the probiotic diet exhibited significant higher final survival rates ( $64 \pm 7\%$  (s.d.)) compared to the control ( $47 \pm 6\%$  (s.d.)) (Table 2).

At the start of the trial (day 0), no *V. nigripulchritudo* colony was detected in the haemolymph of the sampled shrimps. At day 11 however, *V. nigripulchritudo* prevalence was higher than 50% in the sampled shrimps from both groups; a significantly higher ( $p < 0.05$ ) prevalence and load of *V. nigripulchritudo* was recorded in the control shrimps (Table 2) at this stage. Also, sampled moribund shrimps ( $n = 4$ ) showed a high number of mono-morphic grey to black pigmented colonies on MAG plates which indicated septicaemia due to *V. nigripulchritudo* (Goarant et al., 2006). At the end of the experiment, *V. nigripulchritudo* prevalence remained unchanged while the load in the haemolymph was significantly reduced ( $13.6 \pm 15.9$  (s.d.)) compared to day 11 (Table 2). The prevalence of *V. nigripulchritudo* in the sampled animals was still lower for the probiotic group with an average value of  $45 \pm 12\%$  (s.d.) compared to the control group ( $90 \pm 8\%$  (s.d.)). However, *V. nigripulchritudo* loads were not significantly different between the two groups at this stage.

### 3.2.2. Probiotic effect on oxidative stress indicators

Total antioxidant status in both the haemolymph and the digestive gland of *L. stylirostris* fed the control and *P. acidilactici* supplemented diets are presented in Table 3. In shrimps fed the probiotic diet, TAS was significantly higher, particularly in the haemolymph where it was twice that recorded in the control group. Significantly ( $p < 0.01$ ) higher SOD activities in the control treatment were found in the haemolymph and in the digestive gland (+88% compared to the probiotic group, Table 3). Similarly CAT activity for control animals was also higher compared to the probiotic group (Table 3). On the other hand, GPx activity was lower in the control compared to the probiotic group (Table 3). No significant differences were recorded in GSH content. However, the ratio of oxidized glutathione to total glutathione (GSSG/GSH), for which an increase is considered to be a marker of oxidative stress, was significantly higher for the control animals (Table 3). Finally we found that the probiotic treatment group exhibited a significantly lower concentration of carbonyl protein ( $p < 0.01$ ) compared to the control (Table 4). The same trend was observed for the MDA concentration, but the differences between groups were not statistically significant ( $p = 0.06$ ).

### 3.3. Comparison of antioxidant defences and oxidative stress parameters between the two trials

Comparison of the observations on the parameters in the digestive gland between the experimental series revealed the following.

In the control groups (Table 3), TAS of the shrimps exposed to *V. nigripulchritudo* (trial 2) exhibited lower values (−34%) compared to the healthy shrimps (trial 1). Moreover, anti-oxidant enzymes (Table 3) showed higher activity in the shrimps from trial 2, with higher values of 175%, 397% and 402% for SOD, CAT and GPx respectively; in addition the GSH levels and the GSSG/GSH ratio were also higher (+41% and +163% respectively) compared to trial 1.

In the probiotic groups (Table 3), similar but less pronounced trends were observed. Shrimps exposed to *V. nigripulchritudo* exhibited lower values for TAS (−11.5%), while SOD, CAT and GPx activities were 50%, 103% and 560% respectively, higher than that for healthy animals. Similarly, GSH levels and the GSSG/GSH ratio were also higher (+71% and +44% respectively) compared to healthy animals.

With regards to oxidative damage, carbonyl protein and MDA contents in shrimps from the control group in trial 2 were the highest levels recorded (Table 4). In contrast, the groups fed the probiotic diet showed similarly high levels in both trials.

## 4. Discussion

To evaluate oxidative stress status in organisms several strategies have been proposed (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 since ROS are very reactive and therefore difficult to measure. The association of several biomarkers is therefore regarded as the best optional way to suitably evaluate oxidative stress status. This was chosen in this study. We therefore measured on one hand enzymatic and non-enzymatic antioxidants, and on the other hand, products or macromolecules damaged by reactive oxygen species. All these biomarkers were measured in the digestive gland.

In marine aquatic organisms, it has been reported that the main antioxidant enzymes are generally with higher activity in biotransformation organs as digestive tissues (Livingstone et al., 1992; Lemaire and Livingstone, 1993). We have also, in this study, measured TAS and SOD activity in the haemolymph, since the blood cells of invertebrates are the primary effectors in host defence and are involved in various immune processes such as phagocytosis (Söderhäll and Cerenius, 1998).

### 4.1. Antioxidant defences and oxidative stress status in healthy shrimps

Shrimps from trial 1 showed relatively higher survival rates and no obvious signs of infection with no prevalence of *V. nigripulchritudo* observed in their haemolymph. This may indicate that the shrimps were healthy and that pathogen pressure was particularly low during this trial. In addition, MDA concentrations recorded in the digestive gland were close to  $80 \text{ nmol g organ}^{-1}$ , and in the same order as concentrations determined previously by our team and by other authors for healthy shrimps reared under comparable conditions ( $25^\circ\text{C}$ , 37psu salinity, normoxia) (Zenteno-Savín et al., 2006). Moreover shrimps also exhibited SOD and CAT activities in the same range of values to the ones reported in previous studies carried out in healthy (control) shrimps of the species, *P. monodon* and *L. vannamei* (Rameshthangam and Ramasamy, 2006; Li et al., 2008). For example, for *L. vannamei* reared in experimental tanks, Li et al. (2008) reported mean activities around  $2 \text{ U mg protein}^{-1}$  and  $0.6 \text{ U mg protein}^{-1}$  respectively for SOD and CAT in the digestive gland. These results clearly indicate that the healthy shrimps were not exposed to any oxidative stress resulting in detectable response(s) such as those of anti-oxidative defence systems and or specific tissue damage.

Healthy shrimps fed the probiotic diet did not exhibit any obvious differences regarding SOD and CAT activity, or MDA and carbonyl proteins levels compared to control animals with regards to the conditions of trial 1. This underlines that under standard conditions and in the absence of any particular stress conditions, probiotic treatment did not seem to have any effects on CAT and SOD activities, contrary to what had been observed with dietary supplementations with  $\beta$ -Glucans or vitamin E (Campa-Cordova et al., 2005; Liu et al., 2007b). Mourente et al. (2002) concluded that a more direct peroxidative stress (feeding of oxidised oil in this case) is required before clear effects on liver antioxidant enzyme activity could be observed in *Sparus aurata* L.

On the other hand however, in our experiment higher TAS levels in both the haemolymph and the digestive gland, and higher GPx activity in the digestive gland, were observed in the probiotic fed group. Pan et al. (2003) reported increases in TAS level in *P. monodon* Fabricius juveniles fed for 8 weeks with 71.5 mg kg<sup>-1</sup> astaxanthin enriched diet. Our result may indicate that the feeding of probiotic acts in such a way as to increase the antioxidant status of the shrimps. It can therefore be assumed that the probiotic diet may (i) improve the diet utilization (Castex et al., 2008) and contribute to increasing the assimilation of dietary antioxidants from the feed and/or (ii) plays a role in antioxidant activity, as has been reported for other lactic acid bacteria (Kullisaar et al., 2002). These authors hypothesized that the anti-oxidative properties of a *Lactobacillus fermentum* strain may serve as defensive mechanisms in the intestinal microbial ecosystem and therefore help overcome exo- and endogenous oxidative stress(es).

Interestingly, previous studies (Castex et al., 2006, 2008) have reported the effects and the persistence of *P. acidilactici* in shrimp intestinal microbiota, and a recent work by Castex (2009) where molecular techniques (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) were used for certain measurements has indicated that there are changes in the intestinal microbial ecosystem in shrimps where probiotics are fed.

Finally, Kullisaar et al. 2003 has previously shown an increase in the total antioxidant status (TAS) in blood of humans fed *L. fermentum* fermented goats' milk. Similar events occurring in aquatic species do not seem to have been investigated and therefore will make interesting object of future scientific research.

#### 4.2. Antioxidant defences and oxidative stress status in shrimps exposed to *V. nigripulchritudo*

During the second trial, high mortalities were observed, particularly in the control tanks (47 ± 6% final survival rate). Higher number of *V. nigripulchritudo* strains were recorded in the sampled (41.5 ± 16.6 colonies per infected shrimps) and moribund shrimps which suggested involvement of this pathogen with regards to the mortalities recorded during this trial (Goarant et al., 2006).

Higher activities of the antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx), a higher GSSG/GHT ratio and higher carbonyl protein content observed in trial 2 when compared to trial 1, are suggestive of responses observed to be linked to antioxidant defence systems and higher oxidative stress levels in shrimps exposed to *V. nigripulchritudo*. These observations lead us to conclude that this *Vibrio* infection may have led to ROS accumulation (Campa-cordova et al., 2002; Cheng et al., 2007). This is consistent with previous studies showing the induction of respiratory burst, especially production of superoxyde anion, in the haemocytes of shrimps challenged with *Vibrio* sp. (Liu et al., 2007a). This ROS accumulation could explain the higher anti-oxidative enzyme activity and the oxidative stress observed in this trial.

Liu et al. (2007a) reported a concomitant increase in ROS and SOD activities following *V. alginolyticus* infection. Other authors have also reported a short-term decrease of SOD in both the digestive gland and haemolymph after pathogenic *Vibrio* injection or White Spot Syndrome virus infection (Hsieh et al., 2008; Rameshthangam and Ramasamy, 2006). However, these studies were carried out under different conditions including level of infection, thereby making comparisons difficult: sampling of moribund shrimps, experimental infection (oral versus by injection) and shorter exposure time to pathogens. Hence, researchers at our establishment in New Caledonia are currently working on elucidating short-term evolutions of anti-oxidative defences in *L. stylirostris* experimentally challenged with pathogenic *Vibrio*.

#### 4.3. Probiotic effect on the survival rate, antioxidant defences and oxidative stress status in shrimps exposed to *V. nigripulchritudo*

During the second trial, the probiotic fed shrimps exhibited a significantly higher final survival rate (64 ± 7%), which may imply a

better resistance to *V. nigripulchritudo*. This argument seems to be consistent with the lower level of prevalence and load recorded in the shrimps' haemolymph. The result agrees with that of our previous studies obtained under pond conditions (Castex et al., 2008). Moreover, we showed in this study that overall, non-enzymatic antioxidant defences, measured by the total antioxidant status (TAS), were higher for shrimps fed with the probiotic diet compared to the control. On the other hand, the probiotic fed shrimps presented lower activities of SOD and CAT. This observation could be explained by a lower stimulation of these two antioxidant enzymes. Indeed, the reduction of antioxidant enzymatic activities were, in some cases, associated with decreased oxidative stress and free radical activities (these were based on the fact that the lower oxidative stress, the fewer antioxidant enzymes were produced (Rahmat et al., 2006)).

However, elevated SOD activities have also been reported for aquatic species in response to other environmental perturbations such as high variations in salinity and temperature (Lesser, 2006), bacterial infection or exposure to xenobiotics (Cajaraville et al., 2000). Mourente et al. (2002) reported significantly higher activity of liver antioxidant enzymes (CAT and SOD) in juvenile sea bream fed dietary oxidised oil after 30 days and showed that dietary vitamin E partially offset this effect. Another explanation of a higher TAS and lower SOD and CAT activities in the liver of shrimp fed probiotic may reside in an improved utilization of the diet, more specifically of the carbohydrates. Indeed, in our first study (Castex et al., 2008), and in recent works from our laboratory (in prep.), we showed an increased activity of *L. stylirostris*'s digestive enzymes, especially  $\alpha$  amylase activity, when fed a probiotic diet. In shrimps,  $\alpha$  amylase with  $\alpha$  glucosidase are the two digestive enzymes which control the first step of dietary carbohydrate degradation pathway leading to glucose production and further glycogen synthesis in the liver (Rosas et al., 2002). Interestingly, Lygren and Hemre (2001) reported that in Atlantic salmon an increase in liver glycogen concentration in the liver led to a reduction in liver CAT and total SOD activities. According to these authors, the results observed may be explained by the ability for either the glucose to scavenge OH-radicals (Sagone et al., 1983), or alternatively, the ability of the glucose to stimulate increased pentose-phosphate activity (Kashiwagi et al., 1997). Our results with *L. stylirostris* could corroborate this hypothesis.

In the present study, contrary to the observed lower levels of other enzyme activities measured, GPx activity was found to be higher for the probiotic group. GPx is of central importance in mammals in detoxifying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxides, and was found to be present at high levels in the digestive gland of some marine invertebrates (Gamble et al., 1995). The greater GPx activity in the probiotic group compared to the control may be explained by a relatively lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level based on the following considerations: (i) GPx have a higher degree of affinity for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than catalase (Kang et al., 2005), and in the presence of low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, organic peroxides are the preferred substrates for GPx, (ii) GPx is widely distributed in the cell unlike catalase which is located in the peroxisome and functions only when the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is high in the cell and diffuses into the peroxisome (Freeman and Crapo, 1982). The different responses of SOD, CAT and GPx may also indicate a different mechanism for regulation of gene expression for GPx, perhaps related to the fact that GPx is more involved in the removal of organic peroxides and, only to a much lesser extent, of hydrogen peroxide (Mourente et al., 2002; Zhang et al., 2008). Moreover, probiotic fed shrimps exhibited a lower level of oxidative stress as shown by lower GSSH/GSH ratio and carbonyl protein content compared to the control animals ( $p < 0.001$ ).

The determination of carbonyl protein, as a marker of oxidative stress, is quite recent for fish (Parvez and Raisuddin, 2005) and is not commonly used for shrimps. However, oxidative modifications of protein are one of the many consequences of oxidative stress (Stadtman, 1986), and the assay of carbonyl groups in protein provides a convenient technique for detecting and quantifying oxidative stress (Levine et al.,

1994). With regards to MDA, probiotic shrimps also exhibited lower levels than the controls but without any significant difference ( $p=0.06$ ). Interestingly this result can be related to the higher GPx activity recorded in the probiotic group as GPx is involved in the removal of organic peroxides. However, we can assert that the measure of MDA, as a biomarker of oxidative damage to lipids, presents weaknesses with regard to its sensitivity, as recently reviewed by Lykkesfeldt (2007). All these are in support of a lower oxidative stress level in the probiotic shrimps expose to *V. nigripulchritudo* compared to the controls.

To our knowledge, very few studies with penaeid shrimps have reported probiotic effects on antioxidant defences and oxidative stress status. Recently, Chiu et al. (2007) reported that *Lactobacillus plantarum* administered at  $10^7$  CFU  $g^{-1}$  of feed was able to induce immune modulation and enhanced immunity ability of *L. vannamei*, increasing its resistance to *V. alginolyticus* infection. Indeed, these authors showed enhanced cellular and humoral responses such as phenoloxidase activity, superoxidase activity, clearance efficiency against *V. alginolyticus*, and proPO and peroxinectin (PE) mRNA transcription levels in the probiotic-fed shrimps. Interestingly, they showed that when the probiotic was fed, the respiratory burst in the shrimps' haemolymph were reduced through increase in SOD and PE gene transcription and suggested that *L. plantarum* may have enhanced antioxidant status of the shrimp concomitantly to increasing the immune response. At this stage where further investigations on the subject are still required to elucidate the possible mode of action, it could however be hypothesized that the observed effect was as a result of the following: (i) a lower production of ROS due to a limitation of the infection level and/or (ii) a higher antioxidant status in the shrimp fed a probiotic diet. Given the observations by Chiu et al. (2007), it would be interesting to study the relationship between anti-oxidative status and immune response under the particular conditions of the current study.

## 5. Conclusions

Our results indicate that when no particular oxidative stress occurred, *P. acidilactici* supplementation in the diet confers a higher overall antioxidant status (TAS) to the shrimp but seemed to have had little effect on the antioxidant defences. However, exposure of *L. stylirostris* to *V. nigripulchritudo* led to antioxidant response characterized here by (i) an increase in some antioxidant enzymatic activities and (ii) an elevated oxidative stress level. Interestingly, the response including levels of oxidative stress observed was reduced in the shrimps fed the probiotic diet. This probiotic effect was linked to lower prevalence and load of *Vibrio* in the shrimps' haemolymph and higher survival rates. In the light of those results, we confirm that *P. acidilactici* supplementation in shrimps' diet could be an effective way to reduce the susceptibility of shrimps to bacterial pathogens, as previously shown under pond farming conditions (Castex et al., 2008). Further studies are under way to elucidate probiotic effects on short-term evolution of antioxidant defences and oxidative stress levels in *L. stylirostris* exposed to experimentally infected pathogenic *Vibrio*.

## References

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841.
- Adema, C.M., Van der Knaap, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan haemocyte mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 201–223.
- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulphides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 115–120.
- Baumann, P., Schubert, R.H.W., 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae. In: Holt, J.G., Krieg, N.R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, pp. 516–550.
- Cajarville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 201–212.
- Campa-Cordova, A.I., Hernandez-Saaveda, N.Y., De Philippis, R., Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 353–366.
- Campa-Cordova, A.I., Hernandez-Saaveda, N.Y., Guzmán, A.G., Ascencio, F., 2005. Immunomodulatory response in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. *Ciencias Marinas* 31 (4), 661–669.
- Castex, M., 2009. Evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5 M on penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia. Thesis presented at the "Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)", Ecole doctorale Ecole Doctorale ABIES – Physiology, Nutrition. 400 pp.
- Castex, M., Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P., Usache, V., 2006. Feeding evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) in sub adult shrimp *Litopenaeus stylirostris*: microbial, nutritional and zootechnical aspects. Book of Abstract WAS Annual Meeting, 9–13 May 2006, Florence, Italia.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojous, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182–193.
- Cheng, S.Y., Hsu, S.W., Chen, J.C., 2007. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 16–26.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 364–377.
- Clairborne, A., 1985. Catalase. In: Greenwald, R. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. InCRC Press, New York, pp. 283–284.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquat. Toxicol.* 71, 39–48.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47 (5), 412–419.
- Gamble, S.C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R., 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrate (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39, 191–195.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. Summer syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105–113.
- Gonzalez-Rey, M., Serafim, A., Company, R., Bebianno, M.J., 2006. Adaptation to metal toxicity: a comparison of hydrothermal vent and coastal shrimps. *Mar. Ecol.* 28, 100–107.
- Günzler, A., Flohé, L., 1985. Glutathione peroxidase. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 285–290.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111–123.
- 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.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Review probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., Choi, M.H., 2005. 2-Cys peroxidoredoxin function in intracellular signal transduction, therapeutic implications. *Trends Mol Med* 11, 571–578.
- Kashiwagi, A., Nishio, Y., Asahina, T., Ikebuchi, M., Harada, N., Tanaka, Y., et al., 1997. Pyruvate improves deleterious pentose phosphate pathway and glutathione redox cycle in endothelial cells. *Diabetes* 46, 2088–2095.
- Kooter, I.M., 2004. Inventory of biomarkers for oxidative stress. RIVM report 630111001.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihailemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 215–224.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihailemm, T., Zilmer, M., 2003. Antioxidative fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br. J. Nutr.* 90, 449–456.
- 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*. Annual Meeting, 9–13 May 2007, Mexico.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussels *Mytilus edulis*. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 1, 1119–1150.
- Lemonnier, H., Herbland, A., Salery, L., Souldar, B., 2006. "Summer syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* grow-out ponds in New Caledonia: zootechnical and environmental factors. *Aquaculture* 261, 1039–1047.
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121–131.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Ann. Rev. Physiol.* 68, 253–278.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, vol. 233. Academic Press, New York, pp. 346–357.
- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuang, J., Zhang, G., Hong, H., 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.* 29, 525–530.
- 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.
- Lightner, D.V., 1988. Vibrio disease of penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. InElsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 42–47.
- Lin, C.K., 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*. InWorld Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 13–23.
- Liu, C.H., Tseng, M.C., Cheng, W., 2007a. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 34–45.
- Liu, Y., Wang, W.N., Wang, A.L., Wang, J.M., Sun, R.Y., 2007b. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture* 265, 351–358.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P., Pipie, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol.* 112, 265–276.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lygren, B., Hemre, G.J., 2001. Influence of dietary carbohydrate on antioxidant enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Int.* 9, 421–427.
- Lykkesfeldt, J., 2007. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin. Chim. Acta* 380, 50–58.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2, 91–104.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474.
- Mermoud, A., Costa, R., Ferré, O., Goarant, C., Haffner, P., 1998. 'Syndrome 93' in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: history and description of three major outbreaks. *Aquaculture* 164, 323–335.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343–361.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2001. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89–107.
- 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.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112–117.
- Prior, R.L., Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1173–1181.
- Rahmat, A., Fadzelly Abu Bakar, M., Hambali, Z., 2006. The effects of guava (*Psidium guajava*) consumption on total antioxidant and lipid profile in normal male youth. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 6, 1–12.
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxydant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 254, 32–39.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitvorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191, 271–288.
- Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405–415.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., van Wormhoudt, A., 2002. A energetic conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrate and salinity on *L. vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268, 47–67.
- Sagone Jr., A.L., Greenwald, J., Kraut, E.H., Bianchine, J., Singh, D., 1983. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.* 101, 97–103.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28.
- Stadtman, E.R., 1986. Oxidation of proteins by mixed function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem.* 11, 11.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Braz. J. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 404–427.
- 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.
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2008. Life on the edge: physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. *Mar. Biol.* 154, 403–412.
- Wang, F.I., Chen, J.C., 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damse-lae*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 671–681.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M., 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 142, 301–308.
- 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 Immunol.* 24, 584–591.

**Article 5: Effect of probiotic *P. acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge<sup>1</sup>**

Mathieu Castex<sup>a\*</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup> and Liet Chim<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98.46 Nouméa cedex, New Caledonia.

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 84 ; fax : +687 35 11 77

E-mail address: [Mathieu.Castex@ifremer.fr](mailto:Mathieu.Castex@ifremer.fr)

Key words: Probiotic, *Pediococcus acidilactici*, shrimp, oxidative stress, antioxidant status, *Vibrio*

---

<sup>1</sup> Soumission prévue dans « Fish and Shellfish immunology »





## Abstract

The susceptibility, antioxidant defences and induced oxidative stress tissue damage of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*, under challenge with *Vibrio nigripulchritudo*, were investigated for a 72-hour period. For this purpose, *L. stylirostris* were infected by immersion with pathogenic *V. nigripulchritudo* strain SFn1 and antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (Gpx). Total antioxidant status (TAS), reduced and oxidized glutathione, and induced tissue damage (MDA and carbonyl proteins) were determined in the digestive gland at 0, 12, 24, 48 and 72 hours post infection (h.p.i.). TAS was also measured in the blood and infection level of the shrimps during the challenge, followed by determining *V. nigripulchritudo* prevalence and load in the haemolymph of the shrimps. Changes in all these parameters during the 72-hour post-infection period were recorded for control shrimps and shrimps previously fed with probiotic. Prior to the challenge, two groups of shrimps were fed respectively for one month with or without *Pediococcus acidilactici* MA18/5M at  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed.

Our results showed that immersion with *V. nigripulchritudo* led to maximal infection level in the haemolymph at 24 h.p.i. preceding the mortality peak recorded at 48 h.p.i.. Interestingly, significant decreases in the antioxidant defences were detected from 24 h.p.i. and increases in oxidative stress level and induced tissue damage were recorded beyond that time. Shrimps fed the probiotic diet showed lower infection and mortality levels (25% instead of 41.7% in the control group). Moreover, they exhibited small changes in the biochemical parameters measured compared to uninfected shrimps and sustained higher antioxidant defences and lower oxidative stress level compared to the infected control group.

This study shows for the first time that bacterial infection produced by the immersion method leads to oxidative stress in *L. stylirostris*. Moreover, we highlighted a beneficial effect of *P. acidilactici*, suggesting both a competitive exclusion effect leading to a reduction of the infection level and/or an enhancement of the antioxidant status and of the immune response of the shrimps.

## 1. Introduction

In recent years, infectious and non-infectious disease and environmental pollution have seriously affected cultured shrimps (Bachère, 2000). Viral infection remains the main problem and is responsible for major economic loss in the aquaculture industry worldwide. Vibriosis has been also implicated as the cause of high mortality in juvenile penaeid shrimp (Lightner and Redman, 1994). For example, shrimp farming in New Caledonia today faces two diseases involving bacterial pathogens: “Syndrome 93” (Le Groumellec *et al.*, 1996) and “Summer syndrome” (Goarant *et al.*, 2006). Therefore the development of solutions for improved resistance and survival of shrimps in fluctuating environments and with pathogen infection is crucial to sustain the growth of the shrimp culture industry. Among the solutions proposed, the use of probiotic has shown promising results and is now widely accepted as a complementary tool for the alternative management of disease and for improving nutrition of aquatic animals (Wang *et al.*, 2008).

All living organisms are under constant attack from free radicals, which can lead to serious cellular damage if produced in excess. Free radicals are naturally produced in animals during normal aerobic metabolism (Livingstone, 2001). However, their production also comes as part of the immune defence system against foreign micro-organisms (Muñoz *et al.*, 2000). For instance, superoxide is considered as the major free radical stress-produced by living cells (Halliwell and Gutteridge, 1995).

In decapod crustaceans, haemocytes are involved in the immune response to pathogen infection via phagocytosis and melanin production through the prophenoloxidase system (Soderhall and Cerenius, 1998). Phagocytosis is a common cellular defence response generally recognized as a central and important way to eliminate micro-organisms and foreign particles. Once a pathogen enters the haemolymph, NADPH-oxidase is then activated in the haemocyte of the host, which in turn reduces oxygen to the superoxide anion, subsequently leading to the production of hydrogen peroxide, singlet oxygen, hydroxyl radicals and numerous other reactive compounds referred to as reactive oxygen intermediates (ROI) (Muñoz *et al.*, 2000). This process, called respiratory burst, plays an important role in microbicidal activity and has been reported in several shrimp species, including *Litopenaeus stylirostris* (Le Moullac *et al.*, 1998). However, although ROI play an important role in host defence, their over-expression and residual ROI can result in “oxidative stress” leading to cellular damage (Sen, 1995). The antioxidant defence system of the organism, including

superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase, is set to maintain the lowest possible levels of ROI in the cell, and is recognised as an essential component of an organism's self-maintenance. Moreover, the antioxidant defence system and the immune system are closely linked in the response to pathogens (Homblad and Soderhall, 1999). Therefore the implication of the antioxidant defence system in the development of disease through its ability to limit oxidative stress induced by respiratory burst activity, even if poorly investigated in shrimp, may be crucial.

However, most of the studies on oxidative stress in shrimps are restricted to its presence and role during exposure to xenobiotics or environmental perturbations (Livingstone, 2001; Li *et al.*, 2008a). Experimental investigations into the alteration in the tissue antioxidant defence system in pathogenic infectious disease remain scarce. Recent studies have shown changes in some antioxidant enzymes activity such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxylase (Gpx), and oxidative damage (lipid peroxidation) in various tissues in *P. monodon* infected with WSSV (Rameshthangam and Ramasamy, 2006; Mathew *et al.*, 2007). In addition, several studies have also shown changes in SOD activity (Sarathi *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b) or in SOD, Gpx and CAT expression following bacterial infection and virus challenges (Gomez-Anduro *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). It has also been suggested that the antioxidant status operates at a very much lower rate in infected shrimps despite the higher requirement for dismutation of harmful free radical formation during infection by pathogens (Mathew *et al.*, 2007).

Based on this claim, it has been proposed that dietary supplementation of products with antimicrobial and antioxidant properties may be a promising disease prevention option for increasing resistance of shrimps to pathogens (Mathew *et al.*, 2007). For instance, Chiu *et al.* (2007) reported that administering *Lactobacillus plantarum* can enhance the antioxidant state of *Litopenaeus vannamei* and could lead to increased resistance to *V. alginolyticus* infection. However, except for SOD activity (Hsieh *et al.*, 2008b), no study has been found reporting the effect of such products, including probiotics, on the antioxidant response in shrimps following pathogen challenges.

In a previous study we showed that one month feeding with an enriched diet containing  $1\text{g.kg}^{-1}$  of *Pediococcus acidilactici* MA18/5M resulted in an increased survival rate, changes in antioxidant enzymes activity and higher total antioxidant status (TAS) of *Litopenaeus stylirostris* (Castex *et al.*, submitted). Moreover, after natural infection by *V. nigripulchritudo*, probiotic-fed shrimps showed an increased survival rate and lower oxidative stress damage in the digestive gland. Therefore the present study was carried out in order to investigate, under

controlled conditions, how *P. acidilactici* treatment influences antioxidant defences and oxidative stress development in shrimps challenged with *V. nigripulchritudo*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental shrimps, impregnation period and feeding

The shrimps *L. stylirostris* used in our experiments were reared semi-intensively (without aeration) in earthen ponds (1000 m<sup>2</sup>) at the Saint-Vincent station (Ifremer). Six hundred *L. stylirostris* juveniles (12.79±2.72) were fished in earthen ponds, transferred to the laboratory and acclimated into 6 circular polyester tanks (capacity 1600 L) for one week prior to the beginning of the experiment. Each tank was continuously oxygenated by injection of high pressure air and supplied with seawater pumped into the lagoon with a water renewal rate of 200% per day. Temperature was measured continuously (every hour) using an automatic recording probe (Optic StowAway® Temp; Onset).

Tanks were then assigned to two different dietary treatments: four tanks were fed with a control diet, while the remaining two tanks received the probiotic diet. Shrimps were fed for one month with the two diets, distributed four times a day and provided *ad libitum*. The amount of feed was adjusted daily to minimise left-over feed. The water temperature was 26.0±1.9°C and salinity was 35<sup>0</sup>/<sub>00</sub> throughout.

### 2.2. Feeds and probiotic

Shrimps were fed an experimental feed processed in the laboratory as previously described (Castex *et al.*, submitted). The commercial probiotic preparation tested was Bactocell® PA 10 (Lallemand Animal Nutrition S.A., Blagnac, France) formulated with live *Pediococcus acidilactici* MA 18/5 M (Institut Pasteur, Paris, France). For the treated group, 1g.kg<sup>-1</sup> of the probiotic (powder form) was top-coated on the pellets using 2% of fish oil as a carrier, giving a final concentration of 0.9.10<sup>7</sup> CFU of *P. acidilactici* per gram of diet. The control diet was also top-coated with 2% fish oil and, prior to use, checked for possible contamination by the probiotic strain. The feed was then stored in 5-litre boxes at 20°C until use.

### **2.3. Challenge with *V. nigripulchritudo* by immersion**

After one month of rearing, intermoult shrimps were transferred in the experimental room for immersion challenge with *V. nigripulchritudo*. The experimental challenge was made in a controlled area allowing the disinfection of the waste water before its release into the lagoon. Shrimps were assigned to twenty-four 300 L fibre glass tanks filled with 5µm-filtered seawater, aerated and held at 27°C. Shrimp were acclimatized for one week prior to the challenge test using a previously described protocol to reduce transfer stress and to lower physiological disturbances (Wabete *et al.*, 2006). Shrimp were continuously fed at 2% of the tank biomass four times daily with one of the two diets according the treatment, and water was renewed continuously.

Shrimps were infected by immersion for two hours with *V. nigripulchritudo*. A short contact period is preferred in order to prevent possible bacterial reinfection during the experimental survey (Saulnier *et al.*, 2000). The *V. nigripulchritudo* pathogenic strain SFn1 (Goarant *et al.*, 2006) was cultured beforehand in Marine Broth for 18h at 30°C under constant shaking, allowing the late exponential growth phase to be reached. The bacterial culture concentrations were evaluated by reading their optical density at 600 nm, as compared to a previously determined reference curve (data not shown). Three treatments were then carried out: control shrimps, infected control shrimps and infected probiotic shrimps. Shrimps were infected by inoculating tanks with  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> of the pathogenic *V. nigripulchritudo* strain. This density was shown in preliminary experiments to kill approximately half the population within 3 days (Goarant *et al.*, unpub. results). At the end of this challenge, the tanks were emptied in order to remove the water-borne pathogen, then were immediately refilled with clean seawater.

For the susceptibility test 3 tanks each containing 20 shrimps were used for each treatment. Survival was tracked every 6 hours over a 4-day period, as preliminary trials demonstrated that no significant mortality occurred subsequently (Goarant *et al.*, personal communication). For the determination of antioxidant defences and oxidative stress bio indicators following infection, tests were carried out on five replicate tanks per group consisting of 20 shrimps each. Thus two shrimps per tanks were sampled at 0, 12h, 24h, 48h and 72h post infection for subsequent analysis.

### **2.4. *V. nigripulchritudo* prevalence and load in haemolymph**

The haemolymph was collected individually from the ventral-sinus cavity (venous blood), using a 1 ml sterile needle and syringe, after rinsing the shrimps with sterile seawater. Samples were then plated on Marine Agar (w/v) 2% glycerol added (MAG), on which *V. nigripulchritudo* colonies produce a grey to black pigment (Baumann and Schubert, 1984). Putative *V. nigripulchritudo* colonies were counted and recorded for each animal. The prevalence was determined as the percentage of animals presenting at least one *V. nigripulchritudo* colony, and the load as the number of such colonies recorded per infected animal.

## 2.5. Measurement of oxidative stress parameters

### *Sampling and conservation*

Haemolymph (100µl) was withdrawn from the ventral sinus cavity of individual shrimps. The samples were collected using a 23-gauge needle and 1 ml syringe. Two 10 µl haemolymph samples were immediately diluted in pre-cooled Tris buffer 10mM, 1mM DTPA, 1mM PMSF, pH 7.4 and in 25 µl trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA. Samples were then immediately frozen and stored at -80°C until assays were conducted.

The digestive gland was removed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For the assay, the organ was defrosted, divided into two parts, and each part was weighed. One part was homogenized in Tris buffer 10 mM, 1 mM DTPA, 1 mM PMSF, pH 7.4 and the other part in trisodium citrate buffer 30 mM, 0.34 M sodium chloride, 1 mM EDTA specifically for Total Antioxidant Status (TAS) determination.

The diluted haemolymph and digestive gland homogenates were centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants kept at -80°C until used for the analysis. For glutathione assays, the supernatants were neutralised with 6% metaphosphoric acid before storing.

### *Biochemical analysis*

All the parameters were determined by biochemical assays with the microplate reader Synergy HT (Bioteck®) as previously described (Castex *et al.*, submitted).

Total SOD activity was assayed following the method of Marklund and Marklund (1974) based on the auto-oxidation of pyrogallol. CAT activity was measured following the

reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 240nm according to Clairbone *et al.* (1985). GPx activity was assayed following the rate of NADPH oxidation by the coupled reaction with glutathione reductase at 340 nm according to Günzler and Flohé (1985). The soluble protein content was determined by the Folin phenol method according to Lowry *et al.* (1951). All enzymatic units were expressed as specific activities ( $\text{U} \cdot \text{mg}$  of protein<sup>-1</sup>). The total amount of GSH and GSSG was determined spectrophotometrically using 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid according to Akerboom and Sies (1981). TAS was determined using the Randox Kit, referred to as the “Total Antioxidant Status Kit” (Randox Co., Antrim, UK). As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction (Draper and Hadley, 1990). Results were expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents ( $\text{nmol} \cdot \text{mg}$  prot<sup>-1</sup>). Carbonyl protein content was measured according to Levine *et al.* (1994) with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNTP).

For all the parameters, relative values were calculated for each tank as the ratio of the value of the parameter of infected shrimps (control and probiotic) to that of uninfected shrimps (by using mean value of control for each sample time):  $\text{Relative } X_{i,j} = X_{i,j} / (\bar{X}_{\text{control},j})$  where  $i=c, p$  (for control infected and probiotic infected) and  $j=0, 12, 24, 48$  and  $72\text{h}$ .

## 2.6. Statistical analysis

All the data in figures and table are presented as means  $\pm$  standard deviations of 5 tanks. The data were statistically analysed by the statistical package StatView (SAS Inc., Cary, NC, USA). Survival rates were compared with a Khi 2 test. For each biochemical parameter, a two-way ANOVA was conducted to assess the effect of time post-infection, treatment and the interaction of the two. Pairwise comparisons were obtained using Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) to determine differences between treatments.

## 3. Results

During the first month of impregnation, the shrimps grew well and no particular mortality was recorded in either group. Transfer of the shrimps to the experimental room did not induce any mortalities and after 6 days the shrimps had recovered well from the transfer. At that time all the feed provided (2% BM) was consumed by the shrimps.



### 3.1. *V. nigripulchritudo* prevalence and Shrimp mortality

First, the haemolymph of the shrimps before infection was found to be free from any *V. nigripulchritudo* strains. Immersion with *V. nigripulchritudo* SFn1 for two hours resulted in infection of the shrimps, showing maximal prevalence values at 12 hours post infection (h.p.i.) (Figure 1). Prevalence stayed at a maximum level until 24 h.p.i and then steadily decreased to reach low or null values at 72 hours. Whatever the treatment, prevalence reached the same maximum level at 12 h.p.i.. However, beyond that time, prevalence of shrimps from the probiotic group was systematically lower than the control. The decrease in prevalence in the probiotic-fed shrimps was found to start at 24 h.p.i., before the control shrimps. Moreover the *V. nigripulchritudo* load peaked at 24 h.p.i. and decreased thereafter to reach almost null values at 72 h.p.i.. At 24 h.p.i. the control group showed more than twice the number of colonies recorded for the probiotic-fed shrimps (Figure 1).

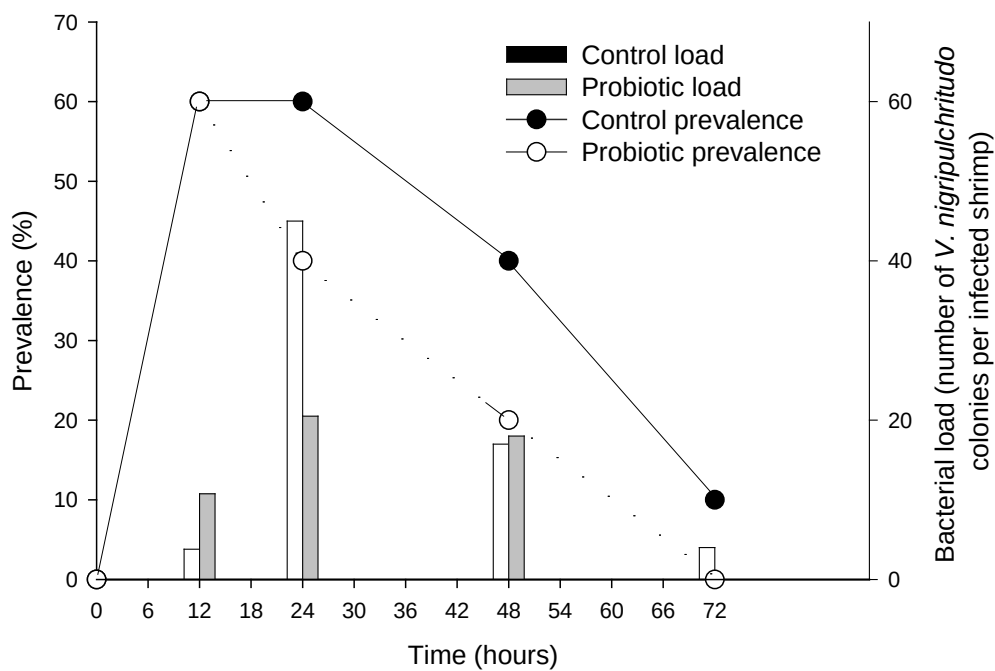


**Figure 1.** Time course evolution of the prevalence and load for *V. nigripulchritudo* in the haemolymph of shrimps from the control and the probiotic challenged groups.

Finally, shrimp mortality started after 24 hours and reached a peak at 48 h.p.i. (Figure 2) whatever the treatment. The number of dead shrimps recovered decreased afterward and ceased at 72 h.p.i.. At the end of the four-day follow-up, the final survival rate in the control

infected group was 41.7%, while it was 25% in the probiotic group (fig 2) ( $P < 0.05$ ). The uninfected group did not exhibit any mortality throughout the trial.

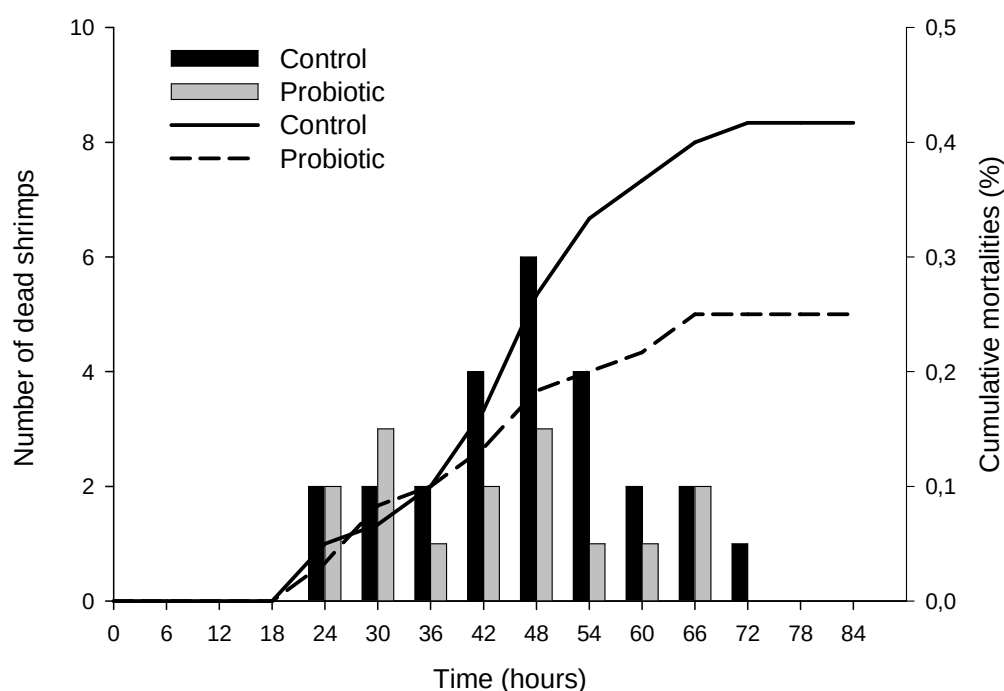


**Figure 2.** Number of dead and percentage mortality in the control and probiotic groups several hours after a 2h-immersion with *V. nigripulchritudo* SFn1 at  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>.

### 3.2. Antioxidant defences and oxidative stress

The results concerning evolutions of the antioxidant and oxidative stress parameters following the challenge are presented as relative values calculated in relation to the control uninfected group means for each sample time (Figure 3, 4 & 5) (see Materials and Methods). The values of each parameter measured at 24, 48 and 72 h.p.i. for the three experimental groups are given in Table 2.

#### *Before infection (b.i.)*

Before infection, shrimps fed the probiotic diet showed higher but not significant TAS, and SOD and Gpx activities in their digestive gland compared to control (Figure 3&4), while CAT activity was found to be significantly lower. The oxidative stress level given by the GSSG/GSH ratio was significantly lower in shrimps fed probiotic. In the meantime, the

indicators of free radicals damage (MDA and carbonyl protein) were lower in the shrimps fed probiotic, but these differences were not significant. In the blood, the total antioxidant status (TAS) was found to be statistically higher in the probiotic group.

### *Post-infection (p.i.)*

#### **Control infected shrimps**

Statistical analysis of the relative values calculated for each biochemical parameters showed that infection by *V. nigripulchritudo* SFn1 induced significant variations within 72 hours in all the parameters measured (Table 1).

**Table 1.** Statistical significance (P value) of time post infection, treatment (probiotic vs control infected groups) and the interaction of both for each biochemical parameter (relative values calculated according the uninfected control were used for the analysis) determined, based on type III sum of squares from factorial ANOVA (\*P<0.05, \*\*p<0.01, n.s. not significant).

| Parameter              | Effect <sup>(1)</sup> |           |                | Time effect <sup>(2)</sup> |                    |
|------------------------|-----------------------|-----------|----------------|----------------------------|--------------------|
|                        | Time                  | Treatment | Time*Treatment | Control infected           | Probiotic infected |
| <i>hemolymph</i>       |                       |           |                |                            |                    |
| TAS                    | ***                   | ***       | n.s            | **                         | *                  |
| <i>Digestive gland</i> |                       |           |                |                            |                    |
| TAS                    | *                     | n.s       | **             | **                         | n.s                |
| SOD                    | *                     | **        | **             | **                         | n.s                |
| CAT                    | n.s                   | ***       | *              | *                          | n.s                |
| GPX                    | **                    | *         | *              | *                          | **                 |
| GSSG/GSH               | ***                   | *         | n.s            | **                         | **                 |
| MDA                    | **                    | **        | n.s            | *                          | n.s                |
| Carbonyl protein       | ****                  | **        | n.s            | *                          | *                  |

(1) Two way analysis of variance

(2) One way analysis of variance

General trends indicated that in the digestive gland antioxidant defences decreased significantly following infection (Figure 3 and 4), while oxidative stress level (GSSG/GSH) and tissue damage (MDA and carbonyl protein) increased (Figure 5). Moreover, these changes systematically occurred from 24 or 48 h.p.i.. Indeed, antioxidant defences expressed as relative TAS and SOD, CAT and Gpx activities decreased at 24 h.p.i. (Figure 3&4). The values measured for each of these parameters were thus significantly lower compared to the uninfected group at 24 h.p.i. and/or at 48 h.p.i. (Table 2). Moreover, before their decrease at

24 h.p.i., relative TAS and CAT activity in the digestive gland were found to significantly increase after 12 hours (Figure 3 and 4) in the control infected group. Furthermore, at 72 h.p.i. all the antioxidant defences parameters returned to initial relative levels and no significant difference from the uninfected group was subsequently detected (Table 2).

Tissue damage and oxidative stress level, measured here with MDA, carbonyl protein and the GSSG/GSH ratio in the digestive gland, increased significantly after infection. Indeed, carbonyl protein content in the digestive gland and GSSG/GSH ratio showed an increase in their relative values (Figure 5) and significant higher values compared to those recorded in the uninfected group at 24 h.p.i. and 48 h.p.i. (Table 2). Relative reduced glutathion and oxidized glutathion were also found respectively to decrease and increase at 24 h.p.i. and 48 h.p.i.. Relative MDA also increased at 24 h.p.i. but significantly decreased at 48 h.p.i., to increase again at 72 h.p.i.. The infected group exhibited significantly higher MDA levels at 24 and 72 h.p.i. and a significantly lower level at 48 h.p.i.. At 72 h.p.i. the carbonyl protein and GSSG/GSH ratio decreased slightly but remained significantly higher compared to the uninfected group (Table 2). In the haemolymph, TAS was found to start decreasing at 12 h.p.i. to reach a minimum level at 24 h.p.i. and then recovered its initial level at 72 h.p.i (Fig 3a).

#### **Probiotic infected compared to control infected shrimps**

In the probiotic infected group, the antioxidant parameters and oxidative stress were only slightly affected by the infection compared to the control. Indeed in the probiotic infected group, relative values of the biochemical parameters did not systematically change over time, as was observed for the infected control group (Table 1). In the digestive gland, in regard to antioxidant defences, relative TAS and SOD and CAT activities did not decrease in the probiotic group over the 72-hour period (Figure 3&4), as shown by the absence of any significant time effect in this group (Table 1). However, relative Gpx activity changed significantly over the course of the trial, but the time\*treatment interaction indicated that the variations of this parameter were different compared to control infected shrimps (Figure 4). Indeed Gpx activity in the probiotic group was found to significantly rise at 48 h.p.i. and to decrease later than in the control group (at 72 h.p.i.). All other parameters studied evolved in the same way as observed for the control infected group.

At 24 and 48 h.p.i., significant differences between both probiotic and control infected groups were systematically detected whatever the parameter (Table 2). Moreover, the probiotic

treatment was found to have a significant effect (treatment and time\*treatment effect) on the relative values of all the biochemical parameters measured (Table 1). Relative TAS value at 24 h.p.i., and SOD and Gpx activities at 24 h.p.i. and 48 h.p.i. were significantly higher in the probiotic group compared to control. However, relative CAT activities were not significantly different between treatments either at 24 or at 48 h.p.i.

**Table 2.** Mean values ( $\pm$ S.D., n=5) of each biochemical parameter for the uninfected control, and the infected control and probiotic groups after 24, 48 and 72 hours post infection. Comparisons between means were carried out with t-test. Means with different superscript letters within the same line at each sample time were significantly different ( $p < 0.05$ ).

|                                                         | 24 h.p.i.                      |                                |                                | 48 h.p.i.                      |                               |                               | 72 h.p.i.                      |                               |                                 |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Parameter                                               | Control                        | Control infected               | Probiotic infected             | Control                        | Control infected              | Probiotic infected            | Control                        | Control infected              | Probiotic infected              |
| TAS ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ )                         | 0.97 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>   | 0,26 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>   | 0.79 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>   | 1.05a $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>  | 0.79b $\pm$ 0.14 <sup>b</sup> | 0.99 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup> | 0.90 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>   | 0.87 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>  | 0,87 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>    |
| TAS ( $\mu\text{mol.g organ}^{-1}$ )                    | 20.03 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup>  | 15,36 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>  | 21.82 $\pm$ 3.13 <sup>a</sup>  | 14.56 $\pm$ 3.98 <sup>a</sup>  | 14.43 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup> | 17.26 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup> | 16.53 $\pm$ 2.97 <sup>a</sup>  | 20.36 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup> | 18,93 $\pm$ 3.49 <sup>a</sup>   |
| SOD (U.mg protein <sup>-1</sup> )                       | 2.00 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>   | 1,58 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>   | 2.42 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>   | 1.46 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>   | 0.83 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>  | 1.67 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>  | 1.38 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>   | 1.60 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>  | 1.37 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>    |
| CAT ( $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ ) | 0,36 $\pm$ 014 <sup>a</sup>    | 0.33 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>  | 0.21 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>   | 0.44 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>   | 0.31 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>  | 0.36 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup> | 0.38 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>   | 0.36 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>  | 0.28 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>    |
| GPX (nmol.min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> ) | 12.14 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>  | 9.33 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>   | 12.17 $\pm$ 0.77 <sup>a</sup>  | 13.19 $\pm$ 1.42 <sup>ab</sup> | 11.06 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup> | 15.77 $\pm$ 1.79 <sup>b</sup> | 15.48 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>  | 14.09 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup> | 12.75 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>   |
| GSSG/GSH                                                | 0.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>   | 0.46 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>   | 0.26 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>   | 0.25 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>   | 0.48 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>  | 0.33 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 0.29 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>   | 0.46 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>  | 0.38 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>   |
| Carbonyl protein (nmol.mg protein <sup>-1</sup> )       | 0.71 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>   | 0.78 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>   | 0.57 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>   | 0.60 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>   | 0.92 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>  | 0.68 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  | 0.71 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>   | 0.91 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>  | 0.65 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>    |
| MDA (nmol.g organ <sup>-1</sup> )                       | 45.38 $\pm$ 10.53 <sup>a</sup> | 64.92 $\pm$ 15.67 <sup>b</sup> | 45.23 $\pm$ 13.16 <sup>a</sup> | 56.35 $\pm$ 9.34 <sup>a</sup>  | 43.18 $\pm$ 3.65 <sup>b</sup> | 40.75 $\pm$ 6.71 <sup>b</sup> | 42.44 $\pm$ 10.13 <sup>a</sup> | 56.57 $\pm$ 7.33 <sup>b</sup> | 44.03 $\pm$ 12.81 <sup>ab</sup> |



Relative GSSG/GSH, MDA and carbonyl protein were significantly lower in the probiotic group compared to the infected control at 24 h.p.i. Furthermore, these differences were still significant at 48 h.p.i. for the GSSG/GSH ratio and at 48 and 72 h.p.i. for carbonyl protein. Except for this last parameter, no significant differences in the relative values of the other parameters were detected between the probiotic and control infected groups at 72 h.p.i. Finally, in the haemolymph, TAS was found to follow the same trend as for control infected shrimps but its levels were significantly higher at 12, 24 and 48 h.p.i. (Figure 3).

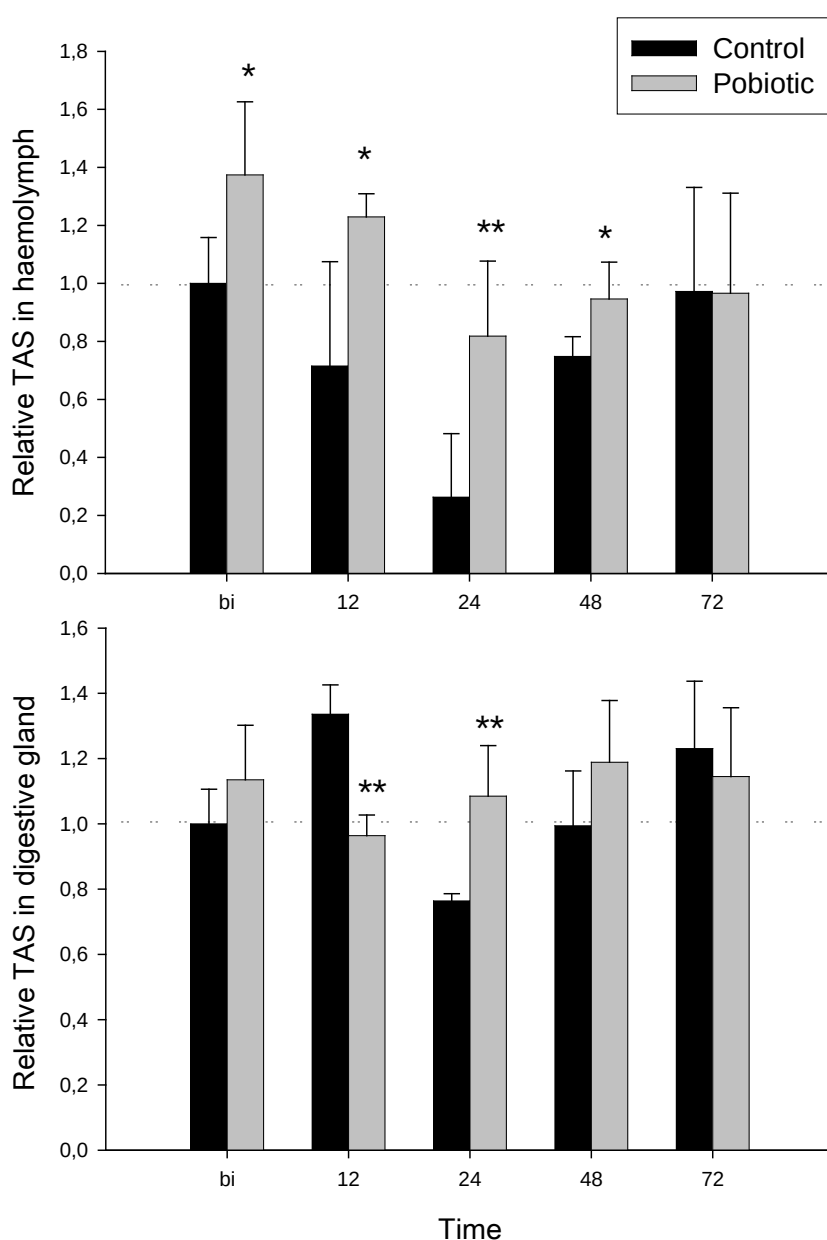


**Figure 3.** Relative Total antioxidant status (TAS) in the haemolymph and the digestive gland of shrimps from the control and the probiotic groups several hours after the infection by *V. nigripulchritudo* SFn1. A ratio of 1 corresponds to equal values for the infected and uninfected groups (Dash line).



**Probiotic infected compared to control uninfected shrimps**

Only small differences were detected between the probiotic and uninfected groups: SOD and CAT activities showed respectively higher and lower values at 24 h.p.i. (Table 2), while the MDA level was significantly lower at 48 h.p.i.. At 72 h.p.i. no statistical difference was detected between the probiotic and the uninfected groups whatever the parameter (Table 2).

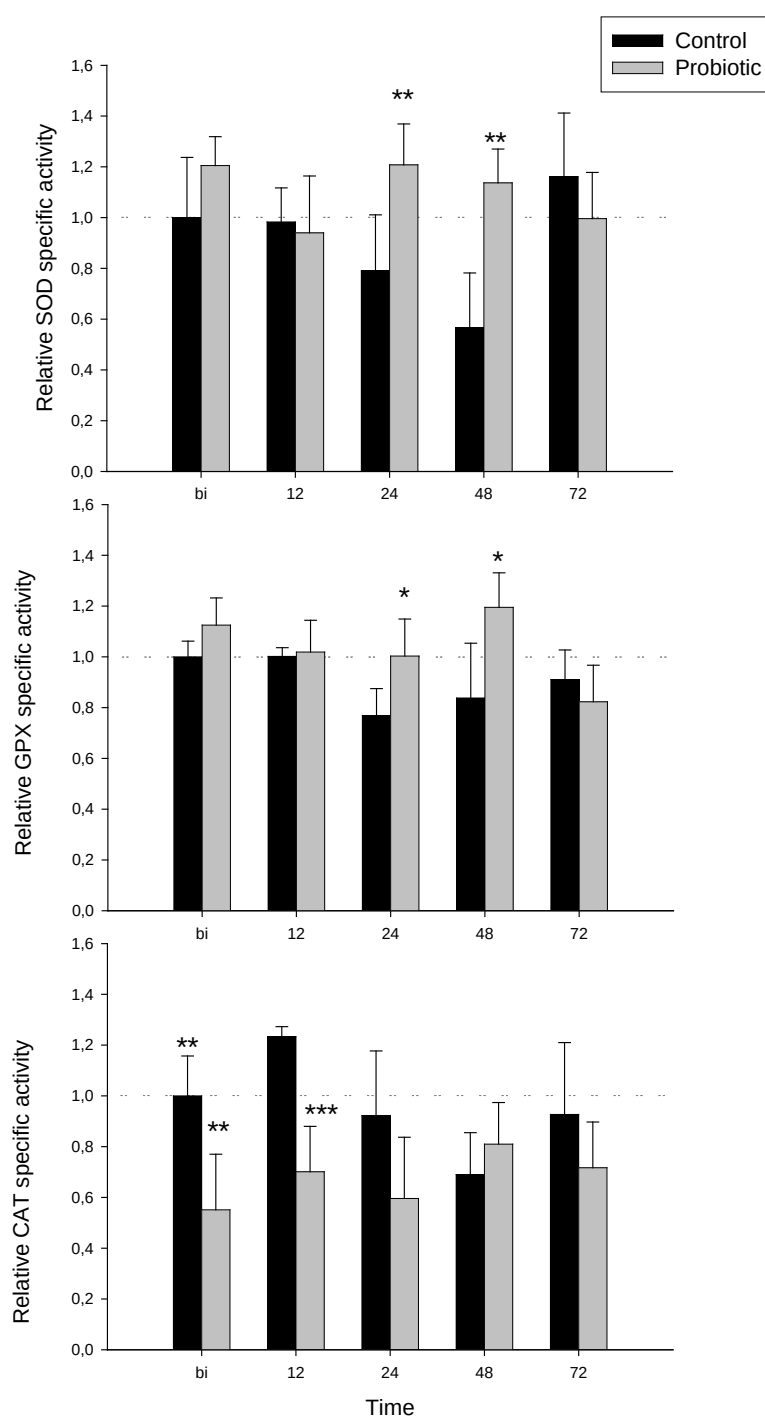


**Figure 4.** Relative antioxidant enzyme activities (SOD, CAT and Gpx) in the digestive gland of shrimps from the control and probiotic groups several hours after infection by *V. nigripulchritudo* SFn1. A ratio of 1 corresponds to equal values for the infected and uninfected groups (Dash line).

## 4. Discussion

Our study showed that infection by 2 hour-immersion with *V. nigripulchritudo* at  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> led to 41% mortality with a peak at 48 hours post-infection (p.i.). These results are in agreement with previous studies carried out in our laboratory (Goarant *et al.*, unpub. results). Indeed,  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> was previously determined as the 50% lethal dose for *V. nigripulchritudo* SFn1 in *Litopenaeus stylirostris*. Moreover, our results showed that the increase in prevalence and the load of the pathogenic strain in the haemolymph were maximal at 24 h.p.i., hence prior to the mortality peak recorded at 48 hours. This result is in agreement with previous observations with shrimps reared in ponds affected by *V. nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006; Castex *et al.*, 2008). Indeed Goarant *et al.* (2006) suggested the existence of a latency phase in the “summer syndrome” disease due to *V. nigripulchritudo*. The delay between maximal infection level and highest mortality may be due to the virulence characteristics of this strain (Reynaud, 2008).

In the present study, the mortality of the shrimps fed *P. acidilactici* was reduced from 41.7% to 25% when challenged with *V. nigripulchritudo*. Several studies have reported increased resistance of shrimps to pathogenic vibrio through probiotic administration (Rengpipat *et al.*, 1998; Scholz *et al.*, 1999). Thus Chiu *et al.* (2007) reported a similar improvement with probiotic *Lactobacillus plantarum* at  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> in *L. vannamei* challenged with *V. alginolyticus*. Moreover, our result confirmed previous findings which have shown that *P. acidilactici* increased the final survival rate of *L. stylirostris* when natural infection by *V. nigripulchritudo* occurred in commercial ponds or in experimental tanks (Castex *et al.*, 2008; submitted). Furthermore, in the haemolymph of the shrimps fed probiotic, lower prevalence and load of *V. nigripulchritudo* were recorded, especially at 24 h.p.i., when their levels were maximum in the control infected group. These results suggest a lower infection level of the shrimps fed *P. acidilactici* and may account for the reduced mortality recorded in the probiotic group.

In shrimp, the various natural routes of infection by virulent bacterial isolates are theoretically oral, trans-cuticular or caused by wounds, through an imbalance in the natural bacterial flora, or by vertical transmission of the pathogen (Saulnier *et al.*, 2000). The natural route of infection for *V. nigripulchritudo* has not yet been studied and merits future consideration. However, histopathological studies of infected shrimp with vibriosis strongly suggest an oral infection route, even though description of the process of gut colonization *in vivo* has not

been undertaken (Lavilla Pitogo *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1998). In this study we preferred the immersion route of infection, since it is probably closer to the natural source of virulent bacterial strains, as suggested by a number of studies (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990, 1998; Lightner, 1992; de la Peña *et al.*, 1992; Goarant *et al.*, 1999). However, most of the studies carried out on the physiological and immune response of shrimps following bacterial challenge used injection (Li *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2007). Our study is thus original, although the results are difficult to compare to other published work.

### **Infection and antioxidant defences**

The antioxidant defence system and the immune system are closely linked in the response to pathogens (Homblad and Söderhäll, 1999). Moreover, the integrated antioxidant system is recognised as an essential component of an organism's self-maintenance. Therefore the implication of the antioxidant defence system in the development of disease through its ability to limit oxidative stress induced by respiratory burst activity and/or metabolism disturbances, even if poorly investigated in shrimp, may be of crucial importance (Mathew *et al.*, 2007). Recent studies carried out with shrimps have shown that bacterial infection leads to respiratory burst (Muñoz *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007) and modifications in antioxidant enzyme activities and their gene expressions (Sarathi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b). For instance, infection by *V. alginolyticus* pathogenic strains has been reported to result in increased levels of superoxide anion and decreased SOD activities in the haemolymph of *L. vannamei* and *F. indicus* from 12 hours p.i. (Hsieh *et al.*, 2008a; Sarathi *et al.*, 2007). Those results showed that even if a small increase in superoxide anion is considered to be beneficial for enhancing immunity (Muñoz *et al.*, 2000), too great an increase may have adverse effects (Cheng and Wang, 2001). However, those studies did not report results concerning other antioxidant defences, and generally focused on the characterisation of the immune response, thereby making comparisons with our study difficult.

Our results clearly showed that bacterial infection induces the mobilisation of the antioxidant defence system and the development of oxidative stress leading to oxidative damages to tissue from 24 h.p.i.. Recent work on viral infection also has clearly demonstrated the development of oxidative stress within a few hours after infection (Rameshthangam and Ramasamy, 2006; Mathew *et al.*, 2007).

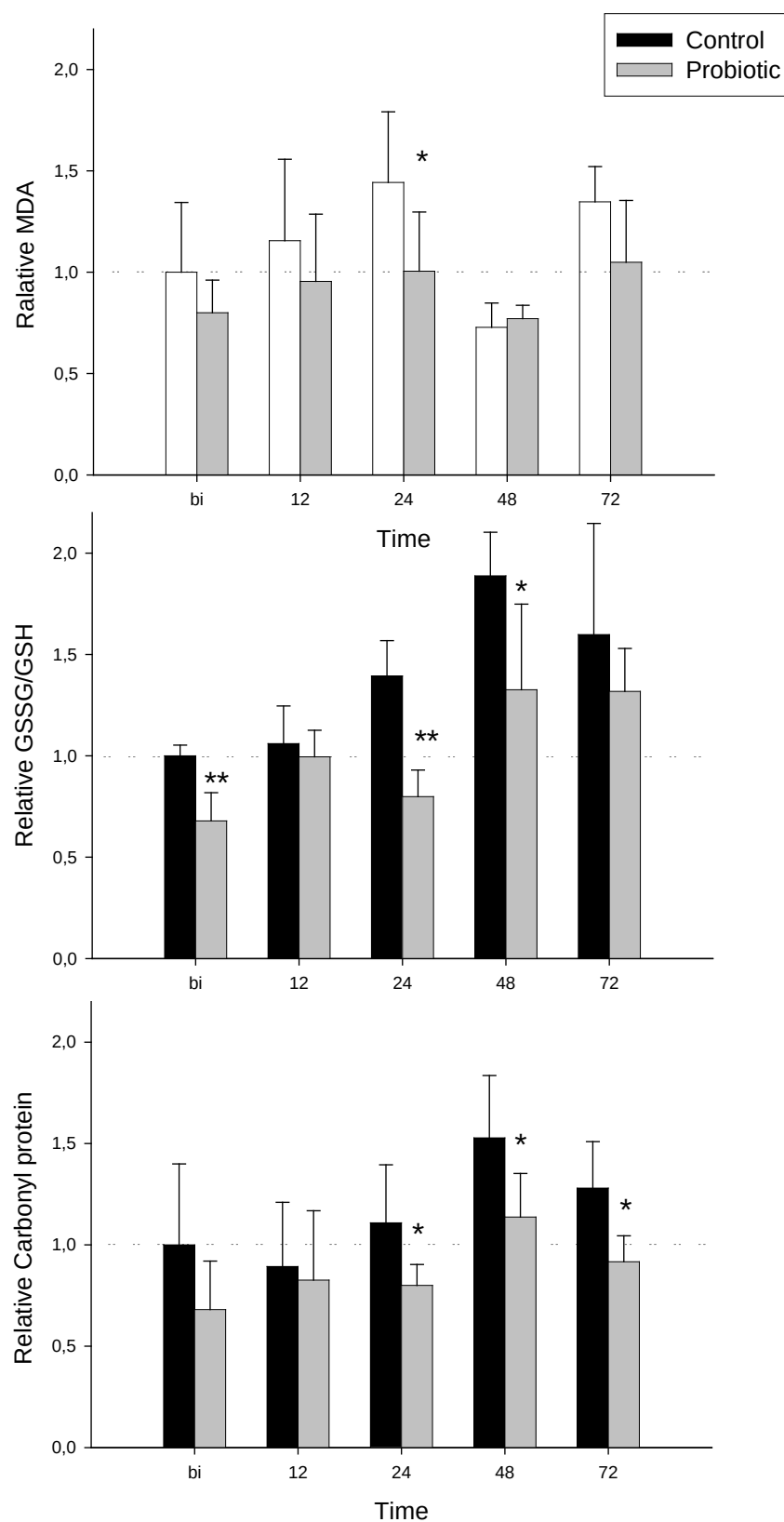


**Figure 5.** Relative MDA, carbonyl protein content and GSSG/GSH in the digestive gland of shrimps from the control and probiotic groups several hours after infection by *V. nigripulchritudo* SFn1. A ratio of 1 corresponds to equal values for the infected and uninfected groups (Dash line).

Thus Mathew *et al.* (2007) reported a concomitant increase in lipid peroxidation and a drop in antioxidant enzyme activities of SOD, CAT, Gpx and Glutathion-S- transferase in the digestive gland, muscle and haemolymph of *P. monodon* following infection with white spot syndrome virus (WSSV). They conclude that the antioxidant defence system was affected by the viral infection and that tissue antioxidant status was operating at a very much lower rate in *P. monodon* despite the higher requirement for dismutation of harmful radical formation during WSSV infection. Interestingly, their results showed that this phenomenon was detected from 24 h.p.i., as observed in our study. Moreover, Sarathi *et al.* (2007) compared immune response of *F. indicus* to bacterial and viral infection and showed that the innate immune system responded similarly against both pathogens with lowered THC, SOD activity, clotting time and increase accumulation of haemocytes at the site of injection, prophenoloxidase activity and superoxide anion levels. Thus our results are in agreement with these studies. The decrease in the antioxidant defences of *L. Stylirostris* recorded here probably led to the production of excess free radicals such as hydrogen peroxide and the hydroxyl radical which may have caused tissue damages. To our knowledge, this study is the first to report such a phenomenon in shrimps infected by immersion with pathogenic bacteria. Interestingly, the shortage in antioxidant enzymes activities (SOD, CAT and Gpx) and overall antioxidant defences (TAS) and the increase in oxidative stress level and tissue damage appeared when the prevalence and load of *V. nigripulchritudo* were maximal in the haemolymph. This may indicate an enhanced immune response and an excessive production of ROS at that time. It is also interesting to note that relative CAT activity and relative TAS values in the digestive gland showed an increase at 12 h.p.i. in the infected control group before falling at 24 h.p.i. This might be an attempt at counteraction or neutralisation of the harmful free radicals generated due to bacterial infection, as previously suggested (Mathew *et al.*, 2007). Moreover we showed a significant reduction in the relative activity of glutathione peroxidase in the vibrio infected group. In addition, the levels of GSH and GSSG were respectively significantly reduced and increased. The decline in the Gpx activity at 24 h.p.i. may have made cellular and subcellular membranes more sensitive to oxidative damage and may explain the increase in relative MDA and carbonyl protein levels at that time. Indeed, the decrease in relative Gpx activity, concomitant to the decrease in CAT and SOD activity, may have led to an accumulation of hydrogen peroxide, which in turn may have formed hydroxyl radicals and brought about a number of harmful reactions to cells.

Lipid peroxidation is one of the major problems associated with failure of the antioxidant system. In this study we determined the Malondialdehyde level (MDA), a secondary product of lipid peroxydation, frequently used as a biomarker of oxidative damage to lipids (Lykkesfeldt, J., 2007). We also looked at the damaged protein by measuring the carbonyl protein content. Indeed, the highly reactive hydroxyl radical ( $\text{OH}\cdot$ ), which is generated in the process leading to oxidative stress, is considered to be responsible for the formation of carbonyl groups in protein (Faber and Levine, 1986). We found evidence of oxidative damage as indicated by increased MDA and carbonyl proteins in the digestive gland of the infected shrimps. Interestingly, we showed that relative carbonyl protein values increased with increased oxidative stress level, evidenced by the rise in the GSSG/GSH ratio. However, the drop in MDA level at 48 h.p.i. measured in this study remains difficult to explain. MDA and lipid peroxides are themselves free radicals with large reaction constants which lead to oxidative damage, as modifications of proteins such as protein carbonylation. Thus it is possible that the increase in MDA level at 24 h.p.i. might have enhanced a system for the detoxification of lipid hydroperoxides. The determination of the glutathione S-transferase activity, an enzyme involved in the detoxification of lipid hydroperoxides, would have been useful to strengthen this hypothesis.

Finally, at 72 h.p.i. the shrimps recovered and antioxidant defences returned to initial levels. This indicates that shrimps recovered from the infection, which is in agreement with the results of Sarathi *et al.* (2007), who showed that the shrimp innate immune system raised against bacterial infection returned to a normal level after recovery from Vibriosis, whereas this was not the case in WSSV infected shrimps. However, the MDA and carbonyl protein content in the digestive gland were still higher at 72 h.p.i. in the infected group compared to the uninfected one. This might be due to the time needed to detoxify oxidized compounds (Ferreira *et al.*, 2005).

### **Effect of probiotic on the response to infection**

In regard to the probiotic effect, our results showed that the infected shrimps previously fed with the probiotic enriched diet maintained the levels of their antioxidant defences compared to the control over the 72-hour challenge period. Indeed, TAS and SOD, Gpx and CAT activity in the digestive gland did not decrease after infection as observed in the control group. Only Gpx activity showed a decrease at 72 h.p.i., reaching a similar value to the

control infected and uninfected shrimps. By contrast, CAT activity was significantly lower in the probiotic group before infection compared to the control and until 24 h.p.i. and 12 h.p.i. compared to the uninfected and the infected groups respectively. This result is difficult to explain, but might be due to lower free radical generation in the probiotic-fed shrimps under normal conditions or to the use of other antioxidant pathways to scavenge them. The higher TAS values recorded in the haemolymph of the probiotic shrimps compared to control before the infection, and until 12 h.p.i. may be consistent with this hypothesis. Interestingly, the higher TAS in the haemolymph and digestive gland of *L. stylirostris* fed probiotic *P. acidilactici* for one month confirm our previous results (Castex *et al.*, submitted). Interestingly several works reported that Lactic Acid Bacteria (LAB) have antioxidant activities (Kullisaar *et al.*, 2002) and some studies showed an enhancement of total antioxidant status (TAS) in blood of humans fed LABs (Kullisaar *et al.*, 2003). The TAS level in the haemolymph of the probiotic-fed shrimps decreased from 12 h.p.i. as observed for the control animals. However, this drop was lower and TAS remained significantly higher up to 48 hours before finally showing similar levels to control animals at 72 h.p.i. This result suggests that the probiotic confers a higher antioxidant capacity on the shrimp to cope with the respiratory burst induced by the infection. Consequently, tissue damage and the oxidative stress level induced by the infection were lowered in the probiotic group compared to the control. Indeed, significant lower relative MDA, carbonyl protein and GSSG/GSH ratio were observed at 24 h.p.i. in the probiotic group. Furthermore, the post infection evolution of the antioxidant defences and oxidative stress level in the probiotic group only showed slight differences from the uninfected group, suggesting that the shrimp fed probiotics were able to cope efficiently with the infection and therefore to limit associated damage.

All these results lead to two explanatory hypotheses as to the probiotic action: (i) the probiotic may have in some way taken part into the limitation of the infection by *V. nigripulchritudo* resulting in a lower immune response and then a lower respiratory burst and associated oxidative stress response, or (ii) the probiotic may have contributed to increase the overall physiological status of the shrimps, including antioxidant status and immune response, resulting in a higher elimination of the pathogen via an increased respiratory burst and lower ROS-induced damage through higher antioxidant defences. According to these hypotheses, the observed decrease in the prevalence and load of the *vibrio* in the haemolymph of the probiotic-fed shrimps might be either a cause or a consequence of the probiotic effect.

In regard to the first hypothesis, several studies have reported *in vitro* antibacterial activity of probiotic strains in relation to bacterial pathogens in shrimp (Chythanya *et al.*, 2002). Others have shown competitive exclusion or *in vivo* antagonism on the shrimp microbiota (Gullian *et al.*, 2004; Castex *et al.*, 2008). It is generally suggested that probiotic might be able to prevent and/or limit bacterial infection by competitive exclusion, depending on the production of inhibitory compounds or competition for adhesion sites, energy and/or nutrients (Verschuere *et al.*, 2000). Competitive exclusion is an action mechanism widely invoked in the literature, but the ways in which this mechanism operates have been insufficiently investigated in shrimp studies. For instance, Chythanya *et al.* (2002) reported the inhibitory activity of cell free extract of *P. aeruginosa* I2 and showed that the extract was able to level off *V. harveyi* concentration in water by over a log unit when applied at 20 mg/ml. This effect was associated with the inhibitory effect of the chloroform extract of *Pseudomonas* I-2 cell free supernatant, and the author suggested that Pyocyanine could be the antibacterial principle responsible for the inhibition of the *Vibrio*. In their study, Gullian *et al.* (2004) showed colonisation of the digestive gland of *P. vannamei* by several probiotic strains and highlighted competitive interaction of these strains with the pathogenic *V. harveyi* strain using RAPDs and monoclonal antibodies. They then reported that the probiotic strain *Vibrio* P62 was able to reduce the colonization of *V. harveyi* S2 by 60%, as well as displacing the indigenous micro flora in the digestive gland. Interestingly, we previously reported the *in vivo* antagonism effect of *P. acidilactici* on shrimp microbiota (Castex *et al.*, 2008, submitted) and the *in vitro* effect of

*P. acidilactici* on *V. nigripulchritudo* has also been shown (Reynaud, 2004). However, the characterisation of the infection route of *V. nigripulchritudo* would be necessary prior to stating whether the effect of the probiotic in the digestive tract could allow a limitation of the infection.

In regard to the second hypothesis, several authors have reported the effect of probiotics on shrimp immunity (Rengpipat *et al.*, 2000; Gullian *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2007). For instance, Rengpipat *et al.* (2000) showed, in *P. monodon* fed *Bacillus* S11, an enhancement of the cellular and humoral defence mechanisms with increases in the total Haemocyte count (THC), the phagocytic index and the antibacterial activity in the haemolymph. Li (2008) recently reported immunity enhancement of *L. vannamei* infected with pathogenic *Vibrio* and fed probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7. These authors showed increased THC, phenoloxidase activity, respiratory burst and percentage phagocytosis in the probiotic-fed



shrimps. Recently, Chiu *et al.* (2007) reported that *Lactobacillus plantarum* administered at  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> of feed was able to induce immune modulation and enhanced immunity ability of *L. vannamei*, increasing its resistance to *V. alginolyticus* infection. Indeed, these authors showed enhanced cellular and humoral responses such as phenoloxidase activity, superoxidase activity, clearance efficiency against *V. alginolyticus*, and proPO and peroxinectin (PE) mRNA transcription levels in the probiotic-fed shrimps. Interestingly, they showed that when probiotic was added, the respiratory burst in the shrimps' haemolymph were reduced through increase in SOD and PE gene transcription and suggested that *L. plantarum* may enhance antioxidant status of the shrimp concomitantly to increasing in the immune response. At this stage, similar studies on the effect of *P. acidilactici* on the shrimp immune system and antibacterial activity in the haemolymph would be useful to assess this second hypothesis.

Finally both hypotheses, competitive exclusion with pathogen and increase in immune ability and antioxidant status of the host, might be involved in the same probiotic strain. Indeed, Li (2008) recently showed the positive effect of the probiotic bacteria *Arthrobacter* XE-7 on the resistance of juvenile *L. vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and concluded that there was competitive exclusion of the pathogen establishment inside the host and a conferred immunostimulation by the probiotic.

## 5. Conclusion

In conclusion, the results of the present investigation indicate that infection by a pathogenic *vibrio* produces significant alterations in the antioxidant defence system and results in increased oxidative stress in *L. stylirostris*. Dietary supplementation with *P. acidilactici* at  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> for one month prior to the challenge allowed these adverse effects to be reduced and conferred better resistance of the shrimps to *V. nigripulchritudo*.

## Acknowledgments

We thank the technical staff of the experimental facilities at St Vincent, New Caledonia for their help.

## References

- 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.
- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Balcázar, J.L., 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
- Baumann, P., Schubert, R.H.W., 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. *Vibrionaceae*. In: Holt, J.G., Krieg, N.R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, pp. 516– 550.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojouis, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182-193.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status in *Litopenaeus stylirostris* shrimp. *Aquaculture*, submitted.
- Cheng, W., Wang, C.H., 2001. The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 137-144.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 364-377.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1-10.
- Clairbone, A., 1985. Catalase. In: R. Greenwald, Editor, *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, New York (1985), pp. 283-284.
- De la Peña, L.D., Nakai, T., Muroga, K., 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. in organs of orally infected Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* 30, 39-45.
- Draper, H.H., Hadley M., 1990. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186, 421-431.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* 71, 39-48.
- Goarant, C., Mérien, F., Berthe, F., Mermoud, I., Pérolat, P., 1999. Arbitrarily primed PCR to type *Vibrio* spp. pathogenic for shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1145-1151.

- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105-113.
- 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.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodríguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Günzler, A., and 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), pp. 285-290.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172,111-123.
- Hsieh, S-H., Ruan, Y-H., Li, Y-C., Hsieh, P-S., Hu, C-H., Kuo, C-M., 2008a. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275, 335-341.
- Hsieh, T-J., Wang J-C., Hu, C.Y., Li, C.T., Kuo, C.M., Hsieh, S-L., 2008b. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 581-588.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72, 215-224.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., and Zilmer, M., 2003. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition* 90, 449-456.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados, M.C.L., Cruz-Lacierda, E.R., de la Peña, L.D., 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91, 1-13.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Leano, E.M., Paner, M.G., 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture* 164, 337-349.
- Le Moullac, G., Soye, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 621-629.
- Le 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. *SICCPS 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, J., 2008. Immune Responses and Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by Probiotic Bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 39, 477-489.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., Qin, J.G., 2008a. 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.
- Li, C.C., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2008b. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection, *Fish and Shellfish Immunology*, doi: 10.1016/j.fsi.2008.09.014.
- Lightner, D.V., 1992. Shrimp pathology: major diseases of concern to the farming industry in the Americas. *Mem. Congr. Ecuat. Acuicult.*, 177-195.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. *Fish Pathology* 33, 165-180.
- 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; 34-45.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lowry O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lykkesfeldt, J., 2007. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinical Chimica Acta* 380, 50-58.
- 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.
- 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, Part C* 145, 315-320.
- 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.
- Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 254, 32-39.

- Reynaud, Y. (2004) Utilisation de bactéries probiotiques comme substituts aux antibiotiques, en élevage larvaire de crevette *Litopenaeus stylirostris*. Mémoire de DEA Océanologie Biologique et Environnement Marin Option Connaissance des Producteurs Primaires, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), pp. 34.
- Reynaud, Y., 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie. Thesis presented at l'Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, Ecole doctorale Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire. 222 pp.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. *Aquaculture* 191, 271-288.
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., Austin, B., 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 32, 151-155.
- Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., Stern, S., 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture* 273, 405-415.
- 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.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191, 133-144.
- Sen, C.K., 1995. Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39-177-196.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Stadtman, E.R., 1986. Oxidation of proteins by mixed function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem.* 11, 11-12.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655-671.
- Wabete N., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Massabau, 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.
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1-4.
- 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.

## CONCLUSION

Les travaux présentés dans la première partie de cette étude (Article 4) montrent que le traitement probiotique élève le statut antioxydant chez les crevettes saines et celles exposées à *Vibrio nigripulchritudo*. Chez ces dernières, l'effet probiotique s'est aussi traduit par une atténuation (i) de la stimulation des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) et (ii) des dégâts oxydatifs (MDA, carbonyl protéines) et par une amélioration de la survie des animaux. Par ailleurs, la diminution des niveaux d'infection chez ces animaux suggère, en plus, un mode d'action du probiotique *via* compétition-exclusion.

La deuxième étude réalisée (Article 5) a confirmé les résultats de la première, et a permis de préciser l'effet du probiotique sur l'évolution des défenses antioxydantes et des dégâts oxydatifs au cours de l'infection par le pathogène *V. nigripulchritudo* SFn1. Nous avons ainsi pu observer que l'infection par ce pathogène conduisait, dans les 24 heures, à un abaissement des défenses anti-radicalaires et à une élévation du stress oxydant. Ce résultat corrobore d'autres études sur le sujet (Mathew *et al.*, 2007), cependant soulignons que c'est la première fois que ce phénomène est montré chez des animaux infectés avec une bactérie pathogène par immersion. En effet, la plupart des études utilisent l'infection par injection qui n'est cependant pas la voie naturelle d'entrée des pathogènes (Saulnier *et al.*, 2000 ; Sarathi *et al.*, 2007). Quant à l'effet du probiotique, il s'est traduit par un maintien du niveau des défenses anti-radicalaires, par une limitation des dégâts associés au stress oxydant, et par une amélioration de la résistance des crevettes à l'infection.

L'ensemble de ces résultats nous a amené à proposer différentes hypothèses explicatives. Celles-ci sont présentées dans la figure 3.18.

Tout d'abord, le meilleur statut antioxydant des animaux traités au probiotique pourrait être lié : à une meilleure utilisation de l'aliment, en particulier des carbohydrates comme cela a été montré précédemment (Article 3), et/ou à d'hypothétiques propriétés antioxydantes de *P. acidilactici*.

**La première hypothèse**, discutée dans l'article 3, repose sur le lien entre le métabolisme des carbohydrates et le statut antioxydant de l'organisme, rappelé par Lygren et Hemre (2001). La

seconde hypothèse, fondée sur d'éventuelles capacités antioxydantes de *P. acidilactici* MA18/5M, n'a pas été abordée dans ce travail et mériterait des recherches complémentaires. De nombreux auteurs ont proposé que les propriétés antioxydantes de certains LABs pourraient en faire des candidats probiotiques intéressants (Lin et Yen, 1999). Les capacités antioxydantes de ces LAB reposent sur (i) la chélation de certains ions métalliques ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ...) (Ahotupa *et al.*, 1996), (ii) la production d'enzymes antioxydantes comme la SOD (Kullisaar *et al.*, 2002) ou (iii) la production de substances antioxydantes (glutathion et autres composés thiolés) (Rees et Pirt, 1979 ; Kullisaar *et al.*, 2002). Ainsi, après avoir sélectionné une souche de *Lactobacillus fermentum* (ME-3) sur ses capacités antioxydantes, Kullisaar *et al.* (2003) ont montré que cette souche élevait le TAS chez des patients sains.

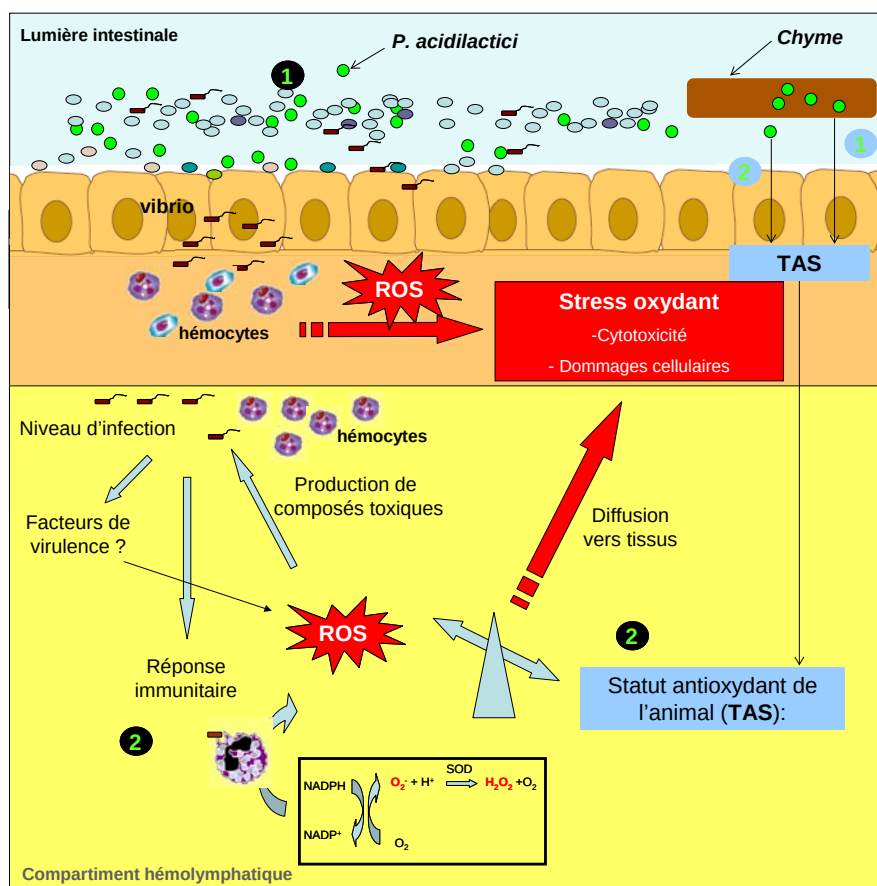


**Figure 3.18.** Représentation schématique des mécanismes hypothétiques conduisant aux effets mesurés de *P. acidilactici* sur la réponse de *L. stylirostris* à une infection bactérienne par *V. nigripulchritudo*.

① Compétition exclusion. ② Stimulation de la réponse immunitaire et élévation du statut antioxydant.

L'élévation du statut antioxydant (TAS) des crevettes nourries avec le probiotique passerait par : ① une meilleure utilisation de l'aliment ② et un effet antioxydant direct du probiotique.

Les niveaux d'infection plus faibles chez les animaux traités au probiotique, la stabilisation des défenses antioxydantes, ainsi que la limitation du stress oxydant (Article 5), pourraient s'expliquer par une compétition-exclusion du pathogène au niveau intestinal ou par une action sur l'immunité, en parallèle à une élévation du statut antioxydant. La première hypothèse est renforcée par les résultats présentés dans le premier chapitre, montrant un effet antagoniste *in vivo* de *P. acidilactici* vis à vis de la flore intestinale vibrionacée; et par l'effet d'inhibition montré *in vitro* contre *V. nigripulchritudo* (Reynaud, 2004). Ainsi, un plus bas niveau d'infection se traduirait par une réponse immunitaire moindre et donc par une production inférieure de ROS. Précisons néanmoins que cette hypothèse repose sur l'idée que le tractus intestinal serait la principale voie d'infection de *V. nigripulchritudo*. Des travaux sur le sujet sont en cours au laboratoire, et si cette voie d'infection devait être confirmée, l'hypothèse proposée ici mériterait d'être validée *in vivo*.

**La seconde hypothèse** permettant d'expliquer nos résultats est une stimulation parallèle de la réponse immunitaire et des défenses antioxydantes chez les animaux recevant le probiotique. Dans ce cas, l'intensité de la réponse immunitaire permettrait la réduction du niveau d'infection alors que l'accumulation de ROS associée serait neutralisée par des défenses anti-radicalaires plus élevées. De façon intéressante les résultats obtenus par Chiu *et al.* (2007) chez *L. vannamei* suggèrent le même phénomène. En effet ces auteurs ont montré, d'une part, que *L. plantarum* administré à  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> d'aliment permettait une stimulation de la réponse immunitaire et une élévation de l'activité de la SOD, ainsi qu'une transcription supérieure du gène codant pour la peroxinectine, et, d'autre part, que le niveau du « burst respiratoire » était équivalent chez les animaux traités et témoins. Ces auteurs ont alors conclu à une modulation de la réponse immunitaire et à une amélioration des capacités antioxydantes des crevettes nourries avec *L. plantarum*. Dans notre cas, une étude complémentaire de l'effet de *P. acidilactici* sur l'immunité de la crevette (Rengpipat *et al.*, 1998 ; Chiu *et al.*, 2007) devrait permettre de tester cette hypothèse.

Ce chapitre conclut les travaux réalisés en laboratoire. Nous avons ainsi démontré des effets du probiotique sur la nutrition, la croissance et la résistance à une infection bactérienne de la crevette *L. stylirostris*. La question s'est ensuite posée de savoir si l'application du probiotique en conditions réelles d'élevage se traduirait par des gains significatifs en terme de



croissance, de transformation de l'aliment et de survie. C'est à cette question que nous avons tâché de répondre au cours des travaux présentés dans le chapitre suivant.

---

## **Quatrième chapitre :**

**Application des résultats expérimentaux à l'échelle pilote : évaluation des effets de *P.acidilactici* sur une ferme commerciale au cours d'un épisode de vibriose**

---



## INTRODUCTION

Préalablement à une application à l'échelle commerciale du probiotique, une étape importante est la validation sur le terrain des résultats obtenus en laboratoire. Ce chapitre présente les résultats de l'évaluation des effets de *P. acidilactici* en conditions réelles d'élevage sur une ferme de Nouvelle Calédonie. Cependant, afin de pouvoir réaliser ce travail, il nous a fallu mettre au point une méthode adaptée aux expérimentations en bassin. En effet, d'un point de vue logistique, les bassins représentent des unités expérimentales difficiles, sinon impossibles à répliquer, notamment en systèmes d'élevage semi-intensifs où chaque bassin a une superficie proche de 10 hectares.

Nous avons donc évalué tout d'abord une méthode d'élevage en cages flottantes permettant de maintenir les animaux dans un même bassin et de réaliser des réplifications (Article 6). Puis à l'aide de cet outil, nous nous sommes intéressé aux effets du probiotique en conditions réelles d'élevage (Article 7). Précisons que ce travail a été réalisé sur la ferme SeaFarm, affectée de façon récurrente depuis 1997 par le « syndrome d'été » (Lemonnier *et al.*, 2007), et ayant fait l'objet d'une étude pluridisciplinaire dans le cadre du programme DESANS (Herbland et Harache, 2008).



**Article 6: Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions<sup>1</sup>**

Liet Chim<sup>a\*</sup>, Mathieu Castex<sup>a</sup>, Dominique Pham<sup>a</sup>, Pierre Brun<sup>a</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>, Philippe Schmidely<sup>b</sup>, Catherine Mariojouis<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD/NC), Campus de l'IRD, Anse Vata, BP 2059, 98848 Nouméa Cedex, New-Caledonia.

<sup>b</sup> AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, Cedex 5, France

Keywords: *Litopenaeus stylirostris*, Floating cages, Pons experimentation, Replicates, Statistical power

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 76 ; fax : +687 35 11 77

E-mail address: [Liet.Chim@ifremer.fr](mailto:Liet.Chim@ifremer.fr)

---

<sup>1</sup> Aquaculture 279 (2008) 63-69





## Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions

Liet Chim<sup>a,\*</sup>, Mathieu Castex<sup>a</sup>, Dominique Pham<sup>a</sup>, Pierre Brun<sup>a</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>, Philippe Schmidely<sup>b</sup>, Catherine Mariojous<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, New Caledonia

<sup>b</sup> AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 5, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 October 2007

Received in revised form 30 March 2008

Accepted 31 March 2008

#### Keywords:

*Litopenaeus stylirostris*

Floating cages

Pond experimentation

Replicates

Statistical power

### ABSTRACT

The New Caledonia blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* is commercially produced under semi-intensive rearing conditions. The size of the farming earthen ponds (5–10 ha) and the subsequent production constraints make it difficult to use them as experimental units for random experiments. Moreover, since every pond has its own characteristics, ponds' effects cannot be ruled out, thus making it hard to define true replicates.

In order to design future experiments under conditions resembling those used in production, we evaluated the possible use of floating cages as experimental units with the aim of assessing treatment effects with a reasonable statistical power. To this end, two sets of floating cages were placed respectively in two different ponds in a commercial farm. In both cases the zootechnical conditions in the cages were similar in post-larvae origin, management, and diet and feeding regime.

The aim of the study was to evaluate on a technical basis the possibility of rearing shrimps in floating cages set up in earthen ponds and to assess this method from a statistical standpoint. Shrimps reared in and outside the cages showed comparable growth and survival rates. The variability in the zootechnical parameters between cages, expressed as the estimated coefficient of variation (CV) for survival rate, total final biomass (g), final body weight (g), daily increment in body weight ( $\text{g day}^{-1}$ ) and FCR were 11.0, 13.7, 4.4, 5.4, and 7.0%, respectively. On the basis of these figures, we calculated for a given statistical power (80%) the number of replicates (cages) that would be required to reveal significant differences between two treatments, at a 5% level of significance. We found that for expected differences of 20% from the control mean, 3 and 6 floating cages per treatment would be reasonable to determine statistical differences for growth parameters and survival rate, respectively. Moreover, we showed a significant pond effect in regard to survival and growth between the two sets of cages. These results illustrated the within-farm variability among the ponds, and confirmed that the specific characteristics of each pond from the same farm make it difficult to use the ponds themselves as experimental units.

The study demonstrates that rearing in floating cages is an economical, powerful and sensitive experimental tool for shrimp culture studies specifically carried out under conditions close to semi-intensive production.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In New Caledonia, the shrimp *Litopenaeus stylirostris* is reared in semi-intensive systems. Such systems are widely used in shrimp production countries worldwide (Chim et al., 2003), and contribute significantly to the total farmed shrimp production estimated at nearly three million metric tonnes in 2004 (FAO, 2006). In a semi-intensive rearing system, earthen ponds from 1 to 20 ha are commonly used. Irrespective of their size, ponds also differ greatly in terms of their depth, hydrodynamics and the nature of their sediment. This rearing system (Clifford, 1994) is midway between an intensive agro-

system, where the main parameters are under control (Shigueno, 1975; Burford et al., 2003; Browdy and Moss, 2005), and an extensive system, comparable to an ecosystem where the human impact is relatively slight (Burford et al., 2004). More generally, semi-intensive aquaculture systems reveal similar patterns to polycultures where natural productivity, phytoplankton, zooplankton and benthos must be taken care of as well as the cultured species. The main practical consequence is that two sources of food are therefore available for the cultured species: the artificial feed provided and the natural biomass endogenously produced by the pond (Rubright et al., 1981; Tacon, 1996; Nunes et al., 1997).

Scientific and technical studies carried out under semi-intensive farming conditions to assess the effects of treatments on zootechnical results are highly complex due to the many logistical, economic and/or

\* Corresponding author. Tel.: +687 35 25 74; fax: +687 35 11 77.

E-mail address: [Liet.Chim@ifremer.fr](mailto:Liet.Chim@ifremer.fr) (L. Chim).





Fig. 1. Set-up of a cage (4 m × 2 m) in the shrimp pond.

experimental constraints involved. The most obvious constraints may be summarized as follows: (i) delivery of a high number of post-larvae (PL) coming from the same batch, which have to be seeded at the same time in all the ponds subject to experimentation, (ii) calculation of the final survival rate affected by possible under- or overestimation, particularly regarding the number of seeded PL and subsequently harvested animals, (iii) the supply of experimental feeds at an industrial scale and (iv) the high within-pond variability of zootechnical responses, deriving *inter alia* from differences in pond characteristics, the origin and quality of post-larvae, and rearing management. Consequently, when ponds are used as experimental units, setting up experiments of high power and sensitivity may lead to a large increase in replicates of each treatment (ponds in this case), which can often be difficult to find, especially for medium and low level treatment effects (Cohen, 1988). Moreover, the cost per replicate pond in such cases is high, both in terms of the capital required to purchase and house the animals and of the labour needed to rear them and to collect representative data.

Paquotte et al. (1998) have studied an original shrimp farming technology in small floating cages (15 m<sup>2</sup>) over three successive years.

This technology has been shown to be very efficient from a zoo-technical standpoint. Parameters such as growth rate, survival rate and food conversion ratio (FCR) reached the same levels as the best results obtained with intensive farming in ponds. More recently, other studies have confirmed the efficiency of this original rearing system (Lombardi et al., 2006; Yusufzai and Singh, 2005; Zarain-Herzberg et al., 2006).

In our study we evaluated the use of floating cages immersed in earthen ponds as an experimental tool in order to design future powerful and economical experiments focused on two main objectives: (i) to assess the zootechnical feasibility of rearing shrimp in floating cages set up in earthen ponds, (ii) to estimate inter-cage variability for various zootechnical parameters (survival, growth, FCR, etc.) and subsequently to estimate the number of replicates that would be needed to measure treatment effects within a given statistical power.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Farm site and study period

The study was undertaken in two earthen ponds of about 7 ha each (pond A and pond B) in a semi-intensive farm in Bourake, New Caledonia (21°55' South; 165°57' East). The depth of the ponds was between 80 cm (water inlet) and 150 cm (water outlet). The experiment was conducted over 10 weeks from April to June 2006.

### 2.2. Floating cages

Ten floating cages of 14 m<sup>2</sup> net surface each were built by IFREMER New Caledonia (Fig. 1). The cages' rectangular frames (4 m × 2 m) consisted of four polyvinyl chloride pipes (PVC; 110 mm diameter) connected by PVC elbows and waterproofed with silicone adhesive.

The plastic net (Netlon®) of 1 cm mesh size was 4.5 m long, 2.5 m wide and 0.5 m high. The non-submerged part of the net was wound

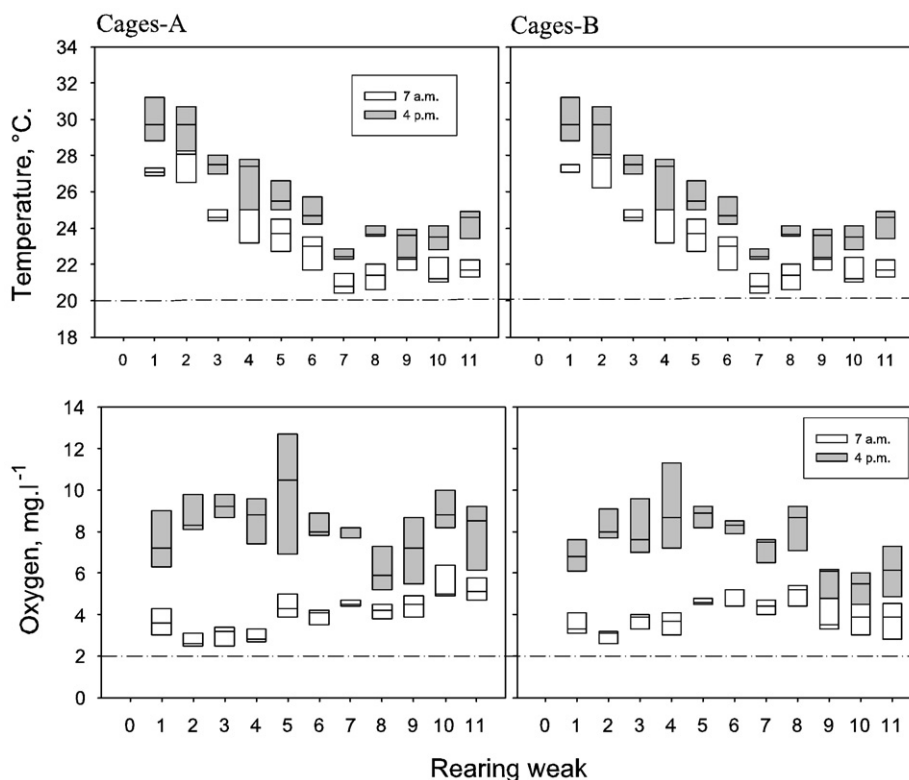


Fig. 2. Box plots for weekly water temperature (°C) and oxygen concentration (mg l<sup>-1</sup>) in Cages-A and Cages-B measured at 7.00 am and at 4.00 pm during the period of the experiment.

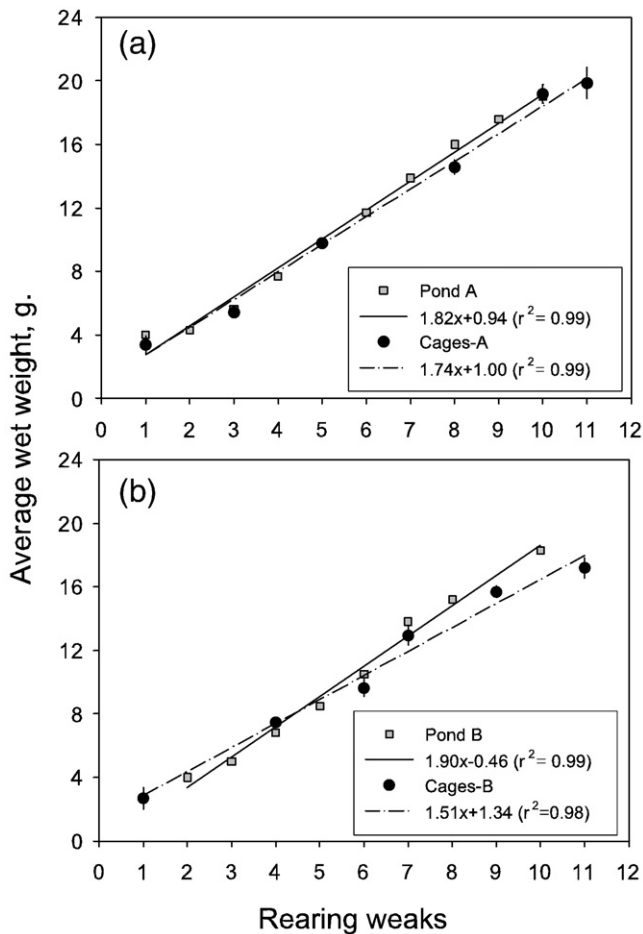


**Fig. 3.** Comparative weekly average wet weight (g) of shrimps reared in Cages-A (a) and Cages-B (b) and in their respective ponds. Straight line equations obtained by linear regressions of average wet weight function of the rearing weeks are indicated. Error bars indicate standard errors ( $P < 0.05$ ).

round the pipes with woven metal cables. Fifty centimetres of the net remained immersed in the water. The cages were covered with nylon net to prevent the shrimp from jumping out of the cages. Each cage was anchored to the substrate at its four corners using four vertical metal bars attached by rope. The fabrication cost per cage was estimated at 300 euros. A wooden platform was built in each pond to access the cages.

### 2.3. Experimental design

An experiment design with 5 cages was duplicated in two parts of the two earthen ponds (pond A and pond B), where the depth was of 100 cm, giving a total of 10 floating cages arranged in two sets of 5 floating cages tied together. The distance between two cages of the same set was about 50 cm. In the text, both sets were referred as Cages-A and Cages-B.

Shrimp were sampled weekly in one cage in pond A and pond B alternately. Each cage was sampled only once in the course of the trial. The animals were captured with a cast net spread along the surface of the cage. Each sample was set up with 30 shrimps. It is agreed that sampling less than 10% of the initial population does not affect the survival rate (Bouyer, 1997).

### 2.4. Shrimp breeding

#### 2.4.1. In ponds

The animals used in this experiment were first pre-grown in the two ponds. On February 21, ponds A and B of the farm were stocked at

a density of respectively 17 and 18 post-larvae (PL)  $m^{-2}$  with animals originating from the same hatchery batch. The animals were reared according to standard semi-intensive farming practices in New Caledonia (Clifford, 1994) until they reached the desired size ( $\pm 3$  g.).

Shrimps were fed twice a day with a commercial formulated feed. The feeding rate was adjusted by the farm's technical staff according to the weekly estimated body weight, the survival rate and the amount of remaining feed in the feeding trays.

#### 2.4.2. In floating cages

Cages-A and Cages-B were seeded with shrimps coming from each respective pond. Shrimps were captured using a cast net and then transferred into the cages. During the transfer the animals were counted to adjust precisely the number of stocked animals. Finally each cage was filled up with 400 animals for a final approximate density of 29 animals  $m^{-2}$  of net area. Shrimp initial body weights were respectively  $3.4 \pm 0.6$  g and  $2.7 \pm 0.7$  g in Cages-A and in Cages-B. The trial was conducted over 10 weeks.

One feeding tray was set up in each cage. Shrimps were fed the same commercial pellets used by the farm (purchased from the company Moulins de Saint Vincent, New Caledonia). Feed was delivered exclusively on the feeding tray in order to be able to estimate consumption. Visual estimates of feed consumption were made 2 h after each meal and by the same person to avoid any skew. The animals were fed twice a day, at 8.00 am and 3.00 pm, and the feeding rate was adjusted every day for each cage according to the feed remaining.

### 2.5. Zootechnical parameters

The final survival rates were calculated for each cage by counting the number of remaining shrimps and comparing it with the initial stock, excluding the 30 sampled animals per cage.

Individual body weights were recorded for 10% of the population at stocking (estimated mean initial weight) and for all the remaining shrimps at the end of the experiment. Apparent individual growth rate ((individual final body weight – estimated mean initial weight) / rearing days), final biomass and feed conversion ratio (FCR = amount of given feed / shrimp wet biomass gain) were then calculated for each cage. In addition, the animals were weighed weekly in order to track their growth (mean weight and growth rate).

### 2.6. Environmental parameters

The water temperature was recorded continuously with two optic stowAway Temp® sensors immersed in Cages-A and Cages-B. Oxygen

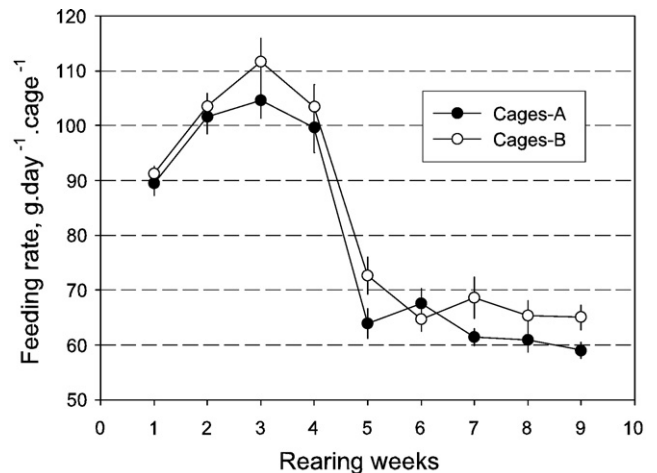


**Fig. 4.** Comparative weekly mean amounts of feed delivered in Cages-A and Cages-B during the trial. Error bars indicate standard deviations ( $P < 0.05$ ).

**Table 1**

Zootechnical results of rearing in cages for both sets in ponds A and B

|                         | Survival (%)       |                    | Total cage biomass (g) |                     | Final shrimp weight (g) |                  | Growth rate (g day <sup>-1</sup> ) |                     | FCR                |                    |
|-------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|                         | Cages-A            | Cages-B            | Cages-A                | Cages-B             | Cages-A                 | Cages-B          | Cages-A                            | Cages-B             | Cages-A            | Cages-B            |
| <i>n</i>                | 5                  | 5                  | 5                      | 5                   | 5                       | 5                | 5                                  | 5                   | 5                  | 5                  |
| Mean                    | 31.1               | 37.8               | 2291                   | 2408                | 19.91                   | 17.22            | 0.226                              | 0.199               | 2.29               | 2.28               |
| SD                      | 3.4                | 4.2                | 346                    | 299                 | 0.99                    | 0.63             | 0.014                              | 0.009               | 0.19               | 0.13               |
| Variance <sup>(1)</sup> | 0.001 <sup>a</sup> | 0.002 <sup>a</sup> | 120,323 <sup>a</sup>   | 89,707 <sup>a</sup> | 0.98 <sup>a</sup>       | 0.4 <sup>a</sup> | 0.0002 <sup>a</sup>                | 0.0001 <sup>a</sup> | 0.036 <sup>a</sup> | 0.016 <sup>a</sup> |
| Coef var                | 0.108              | 0.111              | 0.151                  | 0.124               | 0.05                    | 0.04             | 0.06                               | 0.044               | 0.003              | 0.056              |
| Mean CV* (%)            | 11.0               |                    | 13.7                   |                     | 4.4                     |                  | 5.4                                |                     | 7.0                |                    |

Different superscript letters within the same line indicate significant differences among treatments variance with Fisher test for variance equality.

<sup>(1)</sup>Fisher test for variance equality.

\*Coefficient of variation (CV)=(pooled standard deviation/mean)×100.

measurements were also carried out twice a day (7.00 am and 4.00 pm), for both sets of cages, with an oxymeter (WTW OXI315i).

### 2.7. Statistical analysis

The data were statistically analysed by the statistical package Stat View (SAS Inc., Cary, NC, USA). After checking normality and homogeneity of variance (*F*-test) for all the zootechnical parameters, comparisons of final results between Cages-A and Cages-B were made using *t*-test for independent comparison of means. Survival percentages were also assessed by a *t*-test after arcsine transformation (Sokal and Rohlf, 1995).

*A priori* power, *post hoc* power and sensitivity calculations were carried out using the free internet program G\*Power 3 (Faul et al., 2007). Estimate of the standardized effect size was made in accordance with Cohen (1988), the level of significance was fixed at 5% and the desired power at 80% as commonly stated (Hayes, 1987; Cohen, 1988).

*A priori* analysis — For *a priori* analysis we considered two treatments in a completely randomized design with two-tailed *t*-test of significance. *A priori* analysis was carried out to estimate the number of replicates that would be required, based on CV estimates, to show significant differences with an error type I probability ( $\alpha$ ) of 5% and a power of 80%, in future floating cages experiments with a view to comparing two treatments.

*A posteriori* analysis and sensitivity analysis — *Post hoc* power analyses were implemented to assess *a posteriori* the power of the study for a completely randomized design with two treatments using a one-tailed *t*-test of significance. In this case the pond effect was considered as a treatment effect (fixed effect). It is important to specify that the ponds used under semi-extensive rearing conditions cannot be considered as similar entities especially in regard to hydraulic statements: (i) they have different shapes and areas (in the present case 6.9 and 7 ha respectively for ponds A and B), (ii) different orientations to the wind and (iii) different water inlet and outlet

positions. The outcome variability generally obtained among the ponds on the same farm confirmed these considerations, which corroborate the assumption of pond effect as a treatment effect.

Sensitivity analysis was also conducted to determine the size of the effect that the experiment could detect given the type I error probability ( $\alpha$ ), type II error probability ( $\beta$ ), and the number of replicates for all the parameters considered. The size of detectable effect was recorded as the minimum detectable difference (%) between the two ponds.

## 3. Results

### 3.1. Temperature and oxygen

Temperature over the rearing period was similar in Cages-A and in Cages-B (Fig. 2). The temperature, around 30 °C during the first week, started to decrease from the third week to reach values around 22 °C at week 7. Thereafter, water temperature remained stable until the end of the experiment.

Oxygen concentrations also changed similarly for both sets of cages (Fig. 2). From week 8 to the end, the variation in oxygen concentration between morning and afternoon decreased. The overall values measured never went below 2 ppm.

### 3.2. Zootechnical results

#### 3.2.1. Ponds (Farm owner, pers. com.)

The average zootechnical results for shrimps reared in the ponds were of the same order as the farm's previous crops. According to the farmer's records, the estimated survival rates were 30.7% and 31.3%, respectively in ponds A and B. The survival rate at this particular farm since 1997 fluctuated between 22% and 38% depending on the year (Lemonnier et al., 2006), which is lower than the average survival rate observed in other New Caledonian farms (54.7±4.4%; *n*=39; year 2004–05).

The growth of the animals was in accordance with the general growth rate recorded at this farm during the same season (Fig. 3(a) and (b)). FCR were of 2.67 and 2.57 for pond A and pond B respectively.

**Table 2**Estimated number of replications needed in shrimp experiments depending of which rearing system is used<sup>a</sup>

| Experimental design | Parameters        | Average CV <sup>b</sup> | Expected differences, % of mean <sup>a</sup> |    |    |    |    |    |
|---------------------|-------------------|-------------------------|----------------------------------------------|----|----|----|----|----|
|                     |                   |                         | 5                                            | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| Cages               | Survival (%)      | 11                      | 71                                           | 20 | 10 | 7  | 5  | 4  |
|                     | Final body weight | 5                       | 18                                           | 6  | 4  | 3  | 3  | 2  |
|                     | Daily growth rate | 6                       | 23                                           | 8  | 4  | 3  | 3  | 3  |
|                     | Final biomass     | 14                      | 126                                          | 32 | 15 | 9  | 7  | 5  |
|                     | FCR               | 7                       | 32                                           | 9  | 5  | 4  | 3  | 3  |
| Pond                | Survival (%)      | 16                      | 207                                          | 48 | 21 | 12 | 8  | 6  |
|                     | Final body weight | 8                       | 43                                           | 12 | 6  | 4  | 3  | 3  |
|                     | Daily growth rate | 5                       | 21                                           | 6  | 4  | 3  | 3  | 3  |
|                     | FCR               | 8                       | 40                                           | 11 | 6  | 4  | 3  | 3  |

<sup>a</sup> Assumes a randomized design with two treatments, two-tailed test of significance, and power of 80% at *P* < 0.05.

<sup>b</sup> Coefficient of variation=(pooled standard deviation/mean)×100.

**Table 3**Pond effect and *a posteriori* analysis for zootechnical results in cages from pond A and pond B

| Parameters                             | Differences (%) | <i>P</i> value <sup>a</sup> | Statistical power <sup>b</sup> | Sensitivity <sup>c</sup> (%) |
|----------------------------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Survival (%)                           | 22              | <0.05                       | >80%                           | 11                           |
| GR (g day <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup> | 14              | <0.01                       | 95%                            | 10                           |
| Final biomass (g)                      | 5               | n.s                         | 13%                            | 30                           |
| FCR                                    | 0               | n.s                         | 6%                             | 14                           |

<sup>a</sup> *t*-test for independent means comparison.

<sup>b</sup> Post hoc test achieved for a randomized design with two treatments (Ponds A and B), five replicates per treatment, one-tailed test of significance, and  $\alpha$ =5%.

<sup>c</sup> Results of sensitivity analysis, critical detectable population differences (%) with a power  $1-\beta$ =0.80, 5 replicates per treatment and  $\alpha$ =5%.

<sup>d</sup> GR=growth rate.

### 3.2.2. Floating cages

The growth of shrimps reared in Cages-A and Cages-B was comparable to those raised in the respective ponds (Fig. 3(a) and (b)). However, from week 10 of rearing, shrimp growth in Cages-A slowed in comparison with pond-reared animals.

The daily amounts of delivered feed per cage followed the same profile in Cages-A and Cages-B: (i) during the first 4 weeks animals were fed with 90–110 g of pellets per day and (ii) from week 5 these quantities decreased to 60–70 g per day. Finally, Fig. 4 shows that rations in Cages-A from week 5 to the end were slightly lower to those of Cages-B.

Table 1 gives zootechnical results and estimations of variability for the zootechnical parameters between cages (experimental unit), for both sets (Cages-A and Cages-B). For each parameter recorded, no significant difference was evident between variances of both sets of cages. The mean coefficient of variation ( $CV = \text{pool standard deviation of both ponds} / \text{mean}$ ) for survival rate, final biomass, final body weight, daily growth rate and FCR were of 11%, 13.7%, 4.4%, 5.4% and 7% respectively.

Based on average CV, the requisite number of replications needed to determine a treatment effect (5, 10, 15, 20, 25 and 30% of the mean) according to the parameter under consideration was calculated. Table 2 shows the results: for both sets of cages and for a fixed statistical power of 80%, the number of replicates that would be necessary to highlight significant differences, if they exist, at a level of significance  $\alpha = 5\%$  (two-tailed test of significance).

Table 3 summarizes statistical differences between both sets of cages according to survival, growth rate (GR), final biomass and FCR. These results show a significant pond effect in terms of survival rate ( $P < 0.05$ ) and GR ( $P < 0.01$ ). No significant differences were recorded for biomass and FCR. An *a posteriori* statistical power analysis and subsequent sensitivity calculation showed the statistical power and sensitivity (% differences between means) of the experimental design. Differences between Cages-A and Cages-B for final biomass (5%) and FCR (0.4%) were below the experiment's sensitivity levels for these parameters (respectively 30% and 14%), making them undetectable, if they existed, at  $\alpha = 5\%$ .

## 4. Discussion

The low survival rate during this study derived from high mortalities during the first 4 weeks of the trial (Castex et al., 2008). These mortalities simultaneously applied to shrimps reared both inside and outside the cages. Water temperature and oxygen concentrations measured in the cages stayed within the preferendum of *L. stylirostris* throughout the rearing period (Wabete, 2005; Chim et al., 2004). Consequently, these parameters did not provide any information that could help explain the mortalities recorded during the trial. It is more likely that the mortalities can be attributed to “summer syndrome”. Indeed, as recently observed on this farm (Goarant et al., 2006; Castex et al., 2008), a high prevalence and load of the causal pathogenic agent (*V. nigripulcritudinis*) were recorded in shrimp haemolymph sampled both in cages and in ponds when the mortalities occurred. Besides our last feeding trials carried out with a private farm during 1 month in 20 floating cages led to high survival rates ( $91.6 \pm 1.74\%$ ;  $n = 20$ ) (SICA, pers.com.). We conclude that the mortalities are unlikely to be linked to the rearing conditions in floating cages, since in other studies where no particular disease was reported, these same conditions led to survival rates ranging from 57% to 100% (Paquotte et al., 1998; Lombardi et al., 2006; Zarain-Herzberg et al., 2006).

In the present study, as the feed remains on the feeding tray were visually quantified to adjust the size of the next meal, this frequent alteration in feed ration may have led to a reduction of waste (Smith et al., 2002). After 4 weeks of rearing in the cages, the size of the rations (adjusted daily) was substantially reduced in both sets. This decline in the shrimps' consumption can be attributed to (i) the high

mortalities during the first 4 weeks of the experiment (Castex et al., 2008), (ii) the drop in water temperature (Chim et al., 2004) and (iii) the shift in the feeding behaviour from juvenile to sub-adult shrimps (Nunes et al., 1997). Moreover, during the final 3 weeks, rations delivered to Cages-A were lower than those to Cages-B, which is consistent with the higher recorded final biomass in Cages-B. Further, despite of the high mortalities recorded during the trial, the FCR were close to 2 in the cages. Interestingly, these FCR were, for Cages-A and Cages-B, 13% and 17% lower than those obtained in the respective ponds, where feed was adjusted on a weekly basis. This result could be accounted for by the daily adjustments of feed rations and feeding exclusively on feeding trays. This practice, which allows feed rations to be precisely quantified, is regarded as a major advantage over other traditional feed delivery methods, especially when ration adjustment is made on a daily basis (Jory et al., 2001; Nunes and Suresh, 2001). These results are relevant for checking the accuracy of the daily visual adjustment method for feed remaining in the feeding trail. In addition, the bio-fouling which grew on the netting of the cages may, through its nutritional contribution to the total shrimp diet, be another relevant factor for explaining the best FCR obtained in cages (Paquotte et al., 1998; Pérez-Rostro et al., 1999; Yusufzai and Sing, 2005; Zarain-Herzberg et al., 2006). For instance, it has been shown that natural food greatly improved growth parameters during the nursery phase of *Farfantepenaeus paulensis* in indoor systems and in cages (Thompson et al., 2002; Ballester et al., 2007).

With final average body weight of  $18.5 \pm 1.7$  g and final biomass of  $245 \pm 30$  g  $m^{-2}$  for all the cages, the results after 10 weeks growth in floating cages were comparable to those generally observed in semi-intensive ponds in New Caledonia (unpublished). To our knowledge, this study is the first reported attempt to rear shrimps in floating cages inside earthen ponds. It supports preceding studies, having shown that floating cages were well suited to this purpose (Paquotte et al., 1998; Zarain-Herzberg et al., 2006; Lombardi et al., 2006). Nevertheless, the main objective of our study was to assess this original rearing method as an experimental tool and not for production ends. For this reason we used a relatively low rearing density (29 shrimps  $m^{-2}$ ) compared to previously cited studies (Paquotte et al., 1998; Zarain-Herzberg et al., 2006; Lombardi et al., 2006).

Overall, we conclude that the floating cages rearing method does not present any zootechnical biases which may mask the effects an experimenter wants to highlight, thereby making it a tool of choice for experiments in ponds. However, while our method enables studies to be carried out under conditions similar to those used for farming (e.g. similar water quality), there are two fundamental differences. First, animals raised in floating cages have no access to pond sediment, which can influence positively by providing living prey (Boucher, 2004) or negatively if its biochemical state is altered (Avnimelech et al., 2004). Nevertheless, neither the present results nor our successive trials with floating cages to evaluate dietary probiotic effects on shrimps in commercial ponds (Castex et al., 2008) suggest a potential bias due to sediment-free conditions. Secondly, as was previously discussed, the net acts as a substratum for the development of periphyton and associated benthos, both of which can contribute to shrimp nutrition.

With these limitations taken into account, trials in floating cages are very probably more representative of the pond conditions than laboratory trials in clear water and thus offer a good compromise. Indeed the results of our trials confirm that zootechnical outcomes in floating cages are comparable to those recorded in the pond.

The second objective of the study was to assess the floating cages method from a statistical point of view. The aim was to determine, based on an *a priori* power analysis (Aaron and Hays, 2004), the number of replicates needed for powerful experiments in order to detect potential significant differences between treatments. The term ‘power’ signifies the capacity of an experiment to detect real differences, if they exist, at the desired significance level. Therefore,



power depends on the magnitude of the differences to be detected, the significance level, and the degree of experimental error (Aaron and Hays, 2004). Before conducting an *a priori* power analysis and then estimating the number of replicates needed for an experiment of known power and sensitivity, it is essential to have a good estimate of the variability among replicates. This variability is, however, generally not known in advance and must be estimated from previous experiments (Berndtson, 1991). For this reason, the present trial was used as a pre-experiment study to assess the variability between floating cages. The experiment was duplicated in two ponds in order to increase the reliability of the coefficient of variation estimate for each zootechnical indicator considered. For both sets of cages, the experiments were conducted according to the same modalities, and were independent of each other with measurements of equivalent technical precision. These criteria were reported to be necessary for appropriately estimating the CV (Berndtson, 1991). The results show that the homogeneity of variances is confirmed in both sets of cages for all the parameters under consideration. It was then possible to estimate an average CV based on the pooled variance estimate and an estimate of the mean. For the parameters studied (mean survival rate, final body weight, daily growth rate and FCR), the number of necessary replicates decreases substantially when the expected difference of the means goes up from 5% to 10% with a statistical power of 80%. It is important to state that we considered using a two-tailed test. A one-tailed test will have reduced replication requirements but, given that the outcome of an experiment is generally unknown in advance, a two-tailed test was probably more appropriate. Based on these results, the floating cages system appears to be a reasonable tool for revealing differences of at least 10% between two treatments. Moreover, for expected differences of 20% from the control mean, 3 and 6 floating cages per treatment will be reasonable to determine statistical differences for growth parameters and survival rate respectively. However, among the parameters measured, the final biomass, with an average CV of 14%, does not appear to be a sensitive indicator in the present instance.

An *a posteriori* power analysis can be a useful supplement to hypothesis testing in cases where significant results are not detected (Myers and Well, 2003). In our study, this was the case for the final biomass in regard to the pond effect. The *post hoc* analysis showed an observed power of only 13%, which cannot rule out the existence of a real difference. An additional and more appropriate use of an *a posteriori* power analysis is the calculation of sensitivity (Aaron and Hays, 2004). We showed that to detect a significant difference in final biomass between sets of Cages-A and Cages-B, the pond effect should have been higher than 30%, whereas in the present instance it was only 5%. It can thus be concluded that the experiment was not sufficiently powerful to detect a difference in the final biomass in regard to the pond effect, if it existed.

Finally, it seemed interesting to point out the advantage of the floating cages method compared to experiments carried out with earthen ponds. To do so, we compared the replication requirements for a fixed power (80%) and significance level ( $\alpha=5\%$ ) for both systems (rearing in ponds and in cages). Such a comparison depends greatly on the estimation of the coefficient of variation of the parameters considered in both systems. For the pond system, we estimated a CV for each parameter (mean survival, final body weight, daily growth rate and FCR) from results obtained in six similar earthen ponds (1500 m<sup>2</sup>) from our facilities. The ponds were seeded at the same time with larvae from the same hatchery batch, harvested on the same date, and managed in the same way in accordance with commonly used practices in New Caledonia. The number of replicates needed, taking all zootechnical parameters into consideration, is shown in Table 2. Whatever the expected differences for survival (from 5% to 30%), the number of replicates needed is greater if ponds are used as experimental units, which is directly linked to higher CV between ponds than cages. The same trends are observed for final body weight and FCR up to 15%

difference between treatments. Beyond that, the number of replicates becomes similar for both cages and ponds, all parameters taken into consideration.

These results thus show that floating cages are a more powerful and sensitive experimental tool for studies undertaken in practical pond conditions. It is important to specify that the CV determined in the present case for the pond system cannot be an accurate estimate of the true variability in and between the farm's earthen ponds. Indeed, the present study sought to minimize sources of variability (ponds of the same surface and the same shape, same origin for PL, same period of breeding, same management, etc.). However in within- and/or between-farm experiments the variability of sources cannot usually be controlled in the same way. As a direct consequence and in view of the variability between the semi-intensive systems, the CV will be fatally increased, leading to a rise in the number of replicates necessary for experiments of same power. These conditions would make such experiments unrealistic, both logistically and economically.

In conclusion, our study shows that floating cages provide a reliable method for carrying out powerful experiments under near-pond conditions, and are an economical and handy experimental tool to assess, on a pilot scale, scientific results obtained under laboratory controlled conditions.

## Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Northern and Southern Provinces of New Caledonia. The authors would like to thank the whole IFREMER staff from the Département Aquacole Calédonien. They kindly provided data from the six rearing experiments used for replicate calculation and helped us in the design, building and setting up the cages and the final shrimp sampling process. We would also like to thank the owner of the private farm and his employees for their assistance throughout the trial period.

## References

- Aaron, D.K., Hays, V.W., 2004. How many pigs? Statistical power considerations in swine nutrition experiments. *J. Anim. Sci.* 82, 245–254 (E. Suppl.).
- Avnimelech, Y., Ritvo, G., Kochva, M., 2004. Evaluating the active redox and organic fractions in pond bottom soils: EOM, easily oxidized. *Aquaculture* 233, 283–292.
- Ballester, E.L.C., Wilson Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C., 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* 269, 355–362.
- Berndtson, W.E., 1991. A simple, rapid and reliable method for electing or assessing the number of replicates for animal experiments. *J. Anim. Sci.* 69, 67–76.
- Boucher, G., 2004. Meiobenthos and bioindicators of the ecosystem quality. What interest for the shrimp culture? Styli 2003. Thirty years of shrimp farming in New Caledonia. Proceedings of the Symposium, Noumea-Kone, 2–6 June 2003, vol. 38, pp. 167–172. Actes Colloq. IFREMER.
- Bouyer, J., 1997. Méthodes statistiques: Médecine-Biologie. ESTEM, Editions INSERM, Paris. 351pp.
- Browdy, C.L., Moss, S.M., 2005. Shrimp culture in urban, superintensive closed systems. In: Costa Pierce, B.A. (Ed.), *Urban Aquaculture* Blackwell Science, Oxford UK, pp. 173–186.
- 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, 393–411.
- Burford, M.A., Preston, N.P., Minh, T.H., Hoa, T.T.T., Bunn, S.E., Fry, V.M., 2004. Dominant sources of dietary carbon and nitrogen for shrimp reared in extensive rice-shrimp ponds. *Aquacult. Res.* 35, 194–203.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P., Majojoul, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182–193.
- Chim, L., Lucien Brun, H., Lemoullac, G., 2003. Food and agricultural sciences, engineering and technology resources — marine shrimp farming. In *Knowledge for Sustainable Development. An Insight into the Encyclopaedia of Life Support Systems*. Unesco Publishing-Eolss Publishers, Oxford, UK. 21pp.
- Chim, L., Galois, R., Martin, J.L.M., Lemaire, P., Wabete, N., Massabuau, J.C., Cuzon, G., 2004. Temperature effects on the nutrition of *Litopenaeus stylirostris*. Consequences on the formulation and distribution of food in function of rearing seasons. Styli 2003. Thirty years of shrimp farming in New Caledonia. Proceedings of the Symposium, Noumea-Kone, 2–6 June 2003, vol. 38, pp. 167–172. Actes Colloq. IFREMER.
- Clifford, H.C., 1994. Semi-intensive sensation. A case study in marine shrimp pond management. *World Aquac.* 25, 6–13.

- Cohen, J., 1988. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. Lawrence Erlbaum associates, Inc., Hillsdale, NJ.
- FAO, 2006. State of World Aquaculture 2006. FAO Fisheries Technical paper no. 500. FAO, Rome. 134 pp.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., Buchner, A., 2007. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods 39, 175–191.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. Summer syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture 253, 105–113.
- Hayes, J.P., 1987. The positive approach to negative results in toxicology studies. Ecotoxicol. Environ. Safety. 14, 73–77.
- Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castaneda, J., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), The New Wave. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001, 21–25 January 2001, Orlando. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 104–152.
- Lemonnier, H., Herbland, A., Salery, L., Soulard, B., 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow-out ponds in New Caledonia: zootechnical and environmental factors. Aquaculture 261, 1039–1047.
- Lombardi, J.V., De Almeida Marques, H.L., Toledo Lima Pereira, R., Saleé Barreto, O.J., De Paula, E.J., 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. Aquaculture 258, 412–415.
- Myers, J.L., Well, A.D., 2003. Research Design and Statistical Analysis, 2nd ed. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., Mahwah, NJ.
- Nunes, A.J.P., Suresh, A.V., 2001. Feeding tray technique improves shrimp feed management in Brazil. Advocate 4, 39–42.
- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V., Goddard, S., 1997. Food consumption and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. Aquaculture 149, 121–136.
- Paquotte, P., Chim, L., Martin, J.L.M., Lemos, E., Stern, M., Tosta, G., 1998. Intensive culture of shrimp *Penaeus vannamei* in floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects. Aquaculture 164, 151–166.
- Perez-Rostro, C.I., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., 1999. Maternal and cage effects on genetic parameter estimation for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Aquac. Eng. 30, 681–693.
- Rubright, J.S., Harell, J.L., Holcomb, H.W., Parker, J.C., 1981. Responses of planktonic and benthic communities to fertilizer and feed applications in shrimp mariculture ponds. J. World Maricult. Soc. 12, 281–299.
- Shigueno, K., 1975. Shrimp Culture in Japan. Published by Association for International technical promotion. Tokyo, Japan. 253 pp.
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., Ward, L., 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 207, 125–136.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York. 887 pp.
- Tacon, A.G.J., 1996. Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming systems. Aquac. Nutr. 2 (3), 165–174.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W.J., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture 203, 263–278.
- Wabete, N., 2005. Etude écophysiological du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetteculture en Nouvelle Calédonie. Thèse présentée à l'Université Bordeaux 1. Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
- Yusufzai, S.I., Sing, H., 2005. Rearing of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) post larvae in floating cages at different stocking densities. Aquac. Res. 36, 405–408.
- Zarain-Herzberg, M., Campa-Córdova, O.I., Cavalli, R.O., 2006. Biological viability of producing white shrimp *Litopenaeus vannamei* in seawater floating cages. Aquaculture 259, 283–289.



**Article 7: Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia**<sup>1</sup>

Mathieu Castex<sup>a</sup>, Liet Chim<sup>a\*</sup>, Dominique Pham<sup>a</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>, Jean Louis Nicolas<sup>b</sup>, Philippe Schmidely<sup>c</sup>, Catherine Mariojoul<sup>c</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Lagons, Ecosystèmes et Aquaculture Durable (LEAD/NC), Campus de l'IRD, Anse Vata, BP 2059, 98848 Nouméa Cedex, New-Caledonia.

<sup>b</sup> IFREMER, Laboratoire de Physiologie des invertébrés, DRV/A, centre de Brest, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup> AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, Cedex 5, France

Keywords: Probiotic, *Pedicoccus acidilactici*, *Litopenaeus stylirostris*, Floating cages, Vibriosis

\* Corresponding author. Tel : +687 35 25 76 ; fax : +687 35 11 77

E-mail address: [Liet.Chim@ifremer.fr](mailto:Liet.Chim@ifremer.fr)

---

<sup>1</sup> Aquaculture 275 (2008) 182-193





# Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia

Mathieu Castex<sup>a,c</sup>, Liet Chim<sup>a,\*</sup>, Dominique Pham<sup>a</sup>, Pierrette Lemaire<sup>a</sup>, Nelly Wabete<sup>a</sup>,  
Jean-Louis Nicolas<sup>b</sup>, Philippe Schmidely<sup>c</sup>, Catherine Mariojouis<sup>c</sup>

<sup>a</sup> IFREMER, Département Aquaculture en Nouvelle-Calédonie, BP 2059, 98846 Nouméa cedex, New Caledonia

<sup>b</sup> IFREMER, Laboratoire de physiologie des invertébrés, DRV/A, centre de Brest, 29280 Plouzané, France

<sup>c</sup> AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, Cedex 5, France

Received 24 July 2007; received in revised form 13 January 2008; accepted 14 January 2008

## Abstract

We studied the effects of a lactic acid bacterium, *Pediococcus acidilactici* (strain MA 18/5M, CNCM), as a dietary probiotic on growth performance and some nutritional and microbiological aspects of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Experimental shrimp culture was carried out over 10 weeks, using floating cages of 14 m<sup>2</sup> each set in earthen ponds, in a New Caledonia farm affected by “Summer syndrome”, a septicemic vibriosis caused by *Vibrio nigripulchritudo*. The experiment design testing probiotic-coated pellets against control was replicated in two earthen ponds. High mortalities, characteristic of Summer syndrome, were observed during the first 2 weeks of the trial. The probiotic improved production in the treated cages from both ponds with increases in the survival rate (7% and 15% respectively) and final biomass (8% and 12% respectively). No differences were recorded among treatments on growth performances, but significant lower food conversion ratios were obtained with probiotic treatment. After 5 weeks of rearing, the Hepatosomatic Index and the adjusted dry weight of the digestive gland were significantly increased by 10% and by 9% respectively in shrimps treated with probiotic. In the meantime, the specific activities of  $\alpha$  amylase and trypsin in the digestive gland showed a significant effect of the probiotic treatment with respective increases by 35% and 55%. The rise in total trypsin activity following morning feeding was also enhanced by the probiotic treatment ( $P < 0.001$ ).

The highest concentration of probiotic (between  $10^4$ – $10^5$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh gut) in the shrimp gut was obtained 2 h after feeding. The concentration remained high for 4 h after feeding before decreasing until the next meal. Total bacterial counts on Marine agar and TCBS in the gut were significantly lowered by the probiotic treatment over the 10 weeks of the experiment. Additionally, during the first 2 weeks, prevalence and load of *V. nigripulchritudo* strains in haemolymph was lower in animals fed with the probiotic diet.

This study demonstrated, under pond conditions, that feeding shrimp with live terrestrial lactic acid bacteria can be an effective treatment for improving shrimp culture affected by vibriosis.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Probiotic; *Pediococcus acidilactici*; *Litopenaeus stylirostris*; Floating cages; Vibriosis

## 1. Introduction

Vibriosis is currently one of the main diseases affecting shrimp culture and outbreaks lead to dramatic crop failures in the major shrimp-producing countries (Lightner, 1988; Lin, 1995). In New Caledonia, shrimp farming faces two diseases of

bacterial origin: “Syndrome 93” (Le Groumellec et al., 1996) and “Summer syndrome” (Goarant et al., 2006). In recent years, the biological control of diseases by environmental friendly methods such as probiotics has become an important subject of investigation in aquaculture research. Several reviews (Garriques and Arevalo, 1995; Gatesoupe, 1999; Vershuere et al., 2000; Gomez-Gil et al., 2001; Irianto and Austin, 2002; Vine et al., 2006) detail the various developments made in the use of probiotics in aquatic cultured species, including shrimp. The use

\* Corresponding author. Tel.: +687 35 25 74; fax: +687 35 11 77.

E-mail address: [Liet.Chim@ifremer.fr](mailto:Liet.Chim@ifremer.fr) (L. Chim).

of probiotic bacteria is now commonly accepted in shrimp farming. The main probiotic bacteria documented in shrimp grow-out are *Bacillus* spp. strains (Moriarty, 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006) such as *Bacillus subtilis* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003; Moriarty, 1999) or Gram-negative bacteria strains (Garriques and Arevalo, 1995; Alavandi et al., 2004; Vijayan et al., 2006). However, since current regulations make it mandatory to obtain authorisation for zootechnical application of living micro-organisms, the use of already identified bacteria will tend to be increasingly extended to aquaculture (Gatesoupe, 2002b). Because lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly applied probiotics in terrestrial animal nutrition, their use as probiotics has been proposed for aquatic species (Gatesoupe, 1991, 2002a; Ringø and Gatesoupe, 1998). LABs potentially have several probiotic properties: they may stimulate the growth of preferred micro-organisms, outcompete harmful bacteria, and reinforce the organism's natural defence mechanisms (Vandenbergh, 1993; Villamil et al., 2002). Studies showing such effects on aquatic species have generally assessed strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Carnobacterium divergens* sp., *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* (Strøm and Ringø, 1993; Gatesoupe, 1991, 2002a; Gatesoupe et al., 1989; Gildberg et al., 1995, 1997; Nikoskelainen et al., 2001; Planas et al., 2004). However, only a few reports about their use on shrimp have been documented (Uma et al., 1999; Venkat et al., 2004).

The available information on the probiotic *P. acidilactici* MA 18/5M (Bactocell<sup>®</sup>) provides convincing safety back-up (“Generally Recognized as Safe” (GRAS) and “Qualified Presumption of Safety” (QPS) status) and evidence of its effectiveness since its use has been authorized by the European committee for several terrestrial species (E1712 for broiler chicken and E1712 for fattening pig). In addition, first evaluations of its effects on the species *Litopenaeus stylirostris* reared in New Caledonia have shown promising results as regards the growth and survival of shrimps affected by Syndrome 93 (Chim et al., 2005; Castex et al., 2006).

The present study aimed to assess the probiotic strain *P. acidilactici* MA 18/5M on a pilot scale, using floating cages as an original tool for experimental purposes. Our investigation

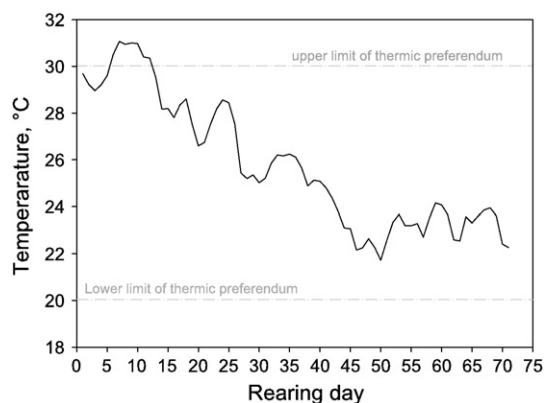


Fig. 1. Mean water temperature in ponds A and B of the farm during the period of the experiment. Upper and lower limits of *L. stylirostris* thermal preferendum are indicated in grey medium dash lines.

Table 1

Experimental design

|        | Rearing period<br>(number of days) | Number of<br>cages | Treatment | Initial number of<br>shrimps per cage |
|--------|------------------------------------|--------------------|-----------|---------------------------------------|
| Pond A | 28/03/06 to 08/06/06<br>(73 days)  | 5                  | Control   | 400                                   |
|        |                                    | 5                  | Probiotic | 400                                   |
| Pond B | 29/03/06 to 07/06/06<br>(72 days)  | 5                  | Control   | 400                                   |
|        |                                    | 5                  | Probiotic | 400                                   |

focused on zootechnical results, nutritional status and gut microflora of the blue shrimp, *L. stylirostris*, reared in 20 floating cages set up in two earthen ponds of a farm currently affected by Summer syndrome.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Farm site, study period and temperatures

The study took place in two earthen ponds of 10 ha each (pond A and pond B) of a semi-intensive farm located in Bourake, New Caledonia (21°55' South; 165°57' East) that has been affected since 1997 by Summer syndrome. The experiment was conducted over 10 weeks in 2006, from April to June, the usual period for outbreaks of this disease.

The water temperature during the trial (Fig. 1) was within the thermal preferendum of *L. stylirostris* (Wabete, 2005) except for the first 2 weeks when the temperature rose above the upper limit of this preferendum.

### 2.2. Shrimp rearing

#### 2.2.1. Rearing in ponds

The animals used in this experiment were first pregrown in the two ponds: on February 21, ponds A and B of the farm were stocked at a density of respectively 17 and 18 post larvae (PL) m<sup>-2</sup> with animals that originated from the same hatchery batch. The animals were reared according to standard semi-intensive farming practices in New Caledonia until they reached the desired size.

Shrimps were fed twice a day with a commercial formulated feed. The feeding rate was adjusted by the technical staff of the farm according to the weekly estimated body weight, survival rate and amount of remaining feed in the feeding tray 2 h after feeding.

#### 2.2.2. Seeding and rearing in floating cages

Twenty floating cages of 14 m<sup>2</sup> of net surface or 4 m<sup>3</sup> each were used as described in a previous study (Chim et al., 2007). Thirty-six and thirty-seven days after seeding the ponds, the cages were stocked with pregrown shrimps taken from the same pond they were reared in. Each cage was stocked with 400 animals for a final density of 29 animals m<sup>-2</sup>. This density has been determined based on the sampling scheme in order to not affect the final survival rates (Bouyer, 1997). The density in cage was higher than the one in the respective ponds, but it was of little importance since the aim of this study was not to compare the both rearing systems (pond vs. cage). The average initial bodyweight of shrimps was 3.4 g ± 0.57 (SD) and 2.7 g ± 0.68 (SD) in pond A and pond B respectively.

Shrimps were fed only in the feeding tray, twice a day, at 8:00 am and 3:00 pm. The feeding rate was adjusted every day for each cage according to the feed remaining 2 h after the meals.

### 2.3. Experimental design

The experiment was conducted as a randomized design, based on previous study (Chim et al., 2007), with two treatments: standard diet vs. diet supplemented with probiotic. Each group consists of 5 replicates: 5 control cages (C-Cages) and 5 cages receiving probiotic diet (P-Cages). This protocol was duplicated in the two earthen ponds giving a total of 20 floating cages. Table 1 summarizes the experimental protocol. Experimental units considered and tested effects are detailed in the following statistical analysis section.

Feeding with probiotic started on 5 April (day 0), 1 week after stocking the cages with the shrimps. Previously, all the shrimps had received the same standard commercial diet.

Shrimps were sampled weekly in one C-Cage and one P-Cage, alternatively in ponds A and B, and each cage was sampled only once in the course of the trial. Each sample consisted of 2 groups of 15 shrimps: the first group was sampled 1 h before the meal (7:00 am) and the second sampled 2 h after the meal (10:00 am). The animals were captured with a cast net spread along the surface of the cage and dropped down. The samples were immediately placed in sterile containers of 5 shrimps each, packed on ice in a cooler and brought to the laboratory within 30 min. On the 65th day of the trial (9th week) we carried out a follow-up by sampling shrimps every 2 h (from 7:00 am to 9:00 pm) in one cage for each treatment.

As described below, the animals sampled in the cages were used for several analyses. In addition, 30 shrimps were sampled weekly in each pond, outside the cages, only for microbiological analysis in the haemolymph.

#### 2.4. Shrimp feed and probiotic

Shrimps in the cages were fed with the same commercial diet used in the ponds, purchased from the company Moulins de Saint Vincent (MSV), New Caledonia.

The commercial probiotic preparation tested was Bactocell® PA 10 (Lallemand Animal Nutrition S.A., Blagnac, France) formulated with live *P. acidilactici* MA 18/5M (Institut Pasteur, Paris, France). The concentration used in this experiment had been previously determined as effective (Castex et al., 2006). For the treated group, 1 g kg<sup>-1</sup> of the probiotic (powder form) was top-coated on the pellets using 3% of fish oil as a carrier, giving a final concentration of  $9.7 \pm 1.1 \times 10^6$  CFU of *P. acidilactici* per gram of diet. The probiotic concentration in the feed was systematically checked after processing by counting *P. acidilactici* strains on MRS plates using serial dilution. The control diet was also top-coated with 3% fish oil and, prior to use, checked for possible contamination by the probiotic strain.

Feeds were then stored in 5-litre boxes at 20 °C until use. The storage period never exceeded 15 days, in order to guarantee the same amount of probiotic in the feed throughout the experiment, since we determined that the *P. acidilactici* concentration in shrimp feed started to decrease significantly after this period (unpublished data).

#### 2.5. Zootechnical parameters

The final survival rates were calculated for each cage by counting the number of remaining shrimps and comparing it with the initial stock, excluding the 30 sampled animals per cage. It is statistically agreed that sampling less than 10% of the initial population does not affect the survival rate (Bouyer, 1997).

The individual body weights were recorded for 10% of the population at stocking and for all the remaining shrimps at the end of the experiment. Weekly sampled shrimps were also individually weighed. At the end, final body weight, final biomass and feed conversion ratio (FCR) were determined.

#### 2.6. Moulting stage

The moulting stage (Drach and Tchernifovtzeff, 1967) of sampled animals was recorded. Only shrimps in the intermoult stage (C-D0) were considered for nutritional status and microbiological analysis.

#### 2.7. Nutritional status

##### 2.7.1. Hepatosomatic index and hepatopancreas adjusted dry weight

The hepatopancreas is recognized as the main storage organ in shrimp (Luvizotto-Santos et al., 2003), and is therefore commonly accepted as a good indicator of nutritional status. Sampled shrimps were dissected and the hepatopancreas was carefully removed and weighed (wet weight). Hepatosomatic index (HSI) was calculated individually as the ratio between wet hepatopancreas weight and total wet body weight. Samples were then frozen at -80 °C prior to the freeze-dry step (Alpha 1–2/LD apparatus, Fisher Bioblock Scientific, 48 h at -55 °C) and then weighed to obtain dry weight. The hepatopancreas dry weight, adjusted for its

wet weight, was compared between treatments, and used as a complementary index to evaluate the nutritional status of the shrimps. The linear relationship between fresh weight and dry weight of the digestive gland ( $R^2=90.7$ , in this case) allows hepatopancreas dry weight to be compared with the fresh weight as covariable, using a covariance analysis (Sokal and Rohlf, 1995).

##### 2.7.2. Protein and enzyme assays

During the one-day follow-up in the cages, the sampled hepatopancreas were frozen at once in liquid nitrogen and stored at -80 °C until enzyme assays were conducted. Only shrimps in intermoult (stage C-D0) were used, since digestive enzyme activity changes with the moulting stage (Fernández et al., 1997). The hepatopancreas, previously weighed, were homogenized individually in Tris buffer 10 mM, pH 7.4 with an ultraturax and centrifuged 10 min at 4000 rpm at 4 °C. Proteins were estimated according to Lowry et al. (1951) with BSA standard. Trypsin was assayed by its amidase activity using benzoyl-Arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) as substrate following the method 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<sup>-1</sup> trypsin (SIGMA) was used. BAPNA units were evaluated in accordance with Haard et al. (1996). One activity unit was expressed as 1 μmol of *p*-nitroanilide released min<sup>-1</sup>. The α Amylase activity was assayed by Bernfeld's (1955) method, using 1% soluble starch (SIGMA) as substrate in phosphate buffer 20 mM, pH 7, and reacting it 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 enzyme activities were expressed both as total (U/mg of organ) and specific (U/mg of protein) activities.

#### 2.8. Microbiological analysis

##### 2.8.1. Haemolymph

Haemolymph was collected, after rinsing the shrimps with sterile seawater, from the ventral-sinus cavity (venous blood) using a 1 ml sterile needle and syringe. Samples were then plated on Marine Agar (w/v) 2% glycerol added (MAG), on which *V. nigripulchritudo* colonies produce a grey to black pigment (Baumann and Schubert, 1984). Plates were incubated for 72 h to 96 h at 29 °C. The number of putative *V. nigripulchritudo* colonies was counted and recorded for each animal. Then the prevalence was determined as the percentage of animals presenting at least one *V. nigripulchritudo* colony, and the load as the number of colonies per infected animal. Prevalence and load were determined weekly for shrimps sampled in P-cages and C-cages, and in the ponds.

##### 2.8.2. Gut microbiota

Shrimps were dissected using sterilized surgical scissors to remove mid- and hind-gut (intestine) (Dall, 1967). To avoid possible external contamination while removing organs, the surface of each shrimp was previously cleaned using 70% ethanol (Sakata, 1989). The hind-gut of 5 shrimps were pooled, placed in a sterile tube containing 1 ml of sterile artificial seawater and weighed before homogenization.

Bacteriological determination was made using serial dilution in sterile saline solution followed by plating triplicates on Marine agar (MA), Thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) and De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS), in order to determine respectively total cultivable heterotrophic marine bacteria, *Vibrio* sp. and *P. acidilactici*. After incubation (24 h and 48 h at 29 °C for MA and TCBS plates, and 48 h to 37 °C for MRS plates) colonies were counted and recorded. All the results are presented as colony-forming units per gram of fresh digestive tract (CFU g<sup>-1</sup>).

#### 2.9. Statistical analysis

The data were statistically analysed by the statistical package Stat View (SAS Inc., Cary, NC, USA). Zootechnical results were analysed as follows: each cage was considered as the experimental unit and pond and treatment effects were considered as fixed effects. The normality and variance's homogeneity of all data were systematically checked before applying one-way analysis of variance or two-way analysis of variance for the FCR and the daily growth rates (pond, treatment and their interaction). The interaction pond\*treatment was



systematically checked and was never significant. Survival rates were assessed using the Chi-square test to determine significant differences between treatments and by analysis of variance after arcsine transformation of percentages survival.

For other analysis (microbiological and nutritional), shrimps or pool of shrimps were considered as experimental unit. ANOVA were used to compare treatment effect. The bacterial counts were log transformed before running ANOVA. When ANOVA was not applicable, comparisons were made using the Kruskal–Wallis test.

Pairwise comparisons were also achieved using Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD). Statistically significant differences among experimental groups were reported at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Zootechnical results

The average zootechnical results for shrimps reared in the ponds were similar to the farm's previous crops. According to the farmer's results, the estimated survival rates were 31% for both ponds.

Table 2 summarizes the zootechnical results of shrimps reared in cages for both ponds. The mean survival rates were respectively  $31.1 \pm 3.4\%$  and  $37.8 \pm 4.2\%$  for C-cages in pond A and in pond B ( $P < 0.001$ ). The values obtained for the growth rate and FCR in cages fit into the results range of farms in New Caledonia (GFA, 2006). Mortality records (number of dead shrimp discovered daily) according to rearing time were almost similar for shrimps reared in cages and directly in ponds with a rise 1 week after the beginning of the trial (Fig. 6C).

Probiotic treatment significantly improves the survival rate ( $P < 0.001$ ) and the food conversion ratio ( $P < 0.05$ ) (Table 2). In P-cages, survival was higher by 7% and 15% and FCR lower by 8% and 9% compared to C-cages in pond A and pond B respectively.

No significant effect of the probiotic treatment on GR ( $P > 0.05$ ), final weight of the animals ( $P > 0.05$ ) or final biomass ( $P = 0.09$ ) was shown in either pond.

#### 3.2. Influence of probiotic on nutritional status

Fig. 2 shows the evolution of the HSI before the morning meal for both treatments ( $P > 0.05$ ) and of the body weight of the shrimps

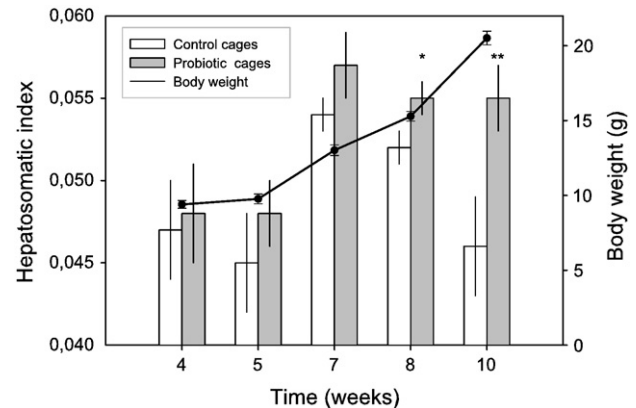


Fig. 2. Hepatosomatic index, 1 h before morning meal, and body weight of sampled shrimps at 4, 5, 7, 8 and 10 weeks of rearing in floating cages for control and probiotic treatments. Error bars indicate SD ( $n = 15$ ). (\*) indicate significant differences between treatment calculated with pairwise LSD Fisher test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).

irrespective of the treatment. From week 5 to the end of the trial, HSI was significantly higher for shrimp receiving the probiotic treatment ( $P < 0.05$ ). These differences were observed when the mean value of body weight was higher than 10 g.

In addition, compared to C-cages, the adjusted dry weight of the digestive gland was significantly higher ( $P < 0.05$ ) for animals from P-Cages from weeks 8 to the end of the trial (Table 3).

Fig. 3 presents total and specific activities for trypsin (Fig. 3A and B) and  $\alpha$  amylase (Fig. 3C and D) in the digestive gland. In control shrimps, total and specific activities of both enzymes showed the same trend over the day: at 10:00 am (2 h after the first meal) significant rises in trypsin activities (total  $P < 0.001$ ; specific  $P < 0.05$ ) and amylase activities (total  $P < 0.001$ ; specific  $P < 0.05$ ) were recorded. At 2:00 pm the activities returned to the initial levels, except for total amylase activity which stayed high until 9:00 pm (Fig. 3C). No significant evolution of either enzyme activity was recorded after the second meal (3:00 pm).

In shrimps fed with probiotic, the activities of both enzymes varied the same way as for control animals, with an increase in enzymes activities following the first meal. However, differences were observed for treated animals compared to control: (i) at 7:00 am (before the first meal), total and specific activities of trypsin and  $\alpha$  amylase were significantly higher, (ii) at 10:00 am, the rise of total trypsin activity was also found to be significantly higher (Fig. 3A), (iii) the activity levels of both enzymes returned down to initial values at 12:00 pm instead of 2:00 pm as recorded for control animals, (iv) the specific trypsin activity recorded from 2:00 pm to 9:00 pm remained at levels significantly higher ( $P < 0.05$ ) in probiotic group (Fig. 3B).

Table 2

Zootechnical results and significant differences in C-Cages (control) and P-Cages (probiotic treatment) in ponds A and B. ( $\pm$  standard deviation,  $n = 5$ ; n.s., not significant; n.a., not applicable)

|                                        | Pond A                        |                               | Pond B                        |                               | Significance for probiotic effect |
|----------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
|                                        | C-cages                       | P-cages                       | C-cages                       | P-cages                       |                                   |
| Survival (%)                           | 31.08 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup> | 33.31 $\pm$ 3.37 <sup>a</sup> | 37.84 $\pm$ 4.22 <sup>b</sup> | 43.65 $\pm$ 2.78 <sup>c</sup> | $P < 0.001^*$                     |
| GR (g day <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | 0.23 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 0.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>  | 0.20 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>  | 0.19 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>  | n.s. <sup>§</sup>                 |
| Final body weight (g)                  | 19.91 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup> | 20.12 $\pm$ 2.63 <sup>a</sup> | 17.22 $\pm$ 3.68 <sup>b</sup> | 16.83 $\pm$ 3.59 <sup>b</sup> | n.s. <sup>§</sup>                 |
| Final Biomass (g)                      | 2291 $\pm$ 346 <sup>a</sup>   | 2484 $\pm$ 271 <sup>ab</sup>  | 2408 $\pm$ 299 <sup>ab</sup>  | 2706 $\pm$ 210 <sup>b</sup>   | $P = 0.09^{\text{f}}$             |
| FCR <sup>b</sup>                       | 2.29 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>  | 2.09 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup> | 2.28 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  | 2.05 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>  | $P < 0.05^{\text{§}}$             |

\*Different superscript letters within the same line indicate significant differences among treatments with pairwise LSD Fisher test.

<sup>a</sup>Khi square test.

<sup>§</sup>One way ANOVA (treatment).

<sup>§</sup>Two-way ANOVA (Pond, Probiotic treatment).

<sup>a</sup> Daily Growth Rate.

<sup>b</sup> Food Conversion Ratio.

Table 3

Adjusted hepatopancreas dry weight (least mean square) of animals reared in floating cages after 5, 7, 8 and 10 weeks, and significant differences among C-Cages (control) and P-Cages (probiotic treatment) ( $\pm$  standard error,  $n = 30$ ; n.s., not significant)

| Week | Hepatopancreas dry weight (mg) |                  | Differences among treatments* |
|------|--------------------------------|------------------|-------------------------------|
|      | C-Cages                        | P-Cages          |                               |
| 5    | 288.8 $\pm$ 11.1               | 270.1 $\pm$ 9.0  | n.s                           |
| 7    | 265.1 $\pm$ 8.2                | 268.1 $\pm$ 8.4  | n.s                           |
| 8    | 244.9 $\pm$ 8.3                | 269.4 $\pm$ 8.9  | $P < 0.05$                    |
| 10   | 284.1 $\pm$ 15.4               | 328.4 $\pm$ 18.4 | $P < 0.05$                    |

\*ANOVA with hepatopancreas wet weight use as covariable.

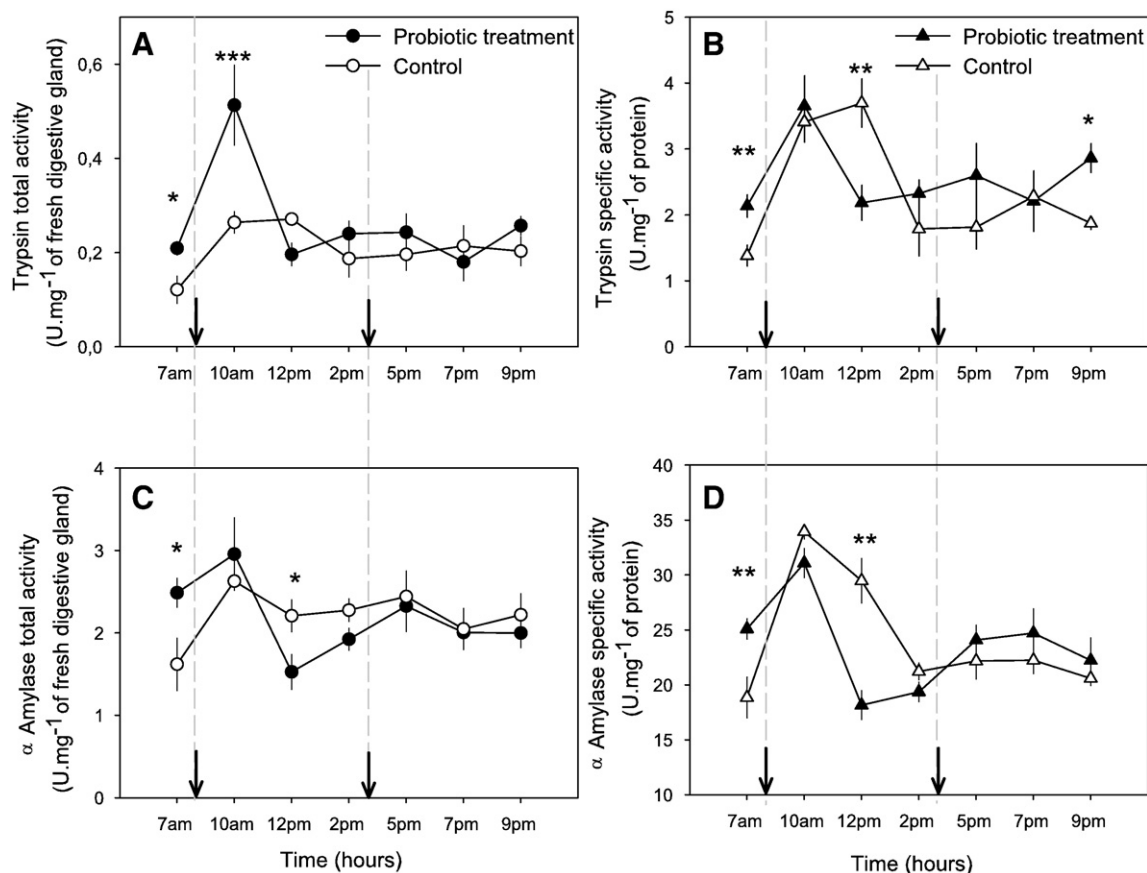


Fig. 3. The effect of probiotic treatment on daily (from 7:00 am to 9:00 pm) trypsin and  $\alpha$  amylase activities in the digestive gland of *L. stylirostris* during the 65th day of rearing in floating cages. A and B. Total ( $\text{U mg}^{-1}$  digestive gland) and specific ( $\text{U mg}^{-1}$  protein) trypsin activities. C and D. Total ( $\text{U mg}^{-1}$  digestive gland) and specific ( $\text{U mg}^{-1}$  protein)  $\alpha$  amylase activity. Error bars indicate SD ( $n=5$ ). Superscript stars within the same sample time indicate significant differences among treatments with pairwise LSD Fisher ( $*P<0.05$ ;  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ). Dark arrows indicate feeding time.

### 3.3. Microbial flora in digestive tract of *L. stylirostris*

#### 3.3.1. Probiotic recovered

*P. acidilactici* was never detected in animals from C-Cages. In P-Cages, there were significant differences for the concentration of probiotic recorded in the intestine before and after the meal (Table 4). Before morning feeding, *P. acidilactici* was usually not detected, but it was found successively on three occasions (weeks 5, 7 and 8) with

concentrations close to  $10^2 \text{ CFU g}^{-1}$ . Two hours after feeding, the concentrations of *P. acidilactici* reached mean value of  $1.3 \times 10^4 \text{ CFU g}^{-1}$  throughout the experiment (Table 4). Subsequently the probiotic concentration in the shrimp gut decreased to reach values around  $2.3 \times 10^3$  6 h post feeding (Table 5).

#### 3.3.2. Bacterial numeration

For control groups, the results of the weekly sampling did not show any significant effect of the meal on total heterotrophic bacteria and

Table 4

Average bacterial counts of *P. acidilactici* in shrimp digestive tract pre- and post-feeding over 10 weeks of rearing in P-cages ( $\pm$ standard deviation,  $n=3$ ; n.d., not detected; n.s. not significant; n.a. not applicable)

| Rearing week  | <i>P. acidilactici</i> counts in shrimp gut ( $\text{CFU g}^{-1}$ ) |                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|               | Before morning feeding                                              | 2 h post feeding        |
| 1             | n.d.                                                                | $24,267.8 \pm 13,612.5$ |
| 2             | n.d.                                                                | $57,24.1 \pm 1410.6$    |
| 3             | n.d.                                                                | $144,38.0 \pm 3988.5$   |
| 4             | n.d.                                                                | $57,44.3 \pm 1004.0$    |
| 5             | $284.9 \pm 28.7$                                                    | $21,925.9 \pm 11,485.4$ |
| 7             | $134.5 \pm 77.8$                                                    | $14,940.2 \pm 1342.4$   |
| 8             | $26.8 \pm 1.1$                                                      | $7268.4 \pm 351.1$      |
| 10            | n.d.                                                                | $6123.8 \pm 321.0$      |
| Significance* | n.a                                                                 | n.s                     |

\*Kruskal–Wallis test.

Table 5

Average bacterial counts of *P. acidilactici* (on MRS) in digestive tract of shrimp sampled over 14 h during the 65th day of rearing in P-cages (9th week) ( $\pm$ standard error,  $n=3$ ; "–" non achieved)

| Day time | Feeding | <i>P. acidilactici</i> counts in shrimp gut ( $\text{CFU g}^{-1}$ ) |
|----------|---------|---------------------------------------------------------------------|
| 7:00 am  |         | 0                                                                   |
| 8:00 am  | X       | –                                                                   |
| 10:00 am |         | $2.06 \pm 0.17 \cdot 10^{4a}$                                       |
| 12:00 pm |         | $6.95 \pm 0.39 \cdot 10^{3b}$                                       |
| 3:00 pm  | X       | $2.64 \pm 1.46 \cdot 10^{3c}$                                       |
| 5:00 pm  |         | $3.85 \pm 0.05 \cdot 10^{4d}$                                       |
| 7:00 pm  |         | $3.41 \pm 0.11 \cdot 10^{4ad}$                                      |
| 9:00 pm  |         | $2.02 \pm 1.00 \cdot 10^{3c}$                                       |

\*Different superscript letters indicate significant differences among day times (Fisher's Protected Least Significant Difference).

Table 6

Average bacterial counts (on Marine agar and TCBS) in shrimp guts sampled weekly before and after feeding in C-Cages ( $\pm$  standard error,  $n=21$ ; n.s. non significant)

| Bacterial count                            | Before feeding              | After feeding                | Differences among the week* |
|--------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Total heterotrophic bacteria (Marine agar) | $8.4 \pm 1.4 \cdot 10^{9a}$ | $7.5 \pm 1.3 \cdot 10^{9a}$  | n.s                         |
| Vibrio (TCBS)                              | $7.5 \pm 1.6 \cdot 10^{6a}$ | $1.1 \pm 0.37 \cdot 10^{7a}$ | $P < 0.05$                  |

Different superscript letters within the same line indicate significant differences among treatments with pairwise LSD Fisher test ( $P < 0.05$ ).

\*ANOVA ( $\text{Log}(\text{CFU g}^{-1})$ ).

Vibrios counts in the digestive tract (Table 6). Total bacterial counts slightly increased during the first weeks of the trial to reach high and stable levels thereafter (Fig. 4), while Vibrios, according to TCBS counts, increased dramatically at week 5 ( $P < 0.001$ ) to remain high until the end.

The results of sampling over 1 day are shown in Fig. 5: heterotrophic bacteria and Vibrios counts increased exponentially from 7:00 am to 7:00 pm and decrease afterwards. These increases were statistically significant, with values rising from  $2.8 \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$  to  $5.8 \times 10^8 \text{ CFU g}^{-1}$  for the total heterotrophic bacteria, and from  $1.5 \times 10^6$  to  $1.8 \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$  for Vibrios. On the same day, recorded temperatures increased from  $21.5^\circ\text{C}$  at 7:00 am to  $25^\circ\text{C}$  at 4:00 pm.

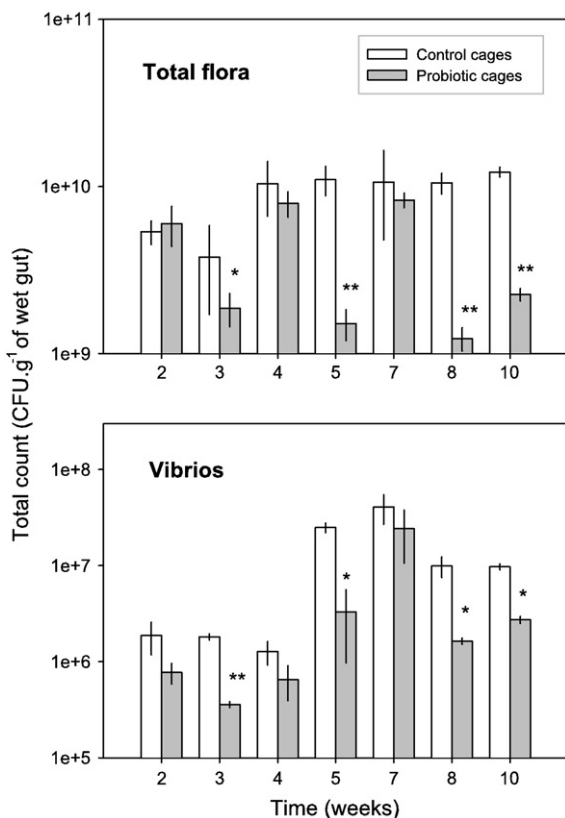


Fig. 4. Bacterial counts (on Marine Agar and TCBS) in shrimp guts sampled after feeding from C-Cages and P-Cages over the 10 weeks of the experiment. Error bars indicate SE ( $n=3$ ). Superscript stars within the same sample time indicate significant differences among treatments with pairwise LSD Fisher ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ).

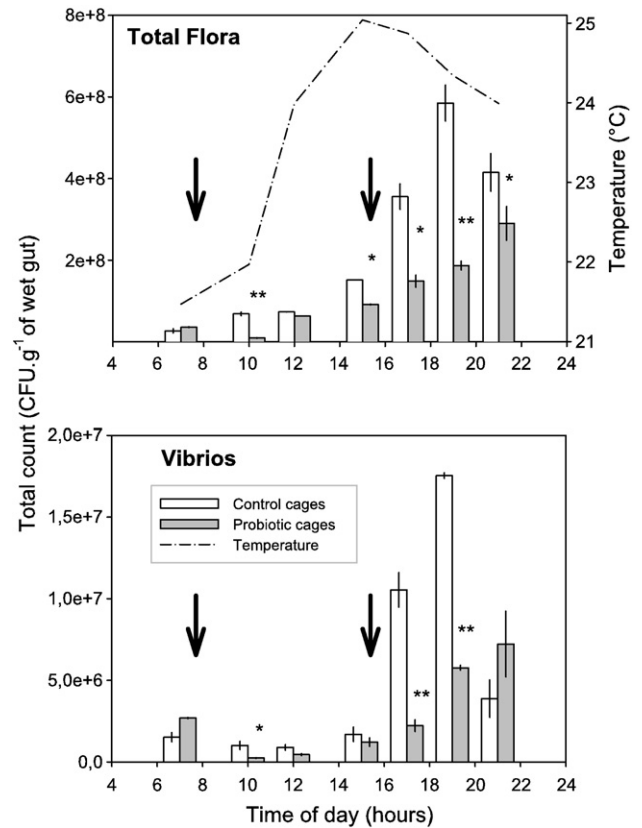


Fig. 5. Bacterial counts (on Marine agar and TCBS) in shrimp guts from C-Cages and P-Cages during the 65th day of rearing in floating cages (from 7:00 am to 9:00 pm). Error bars indicate SE ( $n=3$ ). Superscript stars within the same sample time indicate significant differences among treatments with pairwise LSD Fisher ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ). Dark dash line represents the water temperature over the same period. Dark arrows indicate feeding time.

For the probiotic group, total heterotrophic bacteria and Vibrios counts in the digestive tract followed the same trends as the control group (Figs. 4 and 5). However, the following differences were recorded: (i) weekly sampling showed that 2 h post feeding, bacterial counts were significantly lowered by the probiotic treatment on both MA ( $P < 0.05$ ) and TCBS ( $P < 0.001$ ) media (Fig. 4) even if those variations are not uniform over the weeks, (ii) the follow-up over a day showed that the same decrease occurred after each meal supplemented with the probiotic and that this effect lasted longer after the second meal (Fig. 5).

Counts on MAG did not allow the relevant number of *V. nigripulchritudo* colonies in the gut to be detected at any time at the dilutions achieved (data not shown). Only very few colonies were detected on one plate of the first dilution ( $10^{-1}$ ) at week one and week four, without noticing any differences between treatments.

### 3.4. *V. nigripulchritudo* counts in the haemolymph

Haemocultures on MAG for *V. nigripulchritudo* prevalence and load, in shrimps raised in ponds, are shown in Fig. 6. Prevalence levels at the beginning of the trial were high and decreased throughout the trial to reach nul value at week 10 (Fig. 6A). This decrease was found to be highly correlated with water temperature (Table 7). *V. nigripulchritudo* load rose dramatically on week 2 and then decreased to less than 20 CFU per infected shrimp during the following weeks (Fig. 6C). The same trends in prevalence and load were observed for shrimps reared in C-cages (Fig. 6B and D). Compared to C-cages, P-Cages had lower

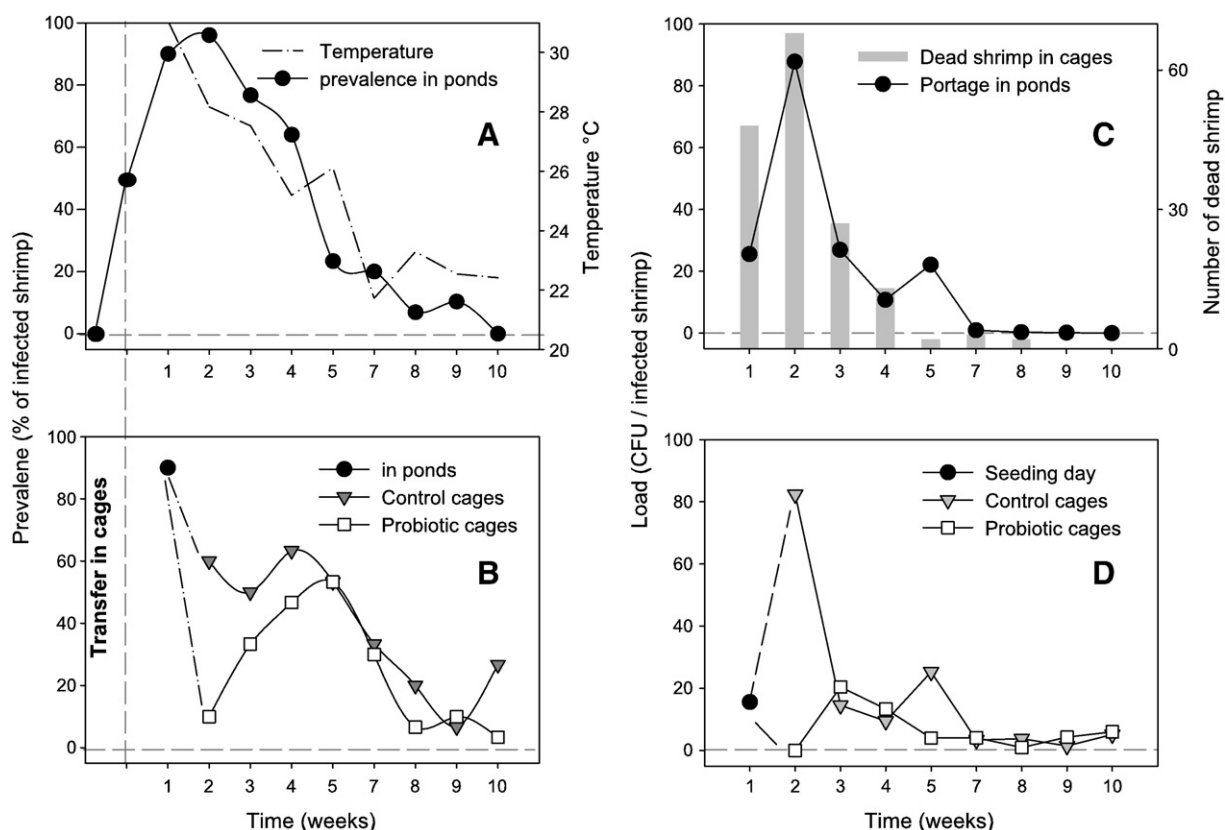


Fig. 6. *V. nigripulchritudo* prevalence (percentage of infected animals) and load (number of *V. nigripulchritudo* colonies per infected animal) of shrimps reared respectively in pond, C-Cages and P-Cages ( $n=30$ ). A. *V. nigripulchritudo* prevalence of shrimps sampled in pond over the period of the experiment. Dark dash line represents the water temperature over the same period. B. *V. nigripulchritudo* prevalence of shrimps from C-Cages and P-Cages. C. *V. nigripulchritudo* load of shrimps sampled in pond and weekly number of dead shrimps recorded in cages. D. *V. nigripulchritudo* load of shrimps from C-Cages and P-Cages. Dark arrows indicate feeding time.

prevalence at weeks 2, 3, 4, 8 and 10 and lower load at weeks 2 and 5 (Fig. 6B and D). For probiotic treated animals, the maximum prevalence values, from week 2 of the trial to the end, did not exceed 53%. Moreover, the prevalence pattern for shrimp fed probiotic was not correlated with the fall in temperature as observed for control (Fig. 6B and Table 7). Finally the *V. nigripulchritudo* load in P-cage did not increase in week 2 of the trial, as was observed for animals raised in C-cages.

## 4. Discussion

### 4.1. Rearing in floating cages

Our previous work (Chim et al., 2007) showed that floating cages were a good tool for shrimp culture study in earthen

ponds, allowing the shrimps to be fully reared up to the commercial size, with zootechnical results lying within the standard ranges for the New Caledonian farms (GFA, 2006).

In the present study, the main advantage was to allow shrimps to be reared in the same environment, so that the differences between treatments could be unambiguously attributable to the probiotic effect. Another advantage was the enhanced statistical power of the results through the increased number of replicates in comparison with studies carried out directly in earthen ponds (Chim et al., 2007).

### 4.2. Probiotic effects on survival, FCR and nutritional status

The low survival rates obtained in ponds A and B were in accordance with previous results from the farm, and can be related to Summer Syndrome (Goarant et al., 2006). This septicaemic vibriosis was first identified in 1997 in the present shrimp farm, and since the final survival rates obtained have varied between 22% and 38%, depending on the year (Lemonnier et al., 2006). Results of rearing in our floating cage conditions without using probiotics led to similar results, with survival rates of  $31.1 \pm 1.5$  and  $37.8 \pm 19$  for ponds A and B respectively. The increase in the mortality curve, during the first 2 weeks after stocking the cages, closely parallels the load curve of *V. nigripulchritudo* in the haemolymph of the animals over the same period. Prevalence also seems to be strongly linked to the mortality curve, with a slight

Table 7

Correlation coefficients and correlation tests (Z-test) between the water temperatures in pond and the prevalence and load of *V. nigripulchritudo* in the haemolymph of shrimp reared respectively in Ponds, C-Cages and P-Cages

| Rearing condition | Correlation with water temperature    |               |                                 |            |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------|------------|
|                   | <i>V. nigripulchritudo</i> Prevalence |               | <i>V. nigripulchritudo</i> Load |            |
|                   | Correlation (r)                       | Z-test        | Correlation (r)                 | Z-test     |
| Ponds             | 0.87                                  | * $P < 0.001$ | 0.496                           | $P = 0.18$ |
| C-cages           | 0.86                                  | * $P < 0.001$ | 0.52                            | $P = 0.16$ |
| P-cages           | 0.342                                 | $P = 0.425$   | 0.315                           | $P = 0.46$ |



shift as previously reported by Goarant et al. (2006). These authors suggested the existence of a latency phase for this disease. We also found a correlation ( $r=0.86$ ,  $P<0.001$ ) between the prevalence of *V. nigripulchritudo* and the fall in temperature for control animals in cages and animals raised directly in the pond. This result may suggest the importance of water temperature for this disease. We observed that treatment with probiotic *P. acidilactici* significantly improved the survival of the shrimp in pond A (+7%) and pond B (+15%). Interestingly, our data also revealed a reduction of *V. nigripulchritudo* prevalence and load levels in shrimps fed with the probiotic within the first 2 weeks of the trial, during which these variables reached maximum values for control animals. Explanation of this result may involve the direct or indirect effects of the probiotic strain on the associated microbiota of the shrimp by specific or unspecific mechanisms, which in turn may limit the effect of some pathogenic strains.

The probiotic treatment also improved final biomass ( $P=0.09$ ) and significantly reduced the food conversion ratio. *In situ* studies of LABs application on aquatic species, and more specifically on shrimp species, are scarce and arguments to explain relative effects are sometimes missing. Venkat et al. (2004) showed that strains of *L. acidophilus* and *L. sporogenes* significantly improved growth of *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. However, survival was not affected in this case. The same authors observed inhibitory effects of the LABs tested against the gram negative flora present in the fresh water of the shrimp's gut. The positive effect of probiotic in FCR has also been already pointed out in *Penaeus indicus* larvae fed with *L. plantarum* (Uma et al., 1999).

The hepatopancreas is considered to be the main storage organ in shrimp, mainly accumulating lipids (Luvizotto-Santos et al., 2003). In the course of our study we showed in sub-adult animals (mean weight >10 g), which have different feeding habits and diet than juveniles (Nunes and Parsons, 2000), that the hepatosomatic index (HSI) values were significantly higher for treated shrimps. The same trend was observed for the adjusted hepatopancreas dry weight, which was then significantly ( $P<0.05$ ) higher in shrimps receiving probiotic the last 2 weeks of rearing. Adjusted dry weight is a very simple and specific indicator of the state of hepatic reserves (unpublished data). Variations of hepatopancreas adjusted dry weight are probably due to variations in the lipid content (Sánchez-Paz et al., 2007). Several hypotheses could explain the effect of probiotic on hepatic reserves. The storage status at a given moment is an equilibrium resulting from the deposition of nutriment in the hepatopancreas and its utilization for the energetic needs and biosynthesis of the animal. In this case, the probiotic could have modulated either the storage process of nutriment, or their use, or both simultaneously. Additional results on trypsin and  $\alpha$  amylase activity in the digestive gland showed that enzyme activity significantly increased after the first meal (8:00 am). However, this phenomenon was not obvious after the second feeding (3:00 pm). Previous studies on *Penaeus kerathurus* and *Palaemon squilla* showed that both amylase and trypsin activity is influenced by feeding and by the circadian rhythm (Van Wormhoudt et al., 1972; Trelu and Ceccaldi, 1977). For instance, Van Wormhoudt et al. (1972) showed successive significant rises in trypsin and amylase activity at both 10:00 am

and 10:00 pm independently of feeding. Thus the rise of enzyme activity following the first meal in the present study could result from a combination of factors, such as the circadian rhythm, no feeding during the night (15 h), and re-feeding. The absence of the same rise in enzyme activity following the second meal could be explained either by the interaction of the effects of food intake or by the nictemeral cycle and by the short daily intermeal period (7 h). Administration of the probiotic modified enzymatic activity in the digestive gland at both levels: (i) higher basic total and specific activity of  $\alpha$  amylase and trypsin (animal unfed for 16 h), (ii) shorter postprandial peaks of enzyme activity following the morning meal while enhancing the trypsin total activity peak. Those results are difficult to compare with those of the literature, which provides very little information on the kinetics of digestive enzyme activity following feeding under pond rearing conditions. On this topic, we can cite the work of Muhlia-Almazán and García-Carreño (2002), who followed digestive enzyme activity in *Penaeus vannamei* on the basis of moulting stages and the duration of starvation. In the present study, we did not determine whether the modulation of enzymatic activity observed in the probiotic group is due to a direct effect of the strain or to an indirect effect. Because gram-positive bacteria secrete a wide range of exoenzymes, it is difficult to distinguish activity due to the enzymes synthesized by the shrimp from activity due to the enzymes synthesized by the bacteria. However, total higher trypsin and amylase activity of treated shrimps before feeding was measured while the concentration of *P. acidilactici* was putatively close to 0. This suggests that the exogenous enzymes produced by the probiotic account for only a small proportion of total enzyme activity. It is possible that the probiotic may in some way stimulate endogenous enzymes produced by the shrimp. Ingestion of food is considered by Head and Conover (1983) to be the main factor affecting the enzyme secretion in copepods. Therefore those results may also be a consequence of feed intake stimulation by the probiotic treatment. This hypothesis remains to be investigated more fully.

We assume that probiotic treatment might have led to enhanced digestion and increased absorption of food, which in turn contributed to improving hepatic storage in the digestive gland and the feed conversion ratio (FCR) observed in *L. stylirostris*.

#### 4.3. Probiotic pattern in the digestive tract

It is commonly accepted that lactic bacteria are naturally present in the digestive tract of fish (Ringø and Gatesoupe, 1998). However, most studies on the intestinal microflora of shrimps, and more generally of crustaceans, do not report the presence of lactic bacteria in their digestive tract (Dempsey et al., 1989; Harris, 1993; Oxley and Shipton, 2002; Venkat et al., 2004). Cai et al. (1999) report the presence of three bacterial species, *Lactococcus garvieae*, *P. acidilactici*, and *Enterococcus faecium*, in the gut of the freshwater shrimp *M. rosenbergii*. In our study, bacterial counts on MRS (specific medium to LAB) in the gut of control animals do not indicate the natural presence of lactic acid bacteria at any time during the trial. Only the probiotic strain (grey–white to yellowish–white

colonies, round shaped and with a smooth surface with diameters between 1 and 2.5 mm) has been recorded as lactic acid bacteria in the intestine of shrimp receiving dietary probiotic. This suggests that the strain survives and withstands the conditions of the shrimp digestive tract, which is an important feature, since it is accepted that probiotic activity is often linked to the supposed viability of the strain inside the digestive tract of the host (Panigrahi et al., 2005). Previous results in tanks with clear water showed that *P. acidilactici* administered at a concentration close to  $10^7$  CFU g<sup>-1</sup> of feed was retrieved around  $5 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh gut (unpublished data). In the present study an average concentration of  $1.3 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> was recorded 2 h after administration. The lower concentrations retrieved in the present study could be explained by the occurrence of natural food available in cages that contributes to the whole diet of the shrimp and dilutes the probiotic provided only through the pelleted feed. Basically, the probiotic concentrations in the gut recorded in our study are in the same range as those reported for other probiotics used for shrimp applications. Rengpipat et al. (2000) showed on *Penaeus monodon*, that the concentration of probiotic *Bacillus* S11 reached mean levels of  $10^6$  CFU g<sup>-1</sup> of gut when administered doses in food ranged between  $1.39 \times 10^{10}$  and  $4.69 \times 10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup>. More recently, Ziaei-Nejad et al. (2006) showed that commercial *Bacillus* reached concentrations ranging between  $10^4$  and  $10^5$  CFU g<sup>-1</sup> of digestive tract when it was applied in water with  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>. Regarding lactic acid bacteria, few examples of their use as probiotics on shrimps are available and the count of the probiotic strain in the digestive tract of the animals has not been systematically reported (Venkat et al., 2004). In our study, *P. acidilactici* concentration 2 h after the meal reaches the same level throughout the trial. The probiotic concentration remains above  $5 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup> 4 h after feeding, and then decreases gradually to reach values around  $2 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup> after 6 h. These trends indicate that the probiotic strain must be transient, and may not adhere to the intestinal mucous of *L. stylirostris*. This result confirms studies carried out on fish reviewed by Ringø and Gatesoupe (1998), who reported that lactic acid bacteria managed via food generally do not colonize the intestinal mucous and are lost during the intestinal transit within a few days after their ingestion. This has been confirmed by Aubin et al. (2005), who showed that the same strain of *P. acidilactici* was only retrieved at low concentration  $<10^2$  CFU g<sup>-1</sup> in the intestine of rainbow trout unfed for 20 h. The authors stated then that the probiotic was transient without noticeable mucosal association. The short intestine and fast transit time of shrimp (Dall, 1967) could explain the faster disappearance of the probiotic in comparison with fish. Moreover, the intestinal transit time of shrimp, and particularly of *L. stylirostris*, is affected by water temperature, since the time between two meals (refractory period) is inversely proportional to temperature (Chim et al., 2004). This could explain why *P. acidilactici* colonies were recorded up to 16 h after the last feeding, when pond water temperatures fell to the low threshold (21 °C) of *L. stylirostris* thermal preferendum (Wabete, 2005). The results suggest a relationship between the presence of the probiotic in the digestive tract and the speed of intestinal transit,

which is itself highly correlated with temperature. In practice, this suggests that it may be necessary to provide probiotic more frequently to compensate for its elimination. The two feed distributions made during this study did not allow the probiotic at concentration around  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> of gut to be retrieved more than 40% of the time. Under these conditions, the probiotic action could probably be effective only at the times of its optimal concentration in the digestive tract. Further investigation in this area would be necessary to specify the programme for administering the probiotic.

#### 4.4. Probiotic effect on the associated microflora of *L. stylirostris* digestive tract

The results show that the probiotic had an effect on the microflora of the digestive tract of the shrimp. The effect was one of lower bacteria concentrations, including vibrio, in the gut of treated animals, and was most pronounced when the highest level of *P. acidilactici* were recorded in the gut (2 to 4 h after feeding). This significant limitation of bacterial load after feeding probiotic, compared to the control, indicates that the strain tested might have *in vivo* bacteriostatic properties. These results are consistent with previous data (unpublished) showing an *in vitro* antagonistic effect of *P. acidilactici* strain MA 18/5 M against several Gram-positive and Gram-negative bacteria, and notably towards some *Vibrios* strains pathogenic to *L. stylirostris*.

Results of the follow-up over 1 day of rearing confirmed this significant limitation of bacterial load after delivering the probiotic and showed variation of this effect over the time period. Modulation of the probiotic effect during the day may be related to the different levels of *P. acidilactici* recorded in the gut over the same period. Such kinetics would need to be confirmed and the study probably extended to 24 h, as well as being repeated with additional experiments, notably on the putative effects of probiotic feeding frequency.

Antimicrobial effects of bacteria generally come from the following substances released alone or in association: antibiotics, bacteriocins, siderophores, lysozymes, proteases, hydrogen peroxide or organic acids degrading the pH of the medium, and ammonia and diacetyl. It is commonly accepted that the primary effects exerted by LABs are reduction of pH and removal of carbohydrates (Daeshel, 1989). It is also accepted that the probiotic effects of many LABs forms are based on the production of diverse antibacterial metabolites (bacteriocins in particular). Various authors have stated that among extracellular substances produced by probiotics, bacteriocins would be the most important (Gildberg et al., 1997). Bacteriocins (pediocin) are excreted by some strains of *P. acidilactici* (Bhunja et al., 1990; Cintas et al., 1995; Mora et al., 2002). It can therefore be hypothesised that the *Pediococcus* strain studied here may produce such substances which modify the intestinal microflora of shrimp. However, this hypothesis has to be tempered, since it is generally agreed that bacteriocins are peptides which are effective mostly against bacteria closely related to the producing strain (Gatesoupe, 1999; Guerra and Pastrana, 2003). The *P. acidilactici* strain tested was also selected for its capacity to

produce large quantities of lactic acid. Lactic and acetic acids produced by lactic fermentations of LAB are able to acidify bacteria interior leading to the expulsion of H<sup>+</sup> ions from the cells and causing uncoupling of the Na<sup>+</sup>–K<sup>+</sup> (ATPase) pump (Goncalves et al., 1997). Ringø and Gatesoupe (1998) stated that bacteria capable of producing lactic acid fermentation may inhibit the proliferation of putrefactive microbes in the digestive tract of aquatic organisms and thus contribute to improved health status of the host. Further, the release of lactic acid resulting in modifications of the gut's pH may be another factor accounting for the effect observed in its microflora. Vázquez et al. (2005) showed, for instance, that lactic and acetic acids are responsible for the effects of nine potential lactic acid bacteria probiotics tested for their inhibitory effects on four common pathogens of turbot.

At this stage of knowledge, both production of bacteriocins and/or acidification by lactic acid seem to be consistent hypotheses, and could explain the action of the probiotic on the gut microflora. However, as emphasized by Aubin et al. (2005), the probiotic effect of this strain could be either direct, because of bacteriostatic properties, or indirect, by stimulating favourable intestinal microbiota. Furthermore, the specific action mechanisms of probiotic activity, both in terrestrial animals and for human applications, are probably of a very diverse nature and the effects are unlikely to arise from independent mechanisms. A combination of several action mechanisms is probably involved, which makes their *in vivo* demonstration harder (Gatesoupe, 1999). In the present instance, we cannot say at this stage whether the observed action is specifically directed towards any bacterial communities and correlated with the effects observed on *V. nigripulchritudo* records in the haemolymph. The use of methods targeting specific bacterial strains (i.e. pathogenic strains) or giving a representative overview of the bacterial community in the gut and haemolymph (TTGE or DGGE) may be helpful in progressing further in this investigation.

## 5. Conclusion

Under our experimental conditions, the probiotic *P. acidilactici* acted favourably on the survival and FCR of the shrimp *L. stylirostris*. Although we are not able to clarify the mechanisms involved, the probiotic treatment brought about significant antagonistic activity toward the microflora of the digestive tract and led to the reduction of prevalence and load of *V. nigripulchritudo*, which has been involved in serious outbreaks in New Caledonia. In nutritional terms, sub-adult *L. stylirostris* (>10 g) presented higher hepatic storage when fed with the probiotic, and basic digestive enzyme activities were enhanced by the treatment. We assume that this result may be related to better feed utilisation by animals given the probiotic diet.

Under our feeding conditions, the probiotic concentration in the gut was found to be highly variable, suggesting a possible improvement and optimization of the treatment by adjusting probiotic feeding frequency. Indeed, we assume that it should be possible to strengthen the probiotic effect by increasing the residence time of the strain in the digestive tract.

Our future research on this topic will need to pay attention to optimizing probiotic dose and frequency for its application during various shrimp grow-out seasons. We shall also look at the qualitative effects of the probiotic strain on the bacterial community associated with the shrimp intestine and investigate more precisely the nutritional and potential physiological impact of such treatment.

## Acknowledgments

This project is a part of a global and specific research programme set up by IFREMER to provide an overall explanation for vibriosis affecting shrimp farming in New Caledonia. The work was supported by research grants from the Northern and Southern Provinces of New Caledonia. The authors would like to thank Lallemand Animal Nutrition S.A. (Blagnac, France) for its collaboration by partly supporting the study and providing the probiotic. The authors would also like to thank all IFREMER zootechnical staff of the Département Aquacole en Calédonie who kindly helped us with the design, construction and set up of the cages and the final harvesting. We also extend our thanks to the owners of the private farm and their employees for their assistance throughout the experiment.

## References

- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 17, 115–120.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquac. Res. 36, 758–767.
- Baumann, P., Schubert, R.H.W., 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae. In: Holt, J.G., Krieg, N.R. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, pp. 516–550.
- Bernfeld, P., 1955. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 149–158.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Belden, E.L., 1990. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 69, 211–215.
- Bouyer, J., 1997. Méthodes statistiques: Médecine — Biologie. ESTEM, Editions INSERM, Paris 351 pp.
- Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y., 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. J. Gen. Appl. Microbiol. 45, 177–184.
- Castex, M., Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P., Usache, V., 2006. Feeding evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) in sub adult shrimp *Litopenaeus stylirostris*: microbial, nutritional and zootechnical aspects. Book of Abstract WAS Annual Meeting, 9–13 May 2006. Florence, Italia.
- Chim, L., Galois, R., Martin, J.L.M., Lemaire, P., Wabete, N., Massabuau, J.C., Cuzon, G., 2004. Influence de la température sur quelques aspects de la nutrition de *Litopenaeus stylirostris*. Conséquences sur la formulation et la distribution de l'aliment en fonction de la saison d'élevage. Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie (Ed. Ifremer), Actes Colloq. pp. 99–105.
- Chim, L., Maisonneuve, V., Lemaire, P., Wabete, N., Usache, V., 2005. Dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* MA 18/5 (Bactocell®) study to a juvenile marine shrimp *Litopenaeus stylirostris* reared in tanks and in pond. book of abstracts. WAS annual meeting. 9–13 May 2005. Bali, Indonesia.



- Chim, L., Castex, M., Wabete, N., Lemaire, P., Pham, D., Brun, P., 2007. Development of an original tool for shrimp culture studies using floating cages in earthen pond. First trial carried out to evaluate lactic acid probiotic (Bactocell®) in shrimp *Litopenaeus stylirostris* reared in commercial farm subject to vibriosis. Book of Abstract Asian Pacific Aquaculture, 5–8 August 2007. Hanoi, Vietnam.
- Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H., 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2643–2648.
- Daeshel, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43, 164–167.
- Dall, W., 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* (Racsek & Dall). Aust. J. Zool. 15, 699–714.
- Dempsey, A.C., Kitting, C.L., Rosson, R.A., 1989. Bacterial variability among individual *penaeid* shrimp digestive tracts. Crustaceana 56 (3), 267–278.
- 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 2 chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95, 271–278.
- Fernández, I., Oliva, M., Carrillo, O., Van Wormhoudt, A., 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol. 118A, 1267–1271.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P., Haard, N.F., 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. J. Agric. Food. Chem. 42, 1456–1461.
- Garriques, D., Arevalo, G., 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), Swimming through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La, pp. 53–59.
- Gatesoupe, F.J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 96, 335–342.
- Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. Aquat. Living Resour. 7, 277–282.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165.
- Gatesoupe, F.J., 2002a. Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. Aquaculture 21, 347–360.
- Gatesoupe, F.J., 2002b. Les probiotiques pour poissons: “sur mesure” ou “prêt-à-traiter”? In: 7ème Bordeaux Aquaculture, 4ème Journée de la Nutrition, 20 September 2002, pp. 13–16.
- Gatesoupe, F.J., Arakawa, T., Watanabe, T., 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 83, 39–44.
- GFA, 2006. Rapport d'activité: missions et analyses de l'observatoire technique et de l'observatoire économique. Groupement des fermes aquacoles de Nouvelle-Calédonie, Noumea. 72 pp.
- Gildberg, A., Johansen, A., Bogwald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138, 23–34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E., 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. Hydrobiologia 352, 279–285.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. Aquaculture 253, 105–113.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J., 2001. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191, 259–270.
- Goncalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M.R.B., Larrondo, M.J.T., 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 346–350.
- Guerra, N.P., Pastrana, L., 2003. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. Lett. Appl. Microbiol. 37, 51–55.
- Haard, N.F., Dimes, L.E., Arndt, R.E., Dong, F.M., 1996. Estimation of protein digestibility IV. digestive proteinases from the pyloric caeca of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing Soybean Meal. Comp. Biochem. Physiol. 115B, 533–540.
- Harris, J.M., 1993. The Presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microb Ecol. 25, 195–231.
- Head, E.J.H., Conover, R.J., 1983. Induction of digestive enzymes in *Calanus hyperboreus*. Mar. Biol. Lett. 4, 219–231.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Review probiotics in aquaculture. J. Fish Dis. 25, 633.
- 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. SICCPSS Book of Abstracts. SEAFDEC, Iloilo City, Philippines, p. 46.
- Lemonnier, H., Herbland, A., Salery, L., Soulard, B., 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow-out ponds in New Caledonia: zootechnical and environmental factors. Aquaculture 261, 1039–1047.
- Lightner, D.V., 1988. Vibrio disease of penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 42–47.
- Lin, C.K., 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), Swimming through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La, pp. 13–23.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Pereira-Branco, Z., Bianchini, A., Maia-Nery, L.E., 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea–Grapsidae). J. Exp. Zool. 295A, 200–205.
- Mora, D., Parini, C., Fortina, M.G., Manachini, P.L., 2002. Multilocus hybridization typing in *Pediococcus acidilactici* strains. Curr. Microbiol. 44, 77–80.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351–358.
- Moriarty, D.J.W., 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, pp. 237–243.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., 2002. Influence of moulting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 133B, 383–394.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., 2001. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198, 229–236.
- Nunes, A.J.P., Parsons, G.J., 2000. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. Aquaculture 187, 133–151.
- Oxley, A., Shipton, W., 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. J. Appl. Microbiol. 93, 214–223.
- Panigrahi, A., Kirona, V., Puangkaewa, J., Kobayashib, T., Satoha, S., Sugitac, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 243, 241–254.
- Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Perez-Lomba, R., Gonzalez, M.P., Murado, M., 2004. Enhancement of rotifer *Brachionus plicatilis* growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture 240, 313–329.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatirativorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. Aquaculture 191, 271–288.

- Ringø, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177–203.
- Sakata, T., 1989. Microflora of healthy animals. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), *Methods for the Biological Examination of Fish and Shellfish*. Ellis Horwood Ltd., West Sussex, England, pp. 141–163.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Marine Biol.* 340, 184–193.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York 887 pp.
- Strøm, E., Ringø, E., 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In: Walther, B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. University of Bergen, Bergen, Norway, pp. 226–228.
- Trellu, J., Ceccaldi, H.J., 1977. Circadian variations of some enzymatic activities in *Palaemon squilla* Linné (1758) (Crustacea, Decapoda). *J. Interdiscip. Cycle Res.* 8, 357–359.
- Uma, A., Abraham, T.J., Sundararaj, V., 1999. Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. *Indian J. Fish.* 46, 367–373.
- Vandenbergh, P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 221–238.
- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, J.H., Le Gal, Y., 1972. Activité des protéases et amylases chez *Penaeus kerathurus*: existence d'un rythme circadian. *C. R. Acad. Sc. Paris, D* 274, 1208–1211.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 83–87.
- Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245, 149–161.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 501–507.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.
- Vijayan, K.K., Bright Singh, I.S., Jayaprakash, N.S., Alavandi, S.V., Somnath Pai, S., Preetha, R., Rajan, J.J.S., Santiago, T.C., 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture* 251, 192–200.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B., 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1318–1323.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 404–427.
- Wabete, N., 2005. Etude écophysiologique du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette peneide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetticulture en Nouvelle Calédonie. Thèse présentée à l'Université Bordeaux 1. Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516–524.

## CONCLUSION

En conclusion, l'utilisation des cages flottantes s'est révélée particulièrement adaptée à l'évaluation des effets du probiotique sur une ferme commerciale. En effet, les animaux en cages ont montré des performances zootechniques équivalentes à leurs congénères en bassins (Article 6). De plus, les cages flottantes présentent un certains nombre d'avantages, comme une réduction des coûts et du poids logistique des expérimentations, ainsi qu'une amélioration de la puissance et de la sensibilité statistiques des études, au travers de la possibilité de multiplier les répliques.

Grâce à cet outil, nous avons pu valider certains des résultats obtenus en laboratoire. En effet, nous avons mesuré une amélioration de l'indice de conversion de l'aliment (FCR), une stimulation de l'activité des enzymes digestives, un effet antagoniste du probiotique sur la flore intestinale, une réduction des niveaux d'infection par *V. nigripulchritudo* et une amélioration de la survie des animaux. Ainsi ces résultats viennent renforcer les hypothèses émises suite à nos travaux en laboratoire. Cependant cette expérience n'a pas mis en évidence d'effet du probiotique sur la croissance. Cela peut s'expliquer par différentes hypothèses. L'une d'elles concerne l'aliment naturel du bassin consommé par la crevette aux dépens de l'aliment granulé. Une baisse de l'ingéré en granulé diminuera d'autant la dose de probiotique reçue par la crevette, ce qui ne permettrait pas de détecter l'effet sur la croissance. Associé à cette hypothèse, nous savons également que la productivité naturelle apporte des facteurs de croissance (Moss et al., 1992, 1995) qui auraient pu masquer les bénéfices apportés par le probiotique. Enfin, une autre hypothèse probable est que les biomasses supérieures dans les cages probiotique, conséquence d'une meilleure survie, ont pu limiter la croissance. Il est en effet bien connu que la vitesse de croissance des crevettes est fonction de la biomasse, elle-même liée à la densité d'élevage (Paquotte et al., 1998).

Quoiqu'il en soit à ce stade, cette première étude en conditions réelles d'élevage, bien qu'elle nécessiterait d'être reproduite dans d'autres fermes, permet d'envisager l'utilisation de l'additif alimentaire Bactocell® à l'échelle commerciale.

Enfin, notons qu'au delà de son utilisation au sein de notre station expérimentale, la méthode cage flottante est aujourd'hui transférée à différents acteurs de la filière calédonienne: le

groupement des fermes aquacoles (GFA), des fermes commerciales et des fabricants d'aliments. Ces utilisateurs l'utilisent aujourd'hui en routine pour tester des aliments et des additifs alimentaires.

**QUATRIÈME PARTIE :**

**CONCLUSION GÉNÉRALE**





## **QUATRIÈME PARTIE :**

### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

|            |                                                                                                                                 |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I</b>   | <b>Synthèse des principaux résultats .....</b>                                                                                  | <b>349</b> |
| <b>II</b>  | <b>Avancées relatives à la compréhension des mécanismes d'action de <i>P. acidilactici</i> chez <i>L. stylirostris</i>.....</b> | <b>354</b> |
| <b>III</b> | <b>Contribution au développement de l'additif Bactocell® en crevetticulture .....</b>                                           | <b>356</b> |
| <b>IV</b>  | <b>Perspectives .....</b>                                                                                                       | <b>358</b> |



Notre travail est une étude des effets de *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* au stade sub-adulte, étude réalisée dans le contexte de la crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. *P. acidilactici* (Bactocell®) est un probiotique couramment utilisé dans des élevages de porcs et volailles, et qui a fait l'objet d'applications récentes en pisciculture. De plus, des travaux préliminaires sur les crevettes pénéides avaient montré que cette bactérie améliorait la croissance et la résistance des animaux exposés à divers stress en élevage, et motivé la poursuite d'investigations sur le sujet. Ainsi, la problématique de recherche au cours de cette thèse était double :

- confirmer les bénéfices zootechniques apportés par le probiotique, et en particulier savoir si son usage pouvait améliorer la résistance de *L. stylirostris* aux vibrioses, plus particulièrement celles affectant les élevages de Nouvelle-Calédonie,
- Investiguer les mécanismes mis en jeu, et proposer un premier scénario explicatif des effets de *P. acidilactici* chez la crevette.

Nous avons choisi de replacer la problématique étudiée dans un modèle d'interactions entre trois compartiments : la crevette, sa microflore intestinale et le probiotique.

Dans un premier temps nous avons examiné le compartiment probiotique en lien avec la microflore intestinale. Nous avons ainsi pu définir les modalités d'administration de *P. acidilactici* (Article 1), ensuite appliquées à l'ensemble des expérimentations en laboratoire. Et nous avons montré l'existence d'interactions entre ces deux compartiments.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'étude de la physiologie des crevettes traitées au probiotique. Les essais préliminaires réalisés au Vietnam, en Chine ou encore en Inde (Lallemand, communication personnelle) s'étaient limités à mesurer la croissance et dans certains cas le FCR. Nous avons donc cherché à caractériser le rôle du probiotique sur la croissance et à investiguer ses effets sur la nutrition de *L. stylirostris* (Article 3), en utilisant une méthode originale (croissance-ration, Brett *et al.*, 1979) que nous avons adaptée à la crevette (Article 2).

Puis nous avons étudié l'effet du probiotique sur la réponse physiologique de l'animal en conditions pathologiques à l'aide du modèle d'infection par *V. nigripulchritudo*, agent pathogène avéré en Nouvelle-Calédonie (Articles 4 & 5). Cette réponse a été évaluée par la

mesure du niveau d'infection, et par la détermination de l'état des défenses antioxydantes et du niveau de stress oxydant.

Enfin, un essai sur une ferme commerciale affectée par cette vibriose a été mis en œuvre afin de valider les améliorations des performances zootechniques, ainsi que l'action du probiotique sur la crevette, et sa microflore intestinale (Article 7), en conditions réelles d'élevage.

## **I Synthèse des principaux résultats**

L'hypothèse centrale de notre travail reposait sur l'existence de relations entre l'animal, sa microflore intestinale et le probiotique (Sonnenburg *et al.*, 2006), l'effet probiotique étant fonction des rapports d'équilibre s'établissant entre ces trois compartiments (Figure 4.1.). Le modèle des trois compartiments que nous avançons ici illustre bien la proposition de Gatesoupe (1999) suggérant que l'effet des probiotiques ferait appel à plusieurs mécanismes agissant plus ou moins en interaction.

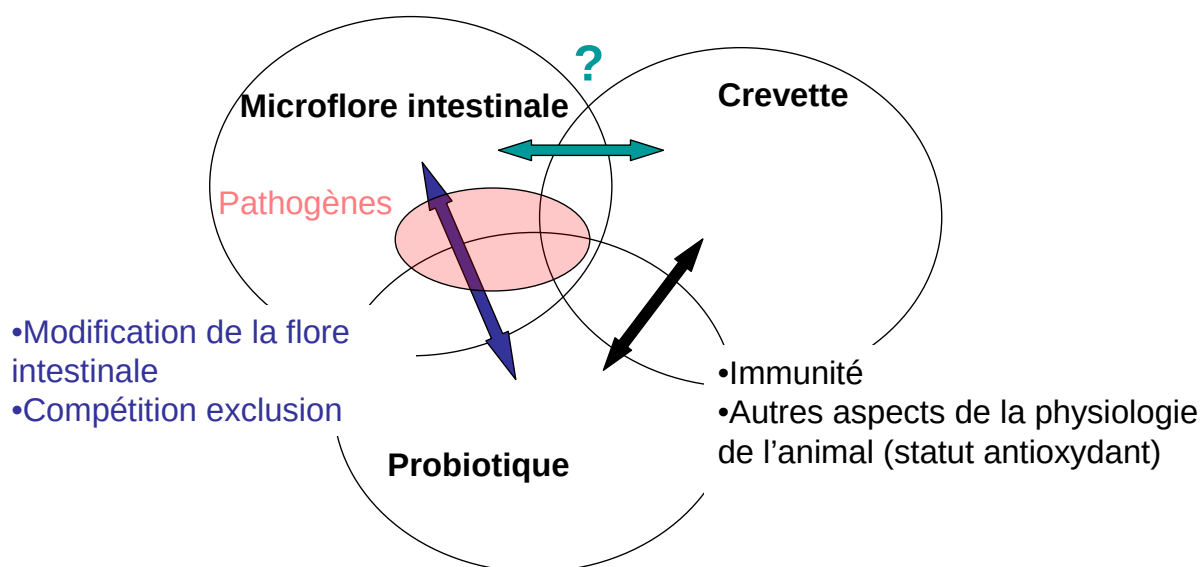


**Figure 4.1.** Schéma simplifié des interactions entre la crevette *L. stylirostris*, sa microflore intestinale et le probiotique *P. acidilactici* MA18/5M.

### ***Le probiotique***

Le travail sur le compartiment probiotique a permis de montrer que *P. acidilactici* résiste en partie au processus de digestion, et est principalement associée au bol alimentaire en transit dans le tractus digestif. Sur cet aspect, Aubin *et al.* (2005a) ont abouti à des conclusions

similaires à partir de leurs travaux réalisés chez la truite arc en ciel. Nous n'avons pas quantifié la survie du probiotique mais ce dernier a été systématiquement retrouvé, après un repas, à des concentrations comprises entre  $10^4$  et  $10^5$  CFU.g<sup>-1</sup> de tube digestif. De plus, si aucun nouvel apport de probiotique n'est effectué, cette concentration diminue progressivement pour atteindre des niveaux inférieurs au seuil de détection dans les 48 heures après le dernier repas. Ce phénomène est plus ou moins rapide selon la température et la disponibilité en nourriture, deux facteurs qui influencent la vitesse du transit intestinal. De plus, nous avons démontré qu'une élévation de la fréquence d'apport du probiotique permet de stabiliser sa concentration, autour de  $10^4$  CFU.g<sup>-1</sup>, dans l'intestin. Par ailleurs, une dose de  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup> dans l'aliment a conduit systématiquement à de meilleurs résultats en terme de croissance et de survie des crevettes (Article 1).

L'ensemble de ces résultats permet donc de proposer, pour des élevages situés dans la zone de confort thermique de *L. stylirostris* (entre 22 et 28°C, Wabete *et al.*, 2008), **un protocole d'administration correspondant à un apport quotidien de quatre repas d'un aliment dosé à  $10^7$  CFU.g<sup>-1</sup>**, afin de maintenir en continu un niveau optimal de probiotique dans l'animal. Pour affiner ce protocole, il serait nécessaire de connaître l'influence des paramètres d'élevage (température, disponibilité de l'aliment naturel...) sur la dose de probiotique à apporter à l'animal. Par ailleurs, la question de la survie du probiotique après ingestion reste entière, et mérite également une étude approfondie, tant au plan scientifique que pour l'amélioration des traitements qu'elle permettrait.

### ***La microflore intestinale***

L'analyse quantitative de la flore intestinale a permis de montrer clairement un effet d'antagonisme de *P. acidilactici* vis-à-vis de la flore intestinale. En effet, les animaux traités avaient des concentrations bactériennes intestinales (flore totale et vibrionacée) inférieures (autour de 1 Log(CFU)) à celles mesurées chez des animaux non traités, et ce, quelles que soient les conditions d'élevage testées : en bacs (Article 1) et en bassins (Article 7). Une telle réduction de la flore intestinale - notamment des vibrios - due à l'administration de probiotiques, a été rapportée dans plusieurs études (Aubin *et al.*, 2005a ; Rengpipat *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2008), invoquant un effet d'antagonisme des probiontes. L'explication de ce phénomène a donné lieu à plusieurs hypothèses présentées en détail (cf première partie) et discutées précédemment dans le cas de nos résultats (troisième partie, chapitre 1). De plus,

nous avons mis en évidence à plusieurs reprises une réduction des niveaux d'infection par *V. nigripulchritudo* chez les crevettes supplémentées avec *P. acidilactici*.

Bien que les voies d'infection de ce pathogène n'aient pas été élucidées chez *L. stylirostris*, l'ensemble de nos résultats indique l'implication d'un mécanisme de compétition-exclusion. L'étude qualitative de la flore intestinale, par DGGE, visait à évaluer si cet effet de compétition-exclusion entraînait des modifications substantielles des communautés bactériennes intestinales. Les premiers résultats obtenus montrent que les modifications qualitatives de la flore intestinale sont faibles. Des difficultés techniques n'ont hélas pas permis d'obtenir d'autres résultats à présenter, et un travail plus approfondi mériterait d'être entrepris afin de confirmer nos observations. A ce stade, nous ne pouvons donc confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une modification qualitative des populations bactériennes en lien avec les effets du probiotique mesurés au niveau quantitatif.

Au-delà des résultats, ce travail a nécessité une mise au point méthodologique conséquente, car l'utilisation de la DGGE pour l'étude de la flore intestinale de la crevette n'avait jamais été documentée avant cette thèse, et il ouvre ainsi des perspectives pour les études en écologie microbienne du tube digestif de cet animal. L'utilisation de la DGGE s'est révélée tout à fait adaptée à notre sujet d'étude, permettant de confirmer la présence de *P. acidilactici* dans le tractus intestinal des crevettes à l'aide d'une technique de biologie moléculaire, et de démontrer la faible diversité de la flore intestinale chez *L. stylirostris* élevée en eau claire, ce qui a été rapporté durant la période de cette thèse, chez d'autres espèces de crevettes à l'aide de la même technique (Li *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2008).

### **La crevette**

Au niveau de l'animal nous nous sommes tout d'abord intéressé aux aspects nutrition et croissance en relation avec le traitement probiotique. Pour cela notre équipe a adapté la méthode croissance-ration (Brett *et al.*, 1979) à la crevette, méthode qui permet véritablement de chiffrer et d'exprimer les besoins nutritionnels journaliers en terme de quantités nécessaires par animal ou par unité de biomasse. Dans ce domaine, notons que très peu d'études avaient été réalisées auparavant sur les crevettes pénéides du fait d'un manque d'outil méthodologique adapté (Kureshy & Davis, 2002). Nous avons ainsi caractérisé, dans nos conditions expérimentales, les apports indispensables à l'entretien et à la croissance optimale de *L. stylirostris*. Nous avons déterminé que 24 % (166,3 KJ.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) de l'énergie

digestible ingérée est allouée à l'entretien et 43 % ( $294,8 \text{ KJ.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) à la croissance. Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils corroborent des mesures directes en respirométrie ayant abouti à des valeurs équivalentes ( $116$  et  $313 \text{ KJ.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  respectivement au repos et après un repas) (Wabete, 2005).

Nous avons alors montré que l'effet du probiotique se traduit par un gain de croissance ( $4,5\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  contre  $3,3\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  à la ration optimale), et par une meilleure transformation de l'aliment par ces derniers : le K1 max est en effet amélioré de près de 38 % chez les animaux recevant le probiotique. Quant au K2, il est amélioré de 37 % à la ration optimale, indiquant une meilleure transformation de la part de l'aliment allouée à la croissance. Ce dernier résultat, ajouté au fait que les animaux nourris à 1% de la biomasse et traités au probiotique diminuent leurs besoins en aliment pour l'entretien et ne perdent pas de poids, nous ont conduit à proposer deux hypothèses ne s'excluant pas mutuellement : l'une reposant sur une action du probiotique sur le métabolisme, et l'autre sur un apport de nutriments essentiels.

Parallèlement, par la mesure de l'activité spécifique de l' $\alpha$  amylase, des réserves en glycogène et de la concentration en glucose dans la glande digestive, nous avons pu montrer que le probiotique permet une meilleure utilisation des carbohydrates (CBH) alimentaires (Article 3), résultat corroboré par un meilleur K1, chez les animaux traités. Par ailleurs, Lygren et Hemre (2001) ont montré chez le saumon atlantique une relation entre la disponibilité en CBH alimentaires et le niveau des défenses antioxydantes, d'où l'hypothèse émise par ces auteurs d'un lien entre le métabolisme des CBH et le statut antioxydant *via* la régénération de NADPH (pouvoir réducteur) et le rôle du glucose comme piègeur de certains radicaux libres. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse, le probiotique améliore en effet le statut antioxydant de la crevette parallèlement à une meilleure utilisation des CBH (Article 3).

Les études réalisées sur les défenses antioxydantes et le niveau du stress oxydant chez des crevettes saines ou infectées par *V. nigripulchritudine* nous permettent d'appréhender le rôle du probiotique sur la physiologie de *L. stylirostris*. Ainsi, chez les animaux sains, le probiotique conduit à un meilleur statut antioxydant total (TAS) et à une réduction des activités de deux enzymes antioxydantes majeures (SOD et CAT) (Article 4). Nos résultats sont une fois de plus en accord avec l'étude de Lygren et Hemre (2001) et viennent renforcer l'hypothèse précédente.



Nous montrons de plus que l'infection par immersion avec *V. nigripulchritudo* SFn1 conduit, après 48 heures, à un pic de mortalité. Cette mortalité est précédée de 24 heures par un niveau d'infection maximal des animaux et par un développement du stress oxydant caractérisé par une réduction des activités des enzymes antioxydantes et par une élévation des dégâts oxydatifs (Article 5). Cette séquence d'événements démontre, pour la première fois chez une espèce de crevette pénéide, qu'une infection bactérienne par immersion provoque un stress oxydant, probablement du fait d'une réaction immunitaire exacerbée de l'animal. Ce stress oxydant conduit à une fragilisation de l'animal, notamment en affectant l'intégrité cellulaire (Fridovich, 1998 ; Green & Reed, 1998), et de fait contribue aux mortalités. Dans ces conditions, le probiotique permet une limitation du niveau d'infection et du stress oxydant, ainsi qu'une réduction significative des mortalités.

L'ensemble de nos résultats indique que c'est en agissant sur la physiologie de la crevette que le probiotique améliore la résistance des animaux à l'infection par *V. nigripulchritudo*. Néanmoins, une action directe de *P. acidilactici* sur le compartiment pathogène pourrait aussi intervenir et expliquer les meilleures survies obtenues. Des études ultérieures sur le mécanisme de compétition-exclusion de *P. acidilactici*, ainsi que sur ses effets sur la réponse immunitaire de la crevette, devraient permettre respectivement d'investiguer cette dernière hypothèse et de préciser les effets du probiotique sur la physiologie de la crevette.

### ***Validation à l'échelle pilote et transfert des résultats***

Ces différents travaux ont montré, en conditions de laboratoire, que le probiotique agissait positivement sur la nutrition, la croissance et la santé des crevettes. L'expérimentation menée sur une ferme affectée par le « syndrome d'été » nous a permis de confirmer, à l'aide d'un dispositif expérimental permettant une puissance statistique acceptable (proche de 80%), les améliorations apportées par le probiotique en terme de résultats zootechniques, avec notamment une meilleure résistance des crevettes à ce syndrome (Article 7). Précisons que ce travail a nécessité la mise au point d'une méthode d'élevage en cages flottantes qui s'est révélée tout à fait adaptée aux expérimentations en bassins (Article 6), et qui a dès lors été transférée à la filière Calédonienne.

## **II Avancées relatives à la compréhension des mécanismes d'action de *P. acidilactici* chez *L. stylirostris***

Rappelons qu'au départ de ce travail, aucune information n'était disponible quant aux effets de *P. acidilactici* sur la biologie des crevettes pénéides. L'un des objectifs de cette thèse était donc de réaliser une première évaluation du probiotique *in vivo*, sur différents aspects de la biologie de *L. stylirostris*, afin de proposer des hypothèses explicatives de ses effets. Cet objectif a par conséquent été atteint puisque les résultats obtenus, et les hypothèses qui en découlent (Partie 3 : Chapitre 1,2&3), permettent aujourd'hui de proposer un premier scénario explicatif des bénéfices apportés par *P. acidilactici*, scénario fondé sur les interactions entre le probiotique et l'hôte, et le probiotique et la flore intestinale (Figure 4.2). En effet, n'ayant pu étudier les interactions entre la crevette et sa microflore intestinale, notre scénario reste basé sur une action supposée directe du probiotique sur l'animal et sur la microflore. Ainsi, dans le modèle avancé ici, faisant intervenir des interactions entre les trois compartiments, une partie reste à explorer.

Il est essentiel de préciser que la construction d'un tel scénario n'a été rendue possible que grâce à la mise en place d'une démarche reposant sur une approche globale du problème. En effet nous avons privilégié une telle approche vs une approche spécifique. Nous aurions pu faire le choix de concentrer nos efforts sur les actions de *P. acidilactici* sur la flore intestinale de la crevette, plus particulièrement sur les bactéries pathogènes. Cependant, une telle approche ne convenait pas au sujet traité premièrement parce que cette thèse s'est faite dans le cadre d'une convention CIFRE qui orientait *de facto* nos travaux vers l'application et deuxièmement parce les effets de *P. acidilactici* sur la crevette pénéide n'étaient pas du tout documentés ; il n'était dès lors pas possible de privilégier une piste plutôt qu'une autre. C'est pourquoi, nous avons pris l'option d'une démarche globale et réalisé une évaluation des effets du probiotique sur les résultats zootechniques et la physiologie de la crevette, et cela dans la perspective de la transposition des résultats aux conditions réelles d'élevage.

Nous avons de plus privilégié l'étude des actions de *P. acidilactici* sur la physiologie de la crevette, pour laquelle le Laboratoire de St Vincent était bien équipé, tandis que l'étude de la microflore intestinale a été limitée par le manque de moyens locaux, notamment pour la DDGE qui a été réalisée au LPI de Brest.

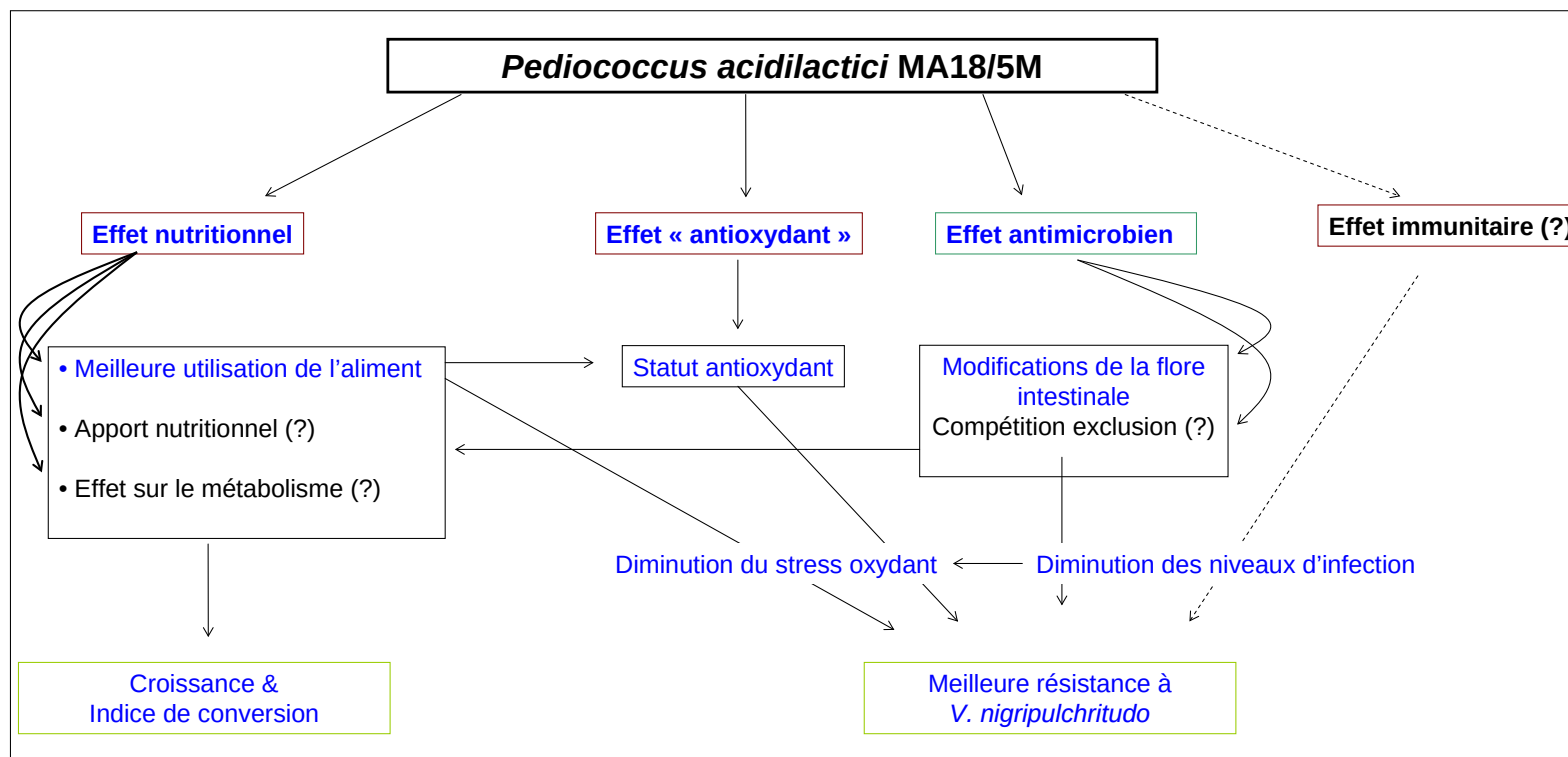


**Figure 4.2.** Scénario explicatif global des effets de *P. acidilactici* chez la crevette *L. stylirostris*. Sont indiqués en bleu les propositions appuyées par les résultats de nos différents travaux.

*P. acidilactici* exerce son action à deux niveaux, sur la flore intestinale et plus directement sur la physiologie de l'animal. Dans le tractus intestinal, le probiotique agirait *via la* compétition-exclusion conduisant à des modifications (quantitatives et qualitatives) de la microflore bactérienne. Par là même, cela limiterait la présence et la concentration des pathogènes et donc les risques d'infection. Au niveau nutritionnel, le probiotique confère une meilleure utilisation des carbohydrates alimentaires, abaisse les besoins pour l'entretien et/ou constituerait une source supplémentaire d'éléments nutritifs essentiels à la crevette. Une modification de la flore intestinale par le probiotique pourrait également être à l'origine de ces différents effets mais cela reste à démontrer. Enfin le probiotique améliore le statut antioxydant des animaux, nous relierons ce résultat à une élévation du pouvoir réducteur causé par la meilleure utilisation des CBH alimentaires. Il pourrait cependant également s'agir d'une action directe de *P. acidilactici* *via* ses capacités antioxydantes. Enfin, le probiotique permet de maintenir le niveau des défenses antioxydantes chez des crevettes infectées par *V. nigripulchritudo* et par là-même limite le stress oxydant. Cet effet protecteur du probiotique en conditions pathologiques est la conséquence soit de la réduction du niveau d'infection, soit d'une stimulation de l'immunité concomitante à l'élévation du pool antioxydant de l'animal.

Il apparaît que ces choix ou contraintes ont notamment eu pour conséquence des limites importantes dans l'exploration de l'effet du probiotique, notamment sur la microflore intestinale et sur les interactions entre celle-ci et l'animal. Dans ces conditions, il est possible que les effets mesurés sur l'hôte au cours de notre étude soient le fait d'une action indirecte du probiotique *via* des modifications de la microflore intestinale. Cette hypothèse, souvent évoquée dans la littérature mais rarement démontrée, impliquerait de travailler avec des modèles animaux axéniques (Sonnenburg *et al.*, 2006), condition difficile à remplir chez la crevette à ce stade de la recherche. Rappelons cependant que l'étude que nous avons menée à l'aide de la DGGE n'a pas permis de montrer de modifications substantielles de la flore intestinale, ce qui plaide, *a priori*, contre une telle hypothèse.

En tout état de cause, les bénéfices mesurés sur la croissance et la survie de la crevette au cours de notre étude sont fonction des rapports d'équilibre entre l'animal, la microflore intestinale et le probiotique (Figure 4.1). Comme nous le verrons ci-après, des recherches ultérieures, comme par exemple l'étude des effets de *P. acidilactici* sur la flore intestinale, devraient fournir des données sur ces rapports d'équilibre et permettre d'améliorer la compréhension des actions de ce probiotique.

A posteriori, il apparaît que le choix d'une approche globale était le plus pertinent, car cela permet aujourd'hui d'identifier plusieurs voies d'études qu'il n'était pas possible d'entrevoir initialement. Ainsi, nos travaux et nos résultats peuvent être considérés comme des pré-requis à des travaux plus spécifiques sur les modes d'action du probiotique. A notre connaissance, une telle approche reste originale par rapport à la plupart des études réalisées sur les probiotiques en aquaculture, et les conclusions obtenues, suite à ce travail, démontrent qu'elle mériterait d'être plus largement appliquée.

### **III Contribution au développement de l'additif Bactocell® en crevetticulture**

Comme nous l'avons déjà rappelé, un autre objectif de cette thèse CIFRE était appliqué et directement lié au contexte de la crevetticulture de Nouvelle-Calédonie (mortalités saisonnières sur les fermes de grossissement) (Herbland & Harache, 2008), et à la problématique de développement commercial pour la société Lallemand dans le secteur

aquacole. Il s'agissait ainsi d'une part, de démontrer l'efficacité du traitement probiotique Bactocell<sup>®</sup> chez la crevette d'élevage, plus particulièrement vis-à-vis de la lutte contre les vibrioses, et, d'autre part, de réunir un ensemble d'informations techniques et scientifiques permettant à la société Lallemand d'engager le développement commercial de cet additif en crevetticulture.

Ainsi suite à ce travail de thèse, la société Lallemand peut aujourd'hui constituer un dossier scientifique et technique sur l'application de ce probiotique en grossissement de crevettes pénéides. De plus, les données obtenues ont permis le dépôt, auprès de la Commission Européenne (EFSA<sup>1</sup>), d'un dossier d'autorisation pour l'utilisation de cet additif en crevetticulture. Rappelons que ce produit est déjà autorisé comme additif zootechnique (E1712) en engraissement des porcs et des poulets de chair, et qu'un dossier similaire a aussi été déposé pour des applications en salmoniculture.

En ce qui concerne les retombées locales en Nouvelle-Calédonie, notre travail a tout d'abord permis le transfert à la filière d'une méthode (cages flottantes) pour expérimenter en bassin d'élevage. Celle-ci est aujourd'hui utilisée par les fabricants d'aliments du territoire afin d'évaluer différentes formulations de leurs aliments avant de les proposer aux fermes. De plus, le groupement des fermiers aquacoles (GFA) a aussi acquis des cages flottantes et réalise différentes expérimentations comme la comparaison de types génétiques (Goyard *et al.*, 2008), ou encore l'utilisation de probiotiques et d'autres additifs alimentaires. Cependant, à l'issue de cette période de thèse, les fermes de Nouvelle-Calédonie n'utilisent pas le Bactocell<sup>®</sup>. Cela peut s'expliquer principalement par l'absence, chez les industriels, d'équipements adaptés à l'enrobage du produit. Ajoutons que les fermiers de Nouvelle-Calédonie sont aujourd'hui demandeurs d'autres essais complémentaires sur ferme, ou d'exemples d'utilisation de ce probiotique dans d'autres pays producteurs de crevettes, avant d'envisager éventuellement son application.

---

<sup>1</sup> Autorité Européenne de sécurité des aliments

## IV Perspectives

Enfin, au terme de cette thèse, différentes perspectives peuvent être proposées, aussi bien du point de vue de la compréhension des mécanismes d'action de *P. acidilactici*, que des applications de cet additif en crevetticulture.

### ***Perspectives de recherche pour une meilleure compréhension des modes d'action du probiotique***

Comme nous l'avons mentionné précédemment l'approche globale de ce travail de thèse a permis de conduire à de nouvelles questions qui pourraient désormais faire l'objet d'études plus spécifiques. En effet, le scénario proposé en figure 4.1 constitue une première proposition et nécessiterait de nombreux travaux afin (i) de vérifier et d'expliciter certains des mécanismes proposés et (ii) d'en évaluer de nouveaux. La difficulté majeure est que ces questions abordent très souvent des domaines de la biologie toujours mal connus chez les Crustacés. Par exemple, à l'issue de notre travail, il apparaît qu'un des sujets à développer en priorité, afin de mieux comprendre les actions des probiotiques chez les crevettes pénéides, concerne la caractérisation de la microflore intestinale de ces animaux (composition, dynamique d'évolution, existence d'une flore résidente...) et le rôle de celle-ci sur leur physiologie.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons aujourd'hui proposer plusieurs sujets d'étude qui permettraient de préciser les mécanismes d'action du probiotique et de compléter le scénario proposé ici.

Il s'agit tout d'abord de la caractérisation des effets de *P. acidilactici* sur le compartiment pathogène, en évaluant *in vivo*, d'une part, la compétition-exclusion avec des bactéries pathogènes à l'aide de technique d'hybridation *in situ*, et, d'autre part, en vérifiant l'activité biologique du probiotique dans le tractus intestinal par détection des ARN spécifiques.

Une autre étude pourrait aussi concerner l'évaluation des effets de *P. acidilactici* sur l'immunité de la crevette, afin de valider l'hypothèse d'une action physiologique responsable de la meilleure résistance des animaux à une infection bactérienne. Parallèlement, une évaluation *in vitro* des capacités antioxydantes de *P. acidilactici* (production de vitamines, de

GSH, chélation d'ions métalliques...) permettrait d'investiguer une des autres hypothèses explicatives formulées dans cette thèse.

Dans le domaine de la nutrition, il serait particulièrement utile de déterminer les effets du probiotique sur la digestibilité des principaux nutriments, et notamment des carbohydrates. Enfin, un sujet majeur concerne les mécanismes responsables de la stimulation de l'activité digestive, particulièrement de l'activité amylasique. À cette fin, l'utilisation du modèle *Artémia* (Cecile, 2006) pourrait être particulièrement adaptée.

Précisons cependant que, dans la perspective d'études plus approfondies des modes d'action de *P. acidilactici* en conditions *in vivo*, et du fait de la probable complexité des interactions entre la bactérie probiotique, la microflore intestinale et l'hôte, l'utilisation de modèles expérimentaux moins complexes semble être incontournable. Ainsi des cultures d'*Artémia* axéniques ont été utilisées à cette fin à plusieurs reprises (Marques *et al.*, 2004, 2005, 2006). Ce type d'approche, combiné à des tests de compétition avec des pathogènes (Soltanian *et al.*, 2007), et/ou à des analyses transcriptomiques (Sonnenburg *et al.*, 2006), pourrait se révéler particulièrement utile afin de démontrer certains des mécanismes d'action envisagés. Dans ce cadre, le séquençage complet du génome de *P. acidilactici* MA18/5M, accompli par l'institut Rosell (Lallemand), devrait être d'une grande utilité dans la caractérisation des effets biologiques de cette souche.

Enfin, nous proposons l'utilisation de *P. acidilactici* MA18/5M comme probiotique de référence (Témoin positif) pour les études futures d'évaluation de bactéries probiotiques chez les crevettes pénéides. En effet, cette souche est enregistrée, largement autorisée, parfaitement caractérisée, et est aujourd'hui, à l'issue de ce travail de thèse, l'un des rares probiotiques à avoir fait l'objet d'autant de travaux scientifiques chez la crevette.

### ***Perspectives quant à l'évaluation du probiotique sur les autres phases d'élevage***

Afin d'être complet, signalons que ce travail s'est limité aux stades juvéniles et sub-adultes et qu'il serait intéressant d'élargir l'étude aux autres phases d'élevage (géniteur, larves, post-larves). Cependant en ce qui concerne les phases larvaires, un travail préliminaire équivalent à celui entrepris dans le premier chapitre de la troisième partie de cette thèse devra être réalisé afin de déterminer préalablement les modalités d'administration du probiotique (voie, dose et fréquence).

### ***Perspectives technologiques***

Le point de blocage majeur quant à l'utilisation industrielle de ce probiotique concerne le procédé d'incorporation dans l'aliment. Les conditions de fabrication des aliments destinés à la crevette sont en effet extrêmement agressives (température de 90°C pendant plusieurs minutes) et obligent à envisager l'incorporation du probiotique, par enrobage post-granulation, en fin de chaîne de fabrication. La difficulté est que ce type de procédé requiert un équipement spécifique généralement inutilisé pour la fabrication des aliments crevette.

Précisons cependant que l'intérêt croissant des probiotiques auprès des professionnels de l'aquaculture devrait inciter les fabricants d'aliments à investir dans ce type d'équipement. A titre d'exemple, suite à ce travail de thèse, quelques producteurs d'aliments crevette utilisent désormais l'additif Bactocell<sup>®</sup> en post-granulation (Lallemand, communication personnelle).





|                                                      |
|------------------------------------------------------|
| <p><b>REFERENCES</b><br/><b>BIBLIOGRAPHIQUES</b></p> |
|------------------------------------------------------|



-A-

- Abdel-Rahman, S.H., Kanazawa, A., Teshima, S., 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the level of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 1491-1494.
- Abele D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831-1841.
- Abele-Oeschger, D., Sartoris, F.J., Pörtner, H.O., 1997. Effect of elevated hydrogen peroxide levels on aerobic metabolic rate, lactate formation. ATP homeostasis and intracellular pH in the sand shrimp *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C 117, 123-129.
- Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 68, 171-178.
- Adema, C.M., Van der Knaap, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan haemocyte mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4: 201-223.
- Ahotupa, M., Saxelin, M., Korpela, R., 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today (Suppl.)* 31, 51S-52S.
- 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.
- Akyiama, D., Polanco, B., 1997. Semi-Intensive Shrimp Farm Management. Technical Manual (ed. by B. Polanco), American Soybean Association, Caracas, Venezuela, p. 30.
- Alava, V.R., Lim, C., 1983. The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment, *Aquaculture* 30, 53-62.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., Teixeira, P., 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): in situ assays. *Meat Science* 76, 796-800.
- Alday-Sanz, V.; Roque, A., Turnbull, J.F., 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 48, 91-99.
- Alderman, D.J., Costa-Pierce, B.A., Donaldson, E.M., Hulata, G., Wilson, R.P., 2007. Use of the generic name *Penaeus*. *Aquaculture* 264, 1.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., 1986. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 66, 403-414.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., 1987. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 95, 129-137.
- Amaya, E.A., Davis, D.A., Rouse, D.B., 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions *Aquaculture* 262, 393-401.
- Andrews, J.W., Sick, L.V., Baptist, G.J., 1972. The influence of dietary protein and energy levels on growth and survival of Penaeid shrimp. *Aquaculture* 1, 341-347.
- Angulo, F.J., 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. *APUA Newsletter* 18, 1-6.
- APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2000. Report of a Joint APEC/FAO/ NACA/SEMARNAP ad-hoc expert consultation on trans-boundary aquatic animal pathogen transfer and development of harmonised standards on aquaculture health management, 24-28 July 2000, Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.
- Aquacop, Patrois, J., Barret, J., Mazurié, J., Intensive culture of *P. vannamei* and *P. stylirostris* ; preliminary results presented at the 1987 WAS. Guayaqui. (unpublished).
- Arena, L., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Soye, C., Van Wormhoudt, A., Rosas, C., 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrates levels, *J. Shellfish Res.* 22, 269-279.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L., 2005a. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* 36, 758-767.

- Aubin J., Gatesoupe, F.J., Quentel, C., Forraz, M., Facqueur, J.M., Rochet, B., Usache, V., 2005b. Etude de l'amélioration de la rentabilité et de la sécurité sanitaire des filières truite arc-en-ciel et bar par l'utilisation de probiotiques par voie alimentaire. Rapport Final, Convention N°008-03C, Contract OFIMER N°A01959, 67 pp.
- Austin, B., Zhang, X., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett Appl Microbiol 43, 119-124.
- Austin, D.A., Baker, J.A., 1988. Fate of bacteria ingested by larvae of the freshwater mayfly *Ephemera danica*. Microb. Ecol. 15, 323-332.
- Awaad, M.H.H., Amer, M.H., Zohair, G.A., Atta, A., Elmeniaawy, M.; Elkholy, M.A., 2005. Effect of *Pediococcus acidilactici* on layer hens serum/yolk cholesterol, egg quality, and intestinal/egg shedding of *Salmonella enteritidis*. Veterinary Medical Journal Giza 53, 489-499.
- Awaad, M.H.H., Afify, M.A., Zouel-Fakar, S.A., Shalaby, B., Chevaux, E., Delforge, J., Dussert, L., Khetrou, M., 2003. Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* sur l'infection à *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet de chair. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 502-505

### -B-

- Bachere, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; de Lorgeril, J.; Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defence of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea Gigas*. Immunol. Rev. 198, 149-168.
- Baillet, C., Cuzon, G., Cousin, M., Kerleguer, C., 1997. Effect of dietary protein levels on growth of *Penaeus stylirostris* juveniles. Aquaculture Nutrition 3, 49-53.
- Bairagi, A., Sakar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International 10, 109-121.
- Baumann, P., Schubert, R.H.W., 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram negative rods, Family II. Vibrionaceae. In: Holt, J.G., Krieg, N.R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, pp. 516-550.
- Bernfeld, P., 1955. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 149-158.
- Bergey, 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, volume 2 (part B), 507.
- Beyer, W., Imlay, J., Fridovich, I., 1991. Superoxide dismutases. Prog. Nucleic Acid Res. 40, 221-253.
- Bhowmik, T., Marth, E.H., 1990. Esterases of *Micrococcus* species: identification and partial characterization. J. Dairy Sci. 73, 33-40.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Belden, E.L., 1990. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 69, 211-215.
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. In: *Fish Physiology* (Eds. Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, J.R.). Academic Press, New York, NY, Vol. 8, 599-675.
- Boucher G. (2004). Méiobenthos et indicateurs de la qualité des écosystèmes. Quel intérêt pour l'aquaculture des crevettes ? In: Styli 2003. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie. Nouméa-Koné, 2-6 juin 2003. Ed. Ifremer, Actes Colloq., 38, 167-172.
- Boyd, C.E., Clay, J.W., 2002. Evaluation of Belize Aquaculture: a superintensive shrimp aquaculture system. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on shrimp farming and the environment. Work in progress for public discussion. Published by the Consortium. 17 pp.
- Brouwer, M., Brouwer, T.H., Grater, W., Brown-Peterson, N., 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. Biochem. J. 374, 219-228.

- Browdy, C.L., Bratvold, D., Hopkins, J.S., Stokes, A.D., Sandifer, P.A., 2001. Emerging technologies for the mitigation of environmental impacts associated with shrimp aquaculture pond effluents. *Asian Fisheries Science* 134, 255-267.
- Brunson, J.F., Romaine, R.P., Reigh, R.C., 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L., *Aquac. Nutr.* 3, 9-16.
- Burford, M.A., Smith, D.M., Tabrett, S.J., Coman, F.E., Thompson, P.J., Barclay, M.C., Toscas, P.J., 2004. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp, *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquaculture Nutrition* 10, 15-23.
- 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.
- Brunvold, L., Sandaa, R.-A., Mikkelsen, H., Welde, E., Hogne, H., Bergh, Ø., 2007. Characterisation of bacterial communities associated with intensively reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), *Aquaculture* 272, 319-327.

### -C-

- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137-1144.
- Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y., 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Gen. Appl. Microbio.*, 45, 177-184.
- Carefoot, T.H., 1990. Specific dynamic action (SDA) in the supralittoral isopod, *Ligia pallasii*: Effect of ration and body size on SDA. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 95, 317-320.
- Carvalho E.A., Nunes A.J.P., 2006. Effects of feeding frequency on feed leaching loss and grow-out patterns of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed under a diurnal feeding regime in pond enclosures. *Aquaculture* 252, 494-502.
- Castex M., 2005. Evaluation du probiotique bactérien, *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) en élevage de la crevette *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie : aspects microbiologiques, immunitaires, nutritionnels et zootechniques. Rapport pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon. 97 pp.
- Castex, M., Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P., Usache, V., 2006. Feeding evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) in sub adult shrimp *Litopenaeus stylirostris*: microbial, nutritional and zootechnical aspects. Book of Abstract, WAS Annual Meeting, 9-13 May 2006. Firenze, Italia.
- Ceccaldi, H.J., 1994. Appareil digestif: anatomie et physiologie, dans *Traité de zoologie de P-P. Grassé*, tome VII, Crustacés, fascicule I Masson édit., Paris, 487-527.
- 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.
- Cecile, S., 2006. Utilisation d'un bio essai *Artemia* pour caractériser les molécules actives d'une préparation microbienne commerciale à base de lactobacilles sur la physiologie digestive de crustacés. Mémoire de MASTER Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie - Spécialité Océanographie et Environnements Marins, Université Pierre et Marie, Curie. pp. 71.
- Cheng, W., Wang, C.H., 2001. The susceptibility of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* and its resistance under copper sulfate. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 137-144.
- Chevaux, E., Skiba, F., Granier, C., Moreau, R., Le Treut, Y., 2006. Effect of *Pediococcus acidilactici* (MA/18/5M) supplementation on piglets digestibility and growth performance. Abstract in Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Abstract No: P.42-03.
- 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.*, 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, pp.15-31.

- 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., Maisonneuve, V., Lemaire, P., Wabete, N., Usache, V., 2005. Dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* MA 18/5 (Bactocell®) study to a juvenile marine shrimp *Litopenaeus stylirostris* reared in tanks and in pond. Book of abstracts, WAS annual meeting. 9-13 May 2005. Bali, Indonesia
- Chim, L., Wabete, N., Lemaire, P., Della-Patrona, L., Massabuau, J.C., 2006. Growth-ration relationship in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Effect of natural food from the pond on maintenance energy requirement and scope for growth. Book of Abstract WAS Annual Meeting, 9-13 May 2006. Florence, Italy.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish & Shellfish Immunology 23, 364-377.
- Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H., 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2643-2648.
- Clairbone, A., 1985. Catalase. In: R. Greenwald, Editor, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, New York, 283-284.
- Clifford, H.C., 1994. Semi-intensive sensation. A case study in marine shrimp pond management, World Aquac. 25, 6-13.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G., 2004. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. Int. J. Food Microbiol. 90, 83-91.
- Coenye, T., Vandamme, P., 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. FEMS Microbiol. Lett. 228, 45-49.
- Colvin, L.V., Brand, C.W., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment systems, Proc. World Maric. Soc. 8, 821-840.
- Comoglio, L.I., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G., Amin, O., 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Shellfish Research 23, 243-249.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., Livingstone, D.R., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus lucusta* (Crustacea: Amphipoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 289, 83-101.
- Costa, R., Mermoud, I., Kobravi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legourmellec, M., Grimont, P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. Aquaculture 164, 297-309.
- Cousin, M., 1995. Contribution à l'étude de l'utilisation des glucides et du rapport protéine/énergie chez *P. vannamei* et *P. stylirostris*. INA/PG thesis, Paris, pp. 201.
- Cousin, M., Cuzon, G., Blanchet, E., Ruelle, F., AQUACOP., 1993. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Penaeus vannamei* juveniles. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop: Fish Nutrition in Practice (Kaushik, S.J. & Luquet, P. eds.), INRA, Paris, France, 599-606.
- Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., Aquacop., 1996. Digestibility of starch in *P. vannamei*: *in vitro* and *in vivo* study on eight samples of various origin. Aquaculture 140, 361-372.
- Coutelle, C., 1992. Optimization of a spectrophotometric assay of total and oxidized blood glutathione: comparison with a fluometric method, Ann. biol. clin., 50, n°2, pp 71-76
- Cox, J.L., 1981. Laminarinase induction in marine zooplankton and its variability in zooplankton samples. Journal of Plankton Research 3, 345-356.
- Cuzon, G., Cahu, C., Aldrin, J.F., Messenger, J.L., Stephan, G., Mevel, M., 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*, Proc. World Maric. Soc. 11, 410-423.

- Curtin, J.F, Donovan; M., Cotter; T.G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol Methods* 265, 49-72.
- Cuzon G., Guillaume, J., 1997. Energy and protein: energy ratio. In: *Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6* (Eds. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 51-70. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551.
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. and Van Wormhoudt, A., 2000. Utilization of Carbohydrates by Shrimp. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

### -D-

- D'Abramo, L.S., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. 1997. *Crustacean Nutrition, Advances in World Mariculture Society Vol. 6* (Eds. by D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M.), pp 51-70. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Dall, W., 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* (Racek & Dall). *Aust. J. Zool.* 15, 699-714.
- Dall, W., Moriarty, D.J.W., 1983. General anatomy. In: *The biology of Crustacea: Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation*, 215-261.
- Dandapat, J., Chainy, G.B.N., Rao, K.J., 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135, 221-233.
- Davis, D.A., Samocha, T.M., Bullis, R.A., Patnaik, S., Browdy, C., Stokes, A., Atwood H., 2004. Practical diets for *Litopenaeus vannamei*, (Boone. 1931): working towards organic and/or all plant production diets, *Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Symposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 16–19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, Mexico.
- De La Pena, L. D., Momomaya, K.; Nakai, T., Muroga, K., 1992. Detection of the causative agent of vibriosis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol* 244, 223-228.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology* 25, 472-479.
- Dempsey, A.C., Kitting, C.L., 1987. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana* 52, 90-94.
- Dempsey, A.C., Kitting, C.L., Rosson, R.A., 1989. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* 56, 267-278.
- Dent, K.C., Stephen, J.R., Finch-Savage, W.E., 2004. Molecular profiling of microbial communities associated with seeds of *Beta vulgaris*. Subsp. *Vulgaris* (sugar beet). *J. Microbiol. Methods* 56, 17-26.
- Deshimaru, O., Shigeno, K., 1972. Introduction to the artificial diet for prawn *Penaeus japonicus*, *Aquaculture* 1, 115–133.
- Deshimaru, O., Yone, Y., 1978. Requirement of prawn for dietary minerals, *Nippon Suisan Gakkaishi* 44, 907-910.
- Destoumieux, D.; Munoz, M.; Bulet, P., Bachere, E., 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci*, 57, 1260-1271.
- Destoumieux-Garzon, D.; Saulnier, D.; Garnier, J.; Jouffrey, C.; Bulet, P., Bachere, E., 2001. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276, 47070-47077.



- Di Giancamillo, A., Vitari, F., Savoini, G., Bontempo, V., Bersani, C., Dell'Orto, V., Domeneghini, C., 2007. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. A qualitative and quantitative micro-anatomical study. *Histology and histopathology* 23, 651-654.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical response in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Doeschate, K.I., Coyne, V.E., 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174-179.
- Donohue, DC., 2006. Safety of probiotics. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 15, 563-569.
- 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.
- Dubois, M.K., Lilles, L.A., Hamilton, J.C., Rebers, P.A., Smith, F., 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

### -E-

- 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, 1814-1822.
- Elegado, F.B., Kim, W.J., Kwon, D.Y., 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici*. *M. Int. J. Food. Microbiol.* 37, 1-11.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of 2 chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Esiobu, N., Yamazaki, K., 2003. Analysis of Bacteria Associated with the Gut of Healthy Wild Penaeid Shrimps: A step towards effective probiotics in Aquaculture. *J. Aqua. Trop.* 18, 275-286.

### -F-

- FAO, 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2007.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48, 149-158.
- Fernández, I., Oliva, M., Carrillo, O., Van Wormhoudt, A., 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 1267-1271.
- Fitzgerald, L., 2000. Teagasc directory of silage additives, *Today's Farm* 10, 35-39.
- Fitzsimons, A., Duffner, F., Curtin, D., Brophy, G., O'Kiely, P., O'Connell, M., 1992. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Appl Environ Microbiol* 58, 3047-3052.
- Flegel, T.W., 2007a. Confirmation of the right to refuse revision in the genus *Penaeus*. *Aquaculture* 280, 1-4.
- Flegel, T.W., 2007b. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods, *Developmental and Comparative Immunology* 31, 217-231.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.

-G-

- Gagnon, N., Talbot, G., Ward, P., Roy, D., Dupuis, M., Farnworth, E., Tompkins, T. A. and Lessard, M., 2007. Evaluation of bacterial diversity in the gut of piglets supplemented with probiotics using ribosomal intergenic spacer analysis. *Can. J. Anim. Sci.* 87, 207-219.
- Galgani, F. G., 1983. Etude des Proteases et de la digestibilité des Crevettes Pénéides (Crustacea, Decapoda). Thèse (3eme cycle. Oceanology). Fat. Sciences Luminy, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France. 125 pp.
- Galgani, 1985. Régulation de l'activité des protéases digestives de *Penaeus japonicus* Bate en relation avec la température, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94, 11-18.
- Galgani, F. G., Y. Benyamin, and H. J. Ceccaldi. 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskal): a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. *Comp. Biochem. Physiol. B* 72, 355-361.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C., 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) as a function of body weight. *Aquac. Res.* 34, 1403-1411.
- Gatesoupe, F.J., 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 21, 347-360.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gauquelin, F., Cuzon, G., Gaxiola, G., Rosas, C., Arena, L., Bureau, D.P., Cochard, J.C., 2007. Effect of dietary protein level on growth and energy utilization by *Litopenaeus stylirostris* under laboratory conditions *Aquaculture* 271, 439-448.
- García-Carreño, F.L., Hernández-Cortés, M.P., Haard, N.F., 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *J. Agric. Food. Chem.* 42, 1456-1461.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O., 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119, 4562-4570.
- GFA., 2006. Rapport d'activité: missions et analyses de l'observatoire technique et de l'observatoire économique. Groupement des fermes aquacoles de Nouvelle-Calédonie, Noumea, 72 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.
- Grassé, P.P., 1994. Traité de zoologie. Morphologie, physiologie, reproduction, systématique, vol. VII (Ed. Masson), Paris, Milan, Barcelone, 917p.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006a. Summer Syndrome in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105-113.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Decker, S., Saulnier, D., le Roux, F., 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 570-580
- Godin, D.M., Carr, W.H., Hagino, G., Segura, F., Sweeney, J.N., Blankenship, L., 1996. Evaluation of a fluorescent elastomer internal tag in juvenile and adult shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 139, 243-248.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 756-761.
- Golledge, C.L; Stingemore, N., Aravena, M., Joske, D., 1990. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. *J Clin Microbiol.* 28, 1678-1679
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10, 139-157.

- 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.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega, M., Abreu-Grobois, F., Roque, A., 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2318-2322.
- Gorospe, J., Nakamura, K., Abe, M., Higashi, S., 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fish Sci.* 62, 914-918.
- Gournier-Château, N., Larpent, J.P., Castellanos, M.I., Larpent, J.L., 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier, Technique et Documentation (ed). Paris, France, 1-192.
- Goyard, E., Goarant, C., Ansquer, D., Brun, P., De Decker, S., Dufour, R., Gallinié, C., Peignon, J.M., Pham, D., Vourey, E., Harache, Y., Patrois J., 2008. Cross breeding of different domesticated lines as a simple way for genetic improvement in small aquaculture industries: Heterosis and inbreeding effects on growth and survival rates of the Pacific blue shrimp *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris*. *Aquaculture*, 278, 43-50
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Guerra, N.P., Torrado, A., López, C., Fajardo P., Pastrana, L., 2007. Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 in both batch and re-alkalized fed-batch cultures, *Journal of Food Engineering* 82, 103-113.
- 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.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodríguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Gunduz, G.T., Tuncel, G., 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 329-336.
- Günzler, A., and 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.
- Guo, R., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Huang, J.-W. 2006. Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture Nutrition* 12, 83-88.
- Gurka, M.J., Edwards, L.J., 2008. Mixed Models. In: *Handbook of Statistics*, Vol. 27 (Elsevier), doi: 10.1016/S0169-7161(07)27008-7, 253-280.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135.
- Guzman C., Gaxiola, G., Rosa, C., Torre-Blanco, A., 2001. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture nutrition* 7, 113-122.

## -H-

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.
- Hammes, W.P., Tichacek, P.S., 1994. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 198, 193-201.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- Harris, J.M., 1993. The Presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb Ecol.* 25, 195-231.
- Harris, J.M., Seiderer, L.J., Lucas, M.I., 1991. Gut microflora of two saltmarsh detritivore Thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microb. Ecol.* 21, 63-82.

- Heinz, M., Von Wintzingerode, F., Moter, A., Halle, E., Lohbrunner, H., Kaisers, U., Neuhaus, P., Halle, E., 2000. A case of septicemia with *Pediococcus acidilactici* after long-term antibiotic treatment. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 946-948.
- Herbland, A., Harache, Y., coord., 2008. Santé de la crevette d'élevage en Nouvelle-Calédonie. Editions Quae, 144p.
- Hernández-Cortés, M.P., Quadros-Seiffert, W., Navarrete del Toro, M.A., Portillo, G., Colado, G., García-Carreño, F.L., 1999. Rate of ingestion and proteolytic activity in digestive system of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, during continual feeding. J. Appl. Aquac. 9, 35-45.
- Hernández-Cortés, P., Whitaker, J., García-Carreño, F., 1997. Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). J. Food Biochem. 21, 497-510.
- Holgreem, A., 2003. Redox regulation of genes and cell function. In : Critical review of oxidative stress and aging. Vol II RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific, pp. 102-111.
- Holmblad, T., Soderhall, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture 172, 111-123.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pounghshompoo, S., Bengtsson, B.E., Kautsky N., 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. Int. J. Food Sci. Technol. 38, 255-266
- Hood M.A. & Meyers S.P., 1974. Microbial aspects of penaeid shrimp digestion. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Proceedings of the 27th Annual Session, Miami Beach, FL, 81-91.
- Hood, M.A., Meyers, S.P., Colmer, A.R., 1971. Bacteria of the digestive tract of the white shrimp *Penaeus setiferus*. Bacteriol. Proc. 71, 48.
- 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.
- Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Fontanillas, R., Rosnes, J.T., 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 272, 581-588.
- Hsieh, S-H., Ruan, Y-H., Li, Y-C., Hsieh, P-S., Hu, C-H., Kuo, C-M., 2008a. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture 275, 335-341.
- Hsieh, T.J., Wang, J-C., Hu, C-Y., Li, C.T., Kuo, C.M., Hsieh, S.L., 2008b. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish & Shellfish Immunology 25, 581-588
- 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.
- Hu, K.J., Leung, P.C., 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol., B 146, 69-80.
- Hu, Y., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zheng, S., Cheng, K., 2008. Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. Aquaculture nutrition, doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00555.x.

### -I-

- Imlay, J.A., Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science 240, 1302-1309.
- Ishibashi, N., Yamazaki, S., 2001. Probiotics and safety. Am. J. Clin. Nutr. 73, 425S-470S.
- Ishimaru, K.; Akagawa-Matsushita, M., Muroga, K., 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*) Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 134-138.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2004. Probiotics. Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology 18, 299-313.

**-J-**

- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., Boveris, A., 1986. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 703-719.
- Jamuna, M., Jeevaratnam, K., 2004. Isolation and characterization of *lactobacilli* from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50, 79-90.
- Jiravanichpaisal, P.; Miyazaki, T., Limsuwan., C., 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Anim. Health*, 6, 27-35.
- Jobling, M., Koskela, J., 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *J. Fish Biol.* 49, 658-667.
- 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, 251-258.
- 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.

**-K-**

- Kanazawa, A., Teshima, S., Sakamoto M., 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture* 50, 39-49.
- Karnati, S.K.R., Sylvester, J.T., Noftsker, S.M., Yu, Z., St-Pierre, N.R., Firkins, J.L., 2007. Adapting molecular techniques and omasal sampling to assess changes in ruminal bacterial populations and protozoal generation time in cows fed different methionine sources. *J. Dairy Sci.* 90, 798-809.
- Keller, R., Sedlmeier, D., 1988. A metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In "Endocrinology of Selected Invertebrate Types" (H. Laufer and R. G. H. Downer, Eds.), A. R. Liss, New York, Vol. 2, pp. 315-326.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-85.
- Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): used in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 551-563.
- Knorr, D., 1998. Technology aspects related to micro organisms in functional foods. *Trends in Food Science and Technology* 9, 296-306.
- Kooter, I.M., 2004. Inventory of biomarkers for oxidative stress. RIVM report 630111001.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., and Zilmer, M., 2003. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition* 90, 449-456.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A., 2002. Two antioxidative *lactobacilli* strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72, 215-224.
- 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-

- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193-201.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A.; 1996. Adaptation level and of trypsin, chymotrypsin and cu-amylase to casein protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 208, 107-125.
- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A. & AQUACOP, 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Living Resour.* 7, 203-210.
- Leaño, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., Paner, M.G., 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164, 367-374.
- Lee, D.L., 1971 Studies on the protein utilization related to growth in *Penaeus monodon* Fabricus. *Aquaculture* 1, 1-3.
- 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., Lawrence, A.L., 1982. A quantitative analysis of digestsive enzymes in penaeid shrimp: influences of diet, age and species. *Physiologist* 25, 241.
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Dalloul, R.A., Park, D.W., Hong, Y.H., Lin, J.J., 2007. Influence of *Pediococcus*-Based Probiotic on Coccidiosis in Broiler Chickens. *Poult Sci.* 86, 63-66.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1985. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricult. Soc.* 16, 275-287.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. and Akiyama, D.M., Editors, 1997. *Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture* vol. 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 194-260.
- 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.
- Lee, P.G., Smith, L.L., Lawrence, A.L. 1984. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42, 225-239.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity, *Fish Shellfish Immunol.* 12, 421-437.
- Lee, K.K., Yu, S.R., Liu, P.C., 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 34, 110-117.
- 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. *SICCPS Book of Abstracts. SEAFDEC*, Iloilo City, Philippines, p. 46.
- Lehnert, S.A., Johnson, S.E., 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol.* 133B, 163-171.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and mussels *Mytilus edulis*. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 1, 1119-1150.
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, J.-A., Chim, L., 2002. Combined effects of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub-adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209, 307-317.

- 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*. Third workshop in comparative aspects of oxidative stress in biological system, oct. 16-19, México.
- Lemonnier, H., Herbland A., Salery, L., Soulard, B., 2006. “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* grow-out ponds in New Caledonia: Zootechnical and environmental factors. *Aquaculture* 261, 1039-1047.
- Lemos, D., Hernández-Cortés, M.P., Navarrete, A., Garcia-Carreño, F.L. and Phan, V.N., 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larval and postlarval shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Mar. Biol.* 135, 653-662.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Matte, J.J., Nadeau, E., Goulet, J., Fairbrother, J.M., 2008. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J. Anim Sci.* doi:10.2527/jas.2008-0919.
- Lesser, M. P., 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Ann. Rev. Physiol.* 68, 253-278.
- 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, C-C, Chen, J-C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, doi:10.1016/j.fsi.2008.01.007.
- 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.
- Li, P., Burr, G.S., Gatlin III, D.M., Hume, M.E., Patnaik, S., Castille, F.L., Lawrence, A.L., 2007. Dietary Supplementation of Short-Chain Fructooligosaccharides Influences Gastrointestinal Microbiota Composition and Immunity Characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. *The Journal of Nutrition, Nutritional Immunology* 0022-3166/07, 2763-2768.
- Lightner, D.V., 1998. *Vibrio* disease of penaeid shrimp. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), *Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 42-47.
- Lin, H.Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W., Li, Z.J., 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 35, 1441-1447.
- Lin, M.Y., Yen, C.L., 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1460-1466.
- Ling, N., Cotter, D., 2003. Statistical power in comparative aquaculture studies. *Aquaculture* 224, 159-168.
- Liu, C. H., ChunHung, L.; Winton, C.; Cheng, W.; JungPing, H.; JiannChu, C., Chen, J. C., 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 61, 169-174.
- Liu, C.H., Tseng, M.C., Cheng, W., 2007a. 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, 34-45.
- Liu, Y., Wang, W.N., Wang, A.L., Wang, J.M., Sun, R.Y., 2007b. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture* 265, 351-358.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lombardi, J.V., De Almeida Marques, H.L., Toledo Lima Pereira, R., Saleé Barreto, O.J., De Paula, E.J., 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Aquaculture* 258, 412-415.

- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., Vandergheynst, J., Mills, D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6801-6807
- Lopez-Lopez, S., Nolasco, H., Villarreal-Colmenares, H., Civera-Cerecedo, R., 2005. Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquac. Nutr.* 11, 79-85.
- Lovett, D.L., Felder, D.L., 1990. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penseus setiferus*. *Biol. Bull.* 178, 160-172.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Luchansky, J., Glass, K., Harsono, K., Degnan, A., Faith, N., Cauvin, B., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A. and Cassens, R., 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3053-3059.
- Lucien-Brun, H., Van Wormhoudt, A., Lachaux, J.A., Ceccaldi, H.J., 1985. Effets de régimes composés sur la croissance de homards juvéniles, *Homarus gammarus*: Estimation biochimique de la composition optimale du régime alimentaire en protéines. *Aquaculture* 46, 97-109.
- Lupatsch, I., Kissil, G.W., 1998. Predicting aquaculture waste from gilthead seabream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. *Aquat. Living Resour.* 11, 265-268.
- Lupatsch, I., Kissil, G.W., Sklan D., 2001. Optimization of feeding regimes for European sea bass *Dicentrarchus labrax*: a factorial approach. *Aquaculture* 202, 289-302.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Pereira-Branco, Z., Bianchini, A., Maia-Nery, L.E., 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295A, 200-205.
- Lygren, B., Hemre, G-I., 2001. Influence of dietary carbohydrate on antioxidant enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture International* 9, 421-427.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173, 502-511.

## -M-

- Maciel, F.E., Rosa, C.E., Santos, E.A., Monserrat, J.M., Nery, L.E.M., 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Can. J. Zoo.* 82, 1871-1877.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* 2, 91-104.
- 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.
- Marques, A., François, J.-M., Dhont, J., Bossier, P., and Sorgeloos, P. (2004) Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically grown *Artemia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 247-264.
- Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4307-4317.
- Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2006. Immunostimulatory nature of  $\beta$ -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish & Shellfish Immunol.* 20, 682-692.
- Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., Swings, J., 2005. Culture-dependent and culture independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain *bifidobacteria*, *Int. J. Food Microbiol.* 102, 211-230.



- Mastro, T.D., Spika, J.S., Lonzo, P., Appel, J., Facklam, R., 1990. Vancomycin-resistant *Pedococcus acidilactici*: nine cases of bacteremia, J. Infect. Dis. 161, 956-960.
- 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.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T., Simpson, K.L., 1982. Effect of short necked clams diet on shrimp growth and digestive enzyme activities. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 48, 1758-1764.
- Mäyrä-Mäkién A, Bigret M., 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Salminen S, von Wright A, eds. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, 65-95.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- Mermoud, I., Costa, R., Mari, J., Bonami, J.R., Hasson, K., Lightner D.V., 1998. Investigations of *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia, exploring a viral hypothesis. Aquaculture 164, 311-322.
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K., Menasveta, P., 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 220, 437-448.
- Miambi, E., Guyot, J.P., Ampe, F., 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology 82, 111-120.
- Mocquard, M.F., 1883. Recherches anatomiques sur l'estomac des crustacés podophthalmes. Annales Sci. Nat. 16, 1-311.
- Mombelli, B., Gismondo, M.R., 2000. The use of probiotics in medical practice. Int. J. Antimicrobial Agents 16, 531-536.
- Montes, R.G., T., Bayless, M., Saavedra, J. M., Perman, J.A., 1995. Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. J. Dairy Sci. 78, 1657-1664.
- Mopper, K., Kieber, D.J., 2000. Marine photochemistry and its impact on carbon cycling. In The effects of UV Radiation in the Marine Environment, ed. S de Mora, S Demers, M Vernet, pp. 101-130. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Moriarty, D.J.W., 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.), Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- 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, 125-131.
- 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., 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 187, 175-191.
- Moss, S.M., Pruder, G.D., Leber, K.M., Wyban, J.A., 1992. The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond water. Aquaculture 101, 229-239.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., 2002. Influence of moulting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 133B, 383-394.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., Sánchez-Paz, J.A., Yepiz-Plascencia, G., Peregrino-Uriarte, A.B., 2003. Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. B 135, 373-383.

- Muñoz, M., Cedeno, R., Rodriguez, J., Van der Knap, W.P.W., Mialhe, E., Bachere, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.
- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Bulet, P., Saulnier, D., Bachere, E., 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 961-972.
- Muyzer, G., De Wall, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Myers, R.M., Fischer S.G., Lerman L.S., Maniatis, T., 1985. Nearly all Singel Base Substitutions in DNA Fragments Joined to a GC-Clamp Can be Detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13, 3131-3145.

### -N-

- Neves, C.A., Santos, E.A., Baily, A.C.D., 2000. Reduced superoxyde dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis. Aquat. Org.* 39, 155-158.
- Niven, S.J., Beal, J.D., Brooks, P.H., 2006. The effect of controlled fermentation on the fate of synthetic lysine in liquid diets for pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, 304-315.
- Nüble, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178, 5336-5643.

### -O-

- Ochoa-Solano, J.L., Olmos-Soto, J., 2006. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23, 519-525.
- Ohnishi, S.T., Barr, J.K., 1978. A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagent. *Anal.Biochem.* 86, 193-200.
- Owuor, E.D., Kong, A.N. 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 64, 765-770.
- Oxley, A., Shipton, W., L. Owens<sup>1</sup> and D. McKay<sup>2</sup> 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J. Appl. Microbiol.* 93, 214-223.

### -P-

- Paquotte, P., Chim, L., Martin J.L.M., Lemos E., Stern M. and Tosta. G. 1998. Intensive culture of shrimp *Penaeus vannamei* in floating cages : zootechnical, economic and environmental aspects. *Aquaculture* 164, 151-166.
- Pascual, C., Arena, L., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Rosas, C., 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 230, 405-416.
- 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 & Shellfish Immunology, doi: 10.1016/j.fsi.2008.10.008.

### -R-

Rameshthangam, P., Ramasamy, P., 2006. Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture 254, 32-39.

Rapport université de Milan, 2007. Effects of the inclusion of BACTOCELL® in the diet of laying hens on production performances. Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety. Source Lallemand.

Reddy, P.S., 1997. Modulations in antioxidant enzymes in the gill and hepatopancreas of the edible crab *Scylla serrata* during exposure to cadmium and copper. Fresenius Envir. Bull. 6, 589-597.

Rees, J.F., Pirt, S.J., 1979. The stability of lactic acid production in resting suspensions of *Lactobacillus delbrueckii*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 29. 591-596.

Reid, G., 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Applied and Environmental Microbiology 65, 3763-3766.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 1998. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont *Bacillus* S11. Aquaculture 191, 271-288

Rengpipat, S., Wongtangprasert, N., Palaga, T., 2008. The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture Nutrition doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00594.x.

Reynaud, Y., 2004. Utilisation de bactéries probiotiques comme substituts aux antibiotiques, en élevage larvaire de crevette *Litopenaeus stylirostris*. Mémoire de DEA Océanologie Biologique et Environnement Marin Option Connaissance des Producteurs Primaires, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), pp. 34.

Reynaud, Y., 2008. Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez *Vibrio nigripulchritudo*, un pathogène de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie. Thèse présentée à l'Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, Ecole doctorale Ecole Doctorale B2M – Biochimie et Biologie Moléculaire. 222 pp.

Ribeiro, F.A.L.T., Jones, D.A., 2000. Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in *Fenneropenaeus indicus* postlarvae, Aquac. Nutr. 6, 53-64.

Riebel, W.J., Washington, J.A., Clinical and microbiologic characteristics of *Pediococci*. J. Clin. Microbiol. 28, 1348-1355.

Riesner, D., Steger, G., Wiese, U., Wulfert, M., Heibey, M., Henco, K., 1992. Temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and for quantitative polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 13, 632-636.

Ringø, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160, 177-203.

Ringø, E., Strøm, E., Tabachek, J.-A., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquacult. Res. 26, 773-789.

Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Ann. Rev. Microbiol. 56, 117-137.

Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture 172, 125-145.

Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2007. Double-stranded RNA and anti-viral immunity in marine shrimp: inducible host mechanism and evidence for the evolution of viral counter-responses, Dev. Comp. Immunol. 31, 539-547.

- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E.E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *J. Virol.* 79, 13561-13571.
- Robertson, P.A.W., Xu, H.S., Austin, B., 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. *J. Microbiol. Meth.* 34, 31-39.
- Rombaut, G., Uantika, G.S., Boon, N., 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture* 198, 237-252.
- 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., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A., Van Wormhoudt, A., 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259, 1-22.
- 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.
- Rosenberry, B., 2004. World Shrimp Farming 2004. *Shrimp News International*, San Diego, CA, USA, 276 p.

## -S-

- Sáenz de Rodrigáñez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2008. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x.
- 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, D.A. (Eds.), *Methods for the Biological Examination of Fish and Shellfish*. Ellis Horwood Ltd., West Sussex, England, pp. 141-163.
- Sakata, T., Taruno, N., 1987. Ecological studies on microflora of digestive tract of prawn *Penaeus japonicus*. *Suisan Yoshoku (Aquaculture)* 35, 147-151.
- Salminen, S., Bouley, M.C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., and Rowland, I., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr. Suppl.* 1, 147-171.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Marine Biol.* 340, 184-193.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F.L., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Saavedra N.Y., Yepiz-Plascencia, G., 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 292, 1-17.
- Sandifer, P.A., Hopkins, J.S., 1996. Conceptual design of a sustainable pond-based culture system. *Aquacultural Engineering* 15, 41-52.
- 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.

- Sarathi, M., Simon, M.C., Venkatesan, C., Sahul Hameed, A.S., 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect shrimp, *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus, Marine Biotechnology 10, 242-249.
- Sarma, P.S., Mohanty, S., 1998. *Pediococcus acidilactici* pneumonitis and bacteremia in a pregnant woman. J. Clin. Microbiol. 36, 2392-2393.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191, 133-144.
- Sedgwick, R.W., 1979. Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* De Man. Aquaculture 16, 279-298.
- Shakila, R.J., Saravanakumar, R., 2006. Antagonistic Activity of the Gut Microflora Isolated from Farmed Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Asian Fisheries Science 19, 247-255.
- Shiau, S.Y., 1997. Carbohydrates and fiber. In D'Abramo, L. R., D. E. Conklin, and D. M. Akiyama, editors. Crustacean nutrition. Baton Rouge, LA World Aquaculture Society. pp. 108-122.
- Shiau, S.Y., 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps, Aquaculture 164, 241-250
- Shiau, S.Y., Kwok, C.-C., Chou, B.-S., 1991. Optimal dietary protein level of *Penaeus monodon* reared in seawater and brackishwater. Nippon Suisan Gakkaishi 57, 711-716.
- Shiau, S.Y., Peng, C.-Y., 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. Aquaculture 101, 241-250.
- Sigler, W.V., Miniaci, C., Zeyer, J., 2004. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. J. Microbiol. Methods 57, 17-22.
- Sire, J.M., Donnio, P.Y., Mensard, R., Pouedras, P., Avril, J.L., 1992. Septicemia and hepatic abscess caused by *Pediococcus acidilactici*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 11, 623-625.
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., Ward, L., 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), Aquaculture 207, 125-136.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of in vivo digestibility of shrimp feeds. Aquaculture 232, 563-580.
- Smith, L.L., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility of three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: The effect of dietary protein level and protein sources. Aquaculture 46, 85-96.
- Snieszko, S.F., 1973. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J. Fish Biol. 6, 197-208.
- Soares Pontes, C., Pereira de Lima, P., De Fátima Arruda, M., 2008. Feeding responses of juvenile shrimp *Litopenaeu vannamei* (Boone) fed at different frequencies under laboratory conditions. Aquaculture Research 39, 1416-1422.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology 10, 23-28.
- Solé, M., Nasci, C., Livingstone, D.R., 2000. Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) from the Venice lagoon, Italy: responses of CYP1A-immunopositive protein and benzo[a]pyrene hydrolase activity. Biomarkers 5, 129-140.
- Soltanian, S., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007. Influence of different yeast cell wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. Fish & Shell. Immunol. 23, 141-153.
- Song, Y., Cheng, W., Wang, C., 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. J. Invertebr. Pathol. 61, 24-31.
- Sonnenburg, J.L., Chen, C.T.L., Gordon, J.I., 2006. Genomic and Metabolic Studies of the Impact of Probiotics on a Model Gut Symbiont and Host. PLoS Biol. 4, e413.
- Soomro, A., Masud, T., Anward, K., 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation and human health - a review. Pak. J. Nutr. 1, 20-24.
- Stadtman, E.R., 1986. Oxidation of proteins by mixed function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. Trends Biochem. 11, 11-12.

- Steinkraus, K.H., 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Stella, A.V., Fava, M., Bersani, C., Del Degan, G., Savoini, G., Chevaux, E., 2005. Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* dans la ration de poulets de chair sur les performances zootechniques et la microflore intestinale. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 208-211.
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70, 235-249.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.B., McGladdery, S.E., 2001. Aquaculture development, health and wealth, pp. 167-191. In: R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery and J.R. Arthur (Eds.) Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 Feb 2000. 471 p.
- 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., 1996. Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming systems. Aquaculture Nutrition 1, 165-174.
- 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, 121-137.
- Teshima, S., 1997. 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., 1997. Assessment of cholesterol requirements in the prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture Nutrition 3, 247-253.
- Tirasophon, W., Roshorm, Y., Panyim, S., 2005. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 102-107.
- Trellu, J., Ceccaldi, H.J., 1977. Circadian variations of some enzymatic activities in *Palaemon squilla* Linné (1758) (Crustacea, Decapoda). J. Interdiscip. Cycle Res. 8, 357-359.
- Trellu, J., Ceccaldi, H.J., 1976. Variation des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de *Palamon serratus* Pennant (Crustacé Décapode) au cours du cycle d'intermue. C.R. Séances Soc. Biol. 171, 115-121.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetakis, E., 1989. Biochemical activities of *Pediococcus pentosaceus* isolates of dairy origin. J. Dairy Sci. 72, 859-863.

### -U-

- Usache, V., Nguyen Thi Ngoc Tinh, Huynh Thi Hong Chau, Nguyen Thi Kim Van, Jun Xie., 2004. A novel approach for use of lactic acid bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5M as a probiotic feed additive in post larvae and juveniles of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. World Aquaculture Society Annual Conference, Hawaii, Poster.

### -V-

- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H.J., Martin, B.J., 1980. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hépatopancréas de *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda), à la composition d'aliments expérimentaux. Aquaculture 21, 63-78.
- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, J.H., Le Gal, Y., 1972. Activité des protéases et amylases chez *Penaeus kerathurus*: existence d'un rythme circadian. C. R. Acad. Sc. Paris D 274, 1208-1211.

- Van Wormhoudt, A., Cruz, E., Guillaume, J., Favrel, P., 1986. Action de l'inhibiteur trypsique de soja sur la croissance et l'activité des enzymes digestives chez *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda): rôle éventuel des hormones gastro-intestinales. *Oceanis* 12, 305-319.
- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M., 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Anim. Nutr.* 40, 543-567.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P. and Swings, J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2592-2597.
- Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245, 149-161.
- Venugopal, N.B.R.K., Ramesh, T.V.D.D., Reddy, D.S., Reddy, S.L.N., 1997. Effect of Cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab *Barytelphusa guerini*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 132-138.
- Vieira, Felipe do Nascimento, Fabiola Santiago Pedrotti, Celso Carlos Buglione Neto, José Luiz Pedreira Mourão, Elpidio Beltrame, Maurício Laterça Martins, Cristina Ramirez, Luis Alejandro Vinatea Arana, 2007. Lactic acid bacteria increase the survival of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography* 55, 251-255.
- Vogt, G., Storch, V., Quintio, E.T., Pascual, F.P., 1985. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48, 1-12.

## -W-

- Wabete, N., 2005. Etude écophysiological du métabolisme respiratoire et nutritionnelle chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris*. Application à la crevetteculture en Nouvelle Calédonie. Thèse présentée à l'Université Bordeaux 1, Ecole doctorale Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement. 173 pp.
- Wabete, N., Chim L., Lemaire P., Massabuau J-C., 2006. Growth Ration relationship in the shrimp *Litopenaeus stylirostris*: effect of feeding frequency on maintenance energy requirement and scope for growth. Book of Abstract WAS annual meeting AQUA 2006, May 9-13. Florence, Italy
- Wabete, N., Chim, L., Lemaire, P., Massabuau, J.C., 2008. Life on the edge: physiological problems in penaeid prawns *Litopenaeus stylirostris*, living on the low side of their thermopreferendum. *Marine Biology* 154, 403-412.
- Wang, F.I., Chen, J.C., 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 671-681.
- Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259-264.
- Weppe, M.; Bonami, J., Lightner, D., 1993. Demostracion de la altas cualidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN in: Escuela Superior Politécnica del Litoral (Eds.), Memorias I Congreso Ecuatoriano de acuicultura, Guayaquil, 229-232.
- 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.
- World health Organisation antimicrobial resistance fact sheet, 2002  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
- Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138, 267-279.

### -X-

- Xianghong, W., Huirong, L., Xiaohua, Z., Yun, L., Weishang, J., Huaishu, X., 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult Penaeid Shrimp (*Penaeus chinensis*). Journal of Ocean University of Singdao 30, 493-498.

### -Y-

- Yasuda, K., Kitao, T., 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture 19, 229–234.
- Yu, J., Hino, R., Hirano, R., Hirayama, K., 1998. Vitamin B12-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 54, 1873-1880.

### -Z-

- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. Aquaculture 268, 98-105.
- 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.
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M., 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 142, 301-308.
- Zhou, Z., Ding, Z., Huiyuan, L.V., 2007. Effects of Dietary Short-chain Fructooligosaccharides on Intestinal Microflora, Survival, and Growth Performance of Juvenile White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 38, 296-301.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252, 516-524.





## ANNEXES



## ANNEXE 1

### Informations complémentaires sur les différents cycles de mue chez les crevettes pénéides.

*La Prémue* est caractérisée par la mise en place sous la cuticule de 2 couches pré-exuviales puis par la dégradation progressive des anciennes strates. On reconnaît cinq stades de prémue :

- D 0 : l'épiderme se décolle et la taille des cellules épidermiques augmente,
- D 1 : des enzymes (chitinases et protéases) dégradent l'ancienne cuticule et l'épiderme secrète la nouvelle epicuticule,
- D 2 : la dégradation des anciennes couches continue, la couche pigmentaire se met en place,
- D 3 : la destruction des anciennes couches est achevée et la couche membraneuse est gélifiée ce qui facilitera le dégagement de l'animal de l'ancienne cuticule au moment de l'exuviation,
- D 4 : ouverture des fentes exuviales qui sont des lignes de moindre résistance de la cuticule, situées au niveau de la liaison céphalothorax-abdomen.

*L'exuviation.* Le céphalothorax bascule vers l'avant, tous les appendices avant se dégagent par mouvements péristaltiques et l'abdomen s'extrait de l'ancienne cuticule. Au cours de l'exuviation, la fine cuticule recouvrant le tube digestif antérieur et postérieur est renouvelée. Après la mue, l'exuvie est parfois réabsorbée (récupération du calcium) par l'animal une fois que les pièces buccales se sont recalcifiées. A l'exuviation, la cuticule est formée par les deux couches préexuviales non durcies, l'animal est donc mou, et la croissance peut intervenir à ce moment. Celle-ci s'accompagne d'une entrée massive d'eau, au niveau des branchies et de l'intestin, permettant une croissance rapide en taille et en poids. Cette eau sera par la suite remplacée par des tissus. Les transports d'eau sont passifs (phénomènes osmotiques) et sont préparés par des transports ioniques actifs (absorption de sodium) réalisés au niveau des branchies.

*La postmue.* L'eau absorbée au moment de l'exuviation est progressivement remplacée par des protéines. On reconnaît trois principaux stades :

- A : La cuticule est minéralisée par dépôt de sels de calcium.
- B 1-2 : La couche principale commence à être synthétisée, l'animal devient dur et la cuticule est cassante. Les pièces buccales sont recalcifiées, permettant la reprise de l'alimentation.
- C 1-2-3 : Fin de la synthèse de la couche principale et membraneuse. L'animal est entièrement calcifié (la couche calcifiée atteint son épaisseur définitive), il y a reconstitution des organes et des muscles.

*L'intermue* (stade C 4) est défini comme l'état de stabilité physiologique. Il y a accumulation de réserves dans les cellules adipeuses de la glande digestive, dans les muscles et les tissus adipeux. La durée de ce stade est très variable: minimale chez les larves, elle augmente avec la taille de l'animal.



## ANNEXE 2

| Experimental series                                                                                     | Objective                                                                                                                                                               | Experimental conditions                                                                                                                                              | Recorded variables                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication in peer reviewed journals                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Study of <i>P. acidilactici</i> administration and optimization for <i>L. stylirostris</i>           |       | Probiotic inclusion in the feed and stability under storage and after immersion in sea                                                                               | Outdoor tanks 500L<br><i>P. acidilactici</i> concentration in feed after several days of storage and following immersion in sea water                                                                                                                                                                                 | <b>Title</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Evaluation of two probiotic inclusion levels based on shrimps' survival and growth improvement under induced winter syndrome conditions                              | Outdoor tanks 500L - Shrimps' survival to induced winter syndrome - Weight gain - Thermo-regulated indoor tanks - Feed conversion ratio - Quantitative effects of <i>P. acidilactici</i> on the intestinal microflora                                                                                                 | <b>Article 1:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Evaluation of the dietary probiotic <i>P. acidilactici</i> at two levels on shrimp <i>L. stylirostris</i> survival following temperature drop at the low side of its thermopreferendum. <b>The Open Fish Science Journal</b>                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Follow up of the probiotic strain within the digestive tract of the shrimps                                                                                          | Outdoor tanks 500L<br><i>P. acidilactici</i> concentration at several levels of <i>L. stylirostris</i> digestive tract (CFU.g <sup>-1</sup> of organ) two hours after ingestion. Time of persistency in the gut and relative proportion of the probiotic strain density toward total and vibrio intestinal microflora |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Evaluation of the frequency of probiotic administration                                                                                                              | Outdoor tanks 500L<br>24 hours follow up of <i>P. acidilactici</i> concentration in the gut of <i>L. stylirostris</i> (CFU.g <sup>-1</sup> of organ) receiving 2, 4 or 6 probiotic supplemented meals a day                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | <i>P. acidilactici</i> effect on bacterial communities in the gut of the shrimp                                                                                      | Outdoor tanks 1600L - Floating rooms<br>DGGE gel analysis and identification of bacteria from the main DGGE bands                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 2. Evaluation of <i>P. acidilactici</i> effects in shrimp <i>L. stylirostris</i> : Experimental studies |     | Adaptation of the growth ration method to <i>L. stylirostris</i> - Individual measurements and nested design.                                                        | Outdoor tanks 500L<br>Individual growth (RGR) - ingested feed - FCR - Gross conversion efficiency (K1)- Net conversion efficiency (K2) - maintenance ration - optimal ration - Scope for growth.                                                                                                                      | <b>Article 2:</b> Chim, L., Castex, M, Wabete, N., Lemaire, N., Massabau, J.C. Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> by using individual measurements and nested design. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Evaluation of growth and nutritionnal effects of <i>P. acidilactici</i> in <i>L. stylirostris</i>                                                                    | Outdoor tanks 500L<br>Survival - Individual growth (RGR) -ingested feed - Gross conversion efficiency (K1)- Net conversion efficiency (K2) - maintenance ration - Optimal ration - Digestive enzyme activities - Free Glucose - glycogen content - Total Antioxidant Status                                           | <b>Article 3:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Mariojous, C., Chim, L. Study of probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> effects on shrimp growth parameters based on an individual growth and ration size method. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Evaluation of <i>P. acidilactici</i> effects on antioxidant defenses, oxidative stress and associated response to bacterial infection                                | Outdoor tanks 1600L -Infection rooms<br>Survival - <i>V. nigripulchritudo</i> prevalence and load in shrimps' haemolymph - Determination of antioxidant defenses and oxidative damages parameters                                                                                                                     | <b>Article 4:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of dietary probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress status in <i>Litopenaeus stylirostris</i> shrimp. <b>Submitted Aquaculture</b><br><br><b>Article 5:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of probiotic <i>P. acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress of <i>Litopenaeus stylirostris</i> under <i>Vibrio nigripulchritudo</i> challenge. <b>Submitted Fish and shellfish immunology</b> |
| 3. Pilot study: transfer of the results from the laboratory to pond conditions                          |   | Development of an experimental method for studies under pond conditions                                                                                              | Floating cages<br>Survival - Initial and final body weights - Weight gain - FCR - Statistical power - Sensitivity and required number of replicate for statistical power >80%                                                                                                                                         | <b>Article 6:</b> Chim, L., Castex, M., Pham, D., Brun, P., Lemaire, P., Wabete, N., Schmidely, P., Mariojous, C. Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. <b>Aquaculture 279, 63</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                         |                                                                                                                                                                         | Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> à l'aide de la méthode "cage flottante" sur une ferme d'élevage de Nouvelle Calédonie atteinte par le syndrome d'été | Floating cages<br>Survival - Initial and final body weights - Weight gain - FCR - Microflora density within the gut (Total flora,vibrios, <i>P. acidilactici</i> ) - <i>V. nigripulchritudo</i> prevalence and load in shrimps' haemolymph - Digestive enzymes activities                                             | <b>Article 7:</b> Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojous, C. Probiotic <i>P. acidilactici</i> application in shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> culture subject to vibriosis in New Caledonia. <b>Aquaculture 275, 182</b>                                                                                                                                                                                                                                                               |





1. Etude de l'administration de *P. acidilactici* et optimisation de son administration chez *L. stylirostris*



2. Evaluation des effets de *P. acidilactici* chez *L. stylirostris*: Etudes expérimentales



3. Etude pilote: transfert des résultats à l'échelle d'un bassin d'élevage



| Ensemble expérimental                                                                                                    | Objectif de l'étude                                                                                                                                                         | Dispositifs expérimentaux                                              | Variables mesurées                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Publications dans journaux à comité de lecture                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Etude de l'administration de <i>P. acidilactici</i> et optimisation de son administration chez <i>L. stylirostris</i> | Incorporation du probiotique dans l'aliment et suivi de sa stabilité                                                                                                        | Bacs expérimentaux de 500 L                                            | Concentration en <i>P. acidilactici</i> dans l'aliment après plusieurs jours de stockage et suite à l'immersion dans l'eau de mer                                                                                                                                                                                    | <p><b>Article 1:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Evaluation of the dietary probiotic <i>P. acidilactici</i> at two levels on shrimp <i>L. stylirostris</i> survival following temperature drop at the low side of its thermopreferendum. <b>The Open Fish Science Journal</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                          | Evaluation de deux doses d'administration sur des critères d'efficacité: survie et croissance en condition de syndrome d'hiver induit (IWS)                                 | Bacs expérimentaux extérieurs 500L - Bacs intérieurs thermorégulés     | Survie des crevettes suite à un syndrome d'hiver induit plus ou moins intense - Gain de poids - Indice de conversion - Effet de <i>P. acidilactici</i> sur les concentrations bactériennes intestinales.                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                                          | Suivi intestinal de la souche probiotique                                                                                                                                   | Bacs expérimentaux extérieurs 500L                                     | Concentration en <i>P. acidilactici</i> à différents niveaux du tractus intestinal de <i>L. stylirostris</i> (CFU.g <sup>-1</sup> d'organe) deux heures après la prise alimentaire. Temps de résidence et part relative par rapport à la microflore intestinale                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                                          | Evaluation de différentes fréquences d'administration                                                                                                                       | Bacs expérimentaux extérieurs 1600L                                    | Suivi de la concentration en <i>P. acidilactici</i> dans le tube digestif moyen et postérieur de <i>L. stylirostris</i> (CFU.g <sup>-1</sup> d'organe) sur 24 heures après 2, 4 ou 6 repas par jour.                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                                          | Effet de <i>P. acidilactici</i> sur les communautés bactériennes au sein du tractus intestinal de la crevette                                                               | Bacs expérimentaux 1600L - cages flottantes                            | Profil DGGE et identifications spécifiques                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 2. Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> chez <i>L. stylirostris</i> : Etudes expérimentales                   | Adaptation de la méthode "croissance ration" à la crevette pénéide. Utilisation de valeurs individuelles et d'un plan expérimental hiérarchique                             | Bacs expérimentaux extérieurs 500L                                     | Croissance individuelle (RGR) - quantité d'aliment ingéré - FCR - Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1)- Efficacité nette d'utilisation (K2) - ration d'entretien - ration optimale - Scope for growth.                                                                                                         | <b>Article 2:</b> Chim, L., Castex, M, Wabete, N., Lemaire, N., Massabuau, J.C. Growth as a function of ration size: application to penaeid shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> by using individual measurements and nested design. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                                                                                                                          | Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> sur la croissance et l'indice de conversion alimentaire                                                                     | Bacs expérimentaux extérieurs 500L                                     | Survie -Croissance individuelle (RGR) - Quantité d'aliment ingéré - Efficacité d'utilisation de l'aliment (K1)- Efficacité nette d'utilisation (K2) - Ration d'entretien - Ration optimale - Activité des enzymes digestives (trypsine et $\alpha$ amylase) - Glucose - Glycogène - Statut antioxydant total (TAS) - | <b>Article 3:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Mariojouis, C., Chim, L. Study of probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> effects on shrimp growth parameters based on an individual growth and ration size method. <b>Submitted Aquaculture Nutrition</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                          | Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> sur les défences anti-oxydantes, le stress oxydant et la réponse à une infection bactérienne par <i>V. nigripulchritudo</i> | Bacs expérimentaux extérieurs 1600L - Salles d'infection expérimentale | Survie - Prévalence et portage en <i>V. nigripulchritudo</i> dans l'hémolymphe des crevettes - Détermination de différents biomarqueurs des défenses anti-oxydantes et du stress oxydant.                                                                                                                            | <p><b>Article 4:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of dietary probiotic <i>Pediococcus acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress status in <i>Litopenaeus stylirostris</i> shrimp. <b>Submitted Aquaculture</b></p> <p><b>Article 5:</b> Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. Effect of probiotic <i>P. acidilactici</i> on antioxidant defences and oxidative stress of <i>Litopenaeus stylirostris</i> under <i>Vibrio nigripulchritudo</i> challenge. <b>Submitted Fish and shellfish immunology</b></p> |
| 3. Etude pilote: transfert des résultats à l'échelle d'un bassin d'élevage                                               | Développement d'une méthode expérimentale originale basée sur l'utilisation de cages flottantes immergées dans des bassins d'élevage                                        | Cages flottantes                                                       | Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Puissance statistique - Sensibilité et détermination du nombre de réplicats nécessaire pour une puissance statistique >80%                                                                                                                              | <b>Article 6:</b> Chim, L., Castex, M., Pham, D., Brun, P., Lemaire, P., Wabete, N., Schmidely, P., Mariojouis, C. Evaluation of floating cages as an experimental tool for marine shrimp culture studies under practical earthen pond conditions. <b>Aquaculture 279, 63–6.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                                                                                                          | Evaluation des effets de <i>P. acidilactici</i> à l'aide de la méthode "cage flottante" sur une ferme d'élevage de Nouvelle Calédonie atteinte par le syndrome d'été        | Cages flottantes                                                       | Survie - Poids initial - Poids final - Gain de poids - FCR - Concentration bactériennes intestinales (flore totale, flore vibriionacée, <i>P. acidilactici</i> ) - Prévalence et portage en <i>V. nigripulchritudo</i> dans l'hémolymphe des crevettes - Activité des enzymes digestives - Hepatosomatic index (HSI) | <b>Article 7:</b> Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, Ph., Mariojouis, C. Probiotic <i>P. acidilactici</i> application in shrimp <i>Litopenaeus stylirostris</i> culture subject to vibriosis in New Caledonia. <b>Aquaculture 275, 182–193.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                |







## **Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette pénéide *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie**

*Pediococcus acidilacticii* MA18/5M est un probiotique bactérien (BACTOCELL<sup>®</sup>) qui a démontré son efficacité chez plusieurs espèces d'animaux terrestres et aquatiques. Cette thèse avait pour objectif d'investiguer plus en détails les effets de ce probiotique chez les crevettes pénéides d'élevage. Pour cette étude, nous avons choisi une approche globale remplaçant la problématique dans un modèle d'interactions entre trois compartiments : la crevette, sa microflore intestinale et le probiotique. Après avoir défini les modalités d'administration, l'effet de *P. acidilactici* a été étudié, en conditions de laboratoire, chez la crevette *Litopenaeus stylirostris*, à différents niveaux: (i) statut nutritionnel et croissance, (ii) microflore bactérienne associée, et (iii) santé de l'animal à travers son statut antioxydant et son niveau de stress oxydant. Ainsi, le probiotique améliore la croissance des crevettes et l'indice de conversion de l'aliment. Notre étude montre que ces effets sont en partie liés à une meilleure utilisation de l'aliment, notamment des carbohydrates alimentaires, mais suggèrent aussi une action sur le métabolisme, et/ou sur la croissance *via* un apport de nutriments essentiels. D'autre part, bien que les communautés bactériennes intestinales semblent peu affectées, un effet d'antagonisme du probiotique vis à vis de la flore intestinale totale et vibrionacée a été montré, ainsi qu'une réduction du niveau d'infection des crevettes au cours de challenge avec le pathogène *V. nigripulchritudo*. Par ailleurs, nous mettons en évidence que l'infection par ce pathogène, conduit à un abaissement des défenses antioxydantes, à une élévation des dégâts oxydatifs, et au déclenchement de mortalités dans les 48 heures. Le probiotique atténue le niveau de ce stress oxydant, et améliore significativement la résistance des crevettes à l'infection. Une hypothèse nutritionnelle est proposée afin d'expliquer ce résultat, hypothèse reposant sur un lien entre le métabolisme des carbohydrates et le statut antioxydant. A l'issue de ces travaux, nous pouvons alors proposer un premier scénario explicatif des effets de *P. acidilactici* chez une crevette pénéide. Finalement le probiotique a été éprouvé à l'échelle pilote sur une ferme commerciale de Nouvelle-Calédonie affectée par le « syndrome d'été ». Nous confirmons les améliorations apportées en terme de résultats zootechniques, avec notamment une meilleure résistance au syndrome. Ce travail a été réalisé grâce une méthode d'élevage en cages flottantes, mis au point au cours de cette thèse, et qui a dès lors été transférée, comme outil expérimental, à la filière crevetteicole Calédonienne.

**Mots clés :** *Pediococcus acidilactici*, crevette, croissance, nutrition, microflore intestinale, stress oxydant, vibriose, cages flottantes.

## **Evaluation of probiotic bacteria *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia**

*P. acidilactici* MA 18/5M is a dietary probiotic (BACTOCELL<sup>®</sup>) which has shown its efficiency on several terrestrial and aquatic species. The present thesis aimed to investigate more fully the effects of this probiotic on cultured penaeid shrimps. For this study, we chose a global approach by replacing the problem studied in a model of interactions between three compartments: the shrimp, its intestinal microflora and the probiotic. Having first defined how the probiotic should be administrated, we studied its effects under controlled laboratory conditions at several levels of *Litopenaeus stylirostris* biology: (i) Nutritional status and growth, (ii) associated bacterial microflora, and (iii) health status with respect to oxidative stress. Then the probiotic improves the growth of the shrimps and the feed conversion ratio. Our study shows that these effects are partially due to a better use of the feed, particularly of dietary carbohydrates, but also suggest an action on the metabolism, and/or on the growth *via* a contribution of essential nutrients. On the other hand, although the intestinal bacterial communities seems little affected, we show an antagonism effect of the probiotic toward total and vibrionacea intestinal flora, as well as a decrease in the level of infection of shrimps during challenge with pathogenic *V. nigripulchritudo*. Beside, our works highlight that infection by this pathogen, led to a reduction in antioxidant defences, to a rise in oxidative damages, and to a release of mortalities within 48 hours. This oxidative stress following bacterial infection was better controlled by animals receiving the probiotic diet, and resistance of the shrimps to infection was significant improved. A nutritional hypothesis is proposed to explain such result, hypothesis based on a link between carbohydrate metabolism and antioxidant status. As a conclusion of these works, we can propose a first explanatory scenario for the effects of *P. acidilactici* on a penaeid shrimp. Finally probiotic's effects were assessed under a pilot scale in a commercial farm from New Caledonia currently affected by the "summer syndrome ". We confirm the improvements brought in term of zootechnical results, with in particular, a better resistance to this syndrome. This work was made possible thanks to a breeding method in floating cages, developed during this thesis, and therefore transferred, as an experimental tool, to the shrimp industry of New Caledonia.

**Key words :** *Pediococcus acidilactici*, shrimp, growth, nutrition, intestinal microflora, oxidative stress, vibriosis, floating cages