

RAPPORTS D'ACTIVITE

VAT

PHARMACOLOGIE

1988

Tests de cytotoxicité, de
phytotoxicité et de toxicité
sur œufs d'oursin

Application aux organismes
du programme S.M.I.B.

Olivier RIBES

RAPPORT D'ACTIVITÉ : DÉCEMBRE 1986 à MARS 1988

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

CRSTOM

Centre de Nouméa

RAPPORT D'ACTIVITÉS

VAT

PHARMACOLOGIE

1988

Tests de cytotoxicité, de
phytotoxicité et de toxicité
sur œufs d'oursin

Application aux organismes
du programme S.M.I.B.

Olivier RIBES

RAPPORT D'ACTIVITÉ : DÉCEMBRE 1986 à MARS 1988

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

ORSTOM

CENTRE DE NOUMEA

S C I E N C E S D E L A V I E

PHARMACOLOGIE

1 9 8 8

Tests de cytotoxicité, de phytotoxicité
et de toxicité sur oeufs d'oursin
Application aux organismes du
programme S.M.I.B.

RAPPORT D'ACTIVITE

Déc. 86 - Mars 88

Olivier RIBES

R E M E R C I E M E N T S

A Monsieur FAGES, Directeur du centre ORSTOM de Nouméa
pour m'avoir accueilli et permis de travailler au sein
du laboratoire de Pharmacologie du centre ORSTOM de Nouméa.

A Monsieur CAVÉ, Professeur de Pharmacognosie de la Faculté
de Pharmacie de Chatenay-Malabry et à Madame BOURRET, Chercheur
ORSTOM, pour m'avoir encouragé et aidé à intégrer cette équipe
de recherche.

Je remercie Dominique LAURENT et Cécile DEBITUS, chercheurs à l'ORSTOM pour leurs conseils et leur appui sans réserve dans mes travaux.

Je remercie Daniel DUHET, Ingénieur à l'ORSTOM, avec qui j'ai partagé les travaux menés sur les oeufs d'oursin.

Je remercie Josiane PATISSOU, assistante de recherche, pour son aide et son soutien tout au long de mon séjour.

Je remercie Antoine HOLUE pour la rapidité et la qualité de son travail.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de Phytopathologie pour son aide matérielle au cours de mes travaux.

R A P P O R T D ' A C T I V I T E

période de Décembre 1986 à Mars 1987

P L A N

	page
<u>I - Test de cytotoxicité sur cellules Kb</u>	
1 - Introduction	1
2 - Culture des cellules	1
3 - Principe du test	3
4 - Protocoles opératoires, réactifs et matériel utilisés	3
5 - Résultats expérimentaux	3
6 - Etudes complémentaires sur des organismes actifs	5
7 - Tests sur cellules Kb après dialyse	5
8 - Conclusion	11
<u>II - Test sur oeufs d'oursin</u>	
1 - Principe	19
2 - Matériel	19
3 - Réactifs	20
4 - Mode opératoire	20
5 - Fixation par le formol	24
6 - Résultats expérimentaux	30
7 - Conclusion	30
<u>III - Test herbicide sur amarante</u>	
1 - Principe	32
2 - Protocole opératoire	32
3 - Résultats expérimentaux	32
4 - Conclusion	35
<u>IV - Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux</u>	

TEST DE CYTOTOXICITE SUR CELLULES Kb

=====

1 - Introduction

L'étude de la cytotoxicité d'extraits d'organismes marins sur cellules Kb est réalisée dans le cadre du programme S.M.I.B. (Substances Marines d'Intérêt Biologique) en association avec Rhône-Poulenc Santé, Centre de Recherche de Vitry-sur-Seine (C.R.V.).

Les cellules Kb sont des cellules cancéreuses humaines provenant d'un carcinome épidermoïde de la bouche. Cultivées en lignée continue, elles sont largement employées dans les études sur la mutation et le métabolisme cellulaires, sur la chimiothérapie anticancéreuse, ainsi qu'en diagnostique virologique courant (susceptibles au polivirus de type 1 et à l'adénovirus de type 3) et pour le dépistage des virus causant des tumeurs.

2 - Culture des cellules

Après incubation à 37°C dans des milieux standards tels que le "Milieu Essentiel Minimum" (MEM) enrichi de sérum de veau foetal et en glutamine, les cellules Kb s'organisent en tissu de cellules polygonales serrées et forment un tapis monocellulaire confluent et adhérent donnant à la culture l'aspect caractéristique d'un épithélium pavimenteux formé de cellules "de type fibroblaste" (voir figure 1).

Après trypsination, les cellules mises en suspension (voir figure 2), peuvent être ainsi repiquées un grand nombre de fois d'une boîte de culture à une autre, pour reformer un tissu continu et adhérent.

Bien qu'exigeant des milieux stériles et des manipulations sous hotte à flux laminaire, afin de garantir les cultures de toute contamination externe, les cellules Kb sont faciles à manier du fait de leur adhérence et de leur croissance rapide.

.../...

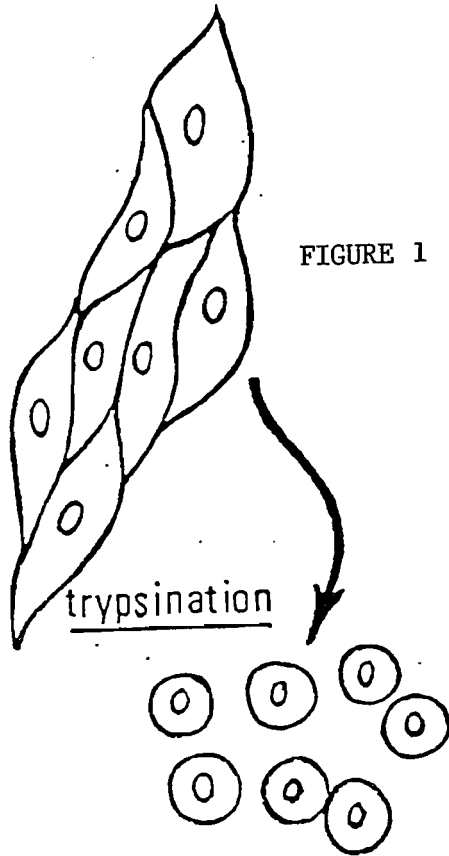


FIGURE 1

FIGURE 2

3 - Principe du test

Les tests sont effectués sur plaques de microtitration à 96 puits de 0,3 ml à fond plat. Après trypsination d'une culture, la suspension réalisée est ajustée à 100.000 cellules par millilitre, dans du milieu nutritif complet comprenant des antibiotiques et du sérum de veau foetal. Elle est ensuite répartie à raison de 0,2 ml par puits, avant d'être mise en contact avec l'extrait à tester.

Au bout de 48 heures d'incubation à 37°C, les cultures formées dans chaque cupule sont remises à incuber 24 heures après ajout de 25 µl d'une solution de rouge neutre à 0,02 % dans du tampon phosphate.

Pendant cette période, le rouge neutre colore spécifiquement les cellules survivantes. Après rinçage par du tampon phosphate, les tapis cellulaires sont dissouts par une solution de lauryl sulfate de sodium à 1 %.

Le rouge neutre ainsi libéré forme un composé d'addition avec le lauryl sulfate, mesurable par colorimétrie à 540 nm.

Les densités optiques enregistrées ont donc une valeur proportionnelle au nombre de cellules survivantes, au bout de 72 heures de contact avec le produit. La cytotoxicité est obtenue par calcul de la mortalité cellulaire par comparaison à un témoin correspondant à 100 % de cellules survivantes (0 % de cytotoxicité).

4 - Protocoles opératoires , réactifs et matériel utilisés

Voir de la page 12 à la page 18

5 - Résultats expérimentaux

132 organismes soit environ 400 extraits ont été testés entre Février 1987 et Mars 1988. La majeure partie des organismes étudiés est constituée par des éponges (41 %), par des ascidies (14 %) et par des madréporaires (10 %).

Le tableau N°3 résume les résultats obtenus par classes d'organismes. Sur les 132 organismes étudiés, 87 (66 %) sont inactifs à 10 µg/ml, 7 (5,3 %) ont une activité faible (entre 30 et 50 % de toxicité à 10 µg/ml), 15 (11,3 %) ont une forte activité (entre 50 et 80 % de toxicité), et 23 (17,4 %) ont une activité très forte (de 80 à 100 % de toxicité à 10 µg/ml). Parmi ces derniers, 4 ont conservé plus de 80 % de toxicité à 1 µg/ml.

TABLEAU N° 3

CYTOTOXICITE SUR CELLULES KB
programme SMIB

activite in vitro (10 ⁴ /ml)	organismes	superieure a 80%	entre 80% et 50%	entre 50% et 30%	inferieure a 30%	TOTAL
		+++	++	+	-	
eponges	1	1	2	8	12	
eponges profondes	11	6	2	23	42	
ascidies	5	5	0	9	19	
gorgones	2			4	6	
gorgones profondes				3	3	
alcyonaires				4	4	
alcyonaires profonds				3	3	
pennatulaires				1	1	
madreporaires		1		12	13	
zoanthaires	1				1	
antipathaires				1	1	
holothuries profondes			1	3	4	
etoiles profondes	2			2	4	
crinoides profonds				3	3	
oursins profonds				7	7	
bryozoaires		1		2	3	
mollusques			2	1	3	
algues	1	1			2	
ophiures profondes				1	1	
TOTAL	23	15	7	87	132	

6 - Etudes complémentaires sur des organismes actifs

33 organismes présentant une toxicité supérieure à 30 % sur cellules Kb à 10 ug/ml ont été retestés in vitro par M. Lavelle du département Biologie du Centre de Recherche de Vitry-sur-Seine (C.R.V.), sur une lignée de cellules P388 (néoplasme lymphoïde de la souris) ainsi que sur une lignée de cellules P388 résistantes à un antitumoral : la doxorubicine.

Les tableaux N°4 et 4 bis exposent les résultats par classes d'organismes.

Le tableau N°5 expose les résultats obtenus à Nouméa avec les cellules Kb et au C.R.V. avec les cellules P388, pour les organismes les plus actifs

Les résultats sur cellules P388 confirment en général l'activité constatée sur cellules Kb. D'autres essais en cours au C.R.V. consistent à tester les extraits in vivo, par administration pendant plusieurs semaines du produit à des souris porteuses de la leucémie P388 afin de mettre en évidence un effet curatif ou protecteur (évolution pondérale et nombre de souris survivantes). Seuls les organismes présentant une activité positive in vivo sont retenus pour des analyses ultérieures.

7 - Tests sur cellules Kb après dialyse

8 extraits aqueux (ou extraits "A") d'organismes présentant une forte toxicité sur cellules Kb (plus de 80 %, sauf pour 1 éponge) ont été dialysés à 3500 de poids moléculaire, afin de pouvoir situer la toxicité soit dans la fraction macromoléculaire (poids moléculaires supérieurs à 3500 ou "dialysé" soit dans la fraction micromoléculaire (poids moléculaire inférieur à 3500 ou "dialysat").

Le tableau N°6 permet de comparer les résultats obtenus sur les fractions macromoléculaires ("dialysé") et micromoléculaires ("dialysat") avec ceux de l'extrait "A" total correspondant. En général l'activité reste dans la fraction macromoléculaire sauf pour une ascidie (UA 268) où l'activité se situe également dans la fraction micromoléculaire (poids moléculaires inférieurs à 3500). D'autre part, il faut noter la disparition totale de la toxicité de l'éponge R1409 A après dialyse.

TABLEAU N° 4

CYTOTOXICITE IN VITRO SUR LEUCEMIE P388
programme SMIB

fg/ml = ug/ml

activite in vitro	superieure a 80% à 1 fg/ml	superieure a 80% à 10 fg/ml	inferieure a 80% à 10 fg/ml	TOTAL
organismes				
éponges	1	11	7	19
ascidies	1	3	4	8
zoanthaires	1			1
bryozoaires			1	1
mollusques			2	2
algues		1	1	2
TOTAL	3	15	15	33

Résultats Rhône-Poulenc Santé / C.R.V.

TABLEAU N° 4 bis

CYTOTOXICITE IN VITRO SUR LEUCEMIE P388/DOXORUBICINE (21 organismes)
programme SMIB

fg/ml \approx 10^{-1} ug/ml

activite in vitro	superieure à 80% à 1 fg/ml	superieure à 80% à 10 fg/ml	inferieure à 80% à 10 fg/ml	TOTAL
organismes				
eponges		3	7	10
ascidies		1	5	6
zoanthaires	1			1
mollusques			2	2
algues			2	2
TOTAL	1	4	16	21

Résultats Rhône-Poulenc Santé / C.R.V..

TABLEAU N° 5

% de cytotoxicité in vitro sur cellules Kb, sur cellules P388
et P388 résistantes à la doxorubicine

N° SMIB	Kb		P 388			P 388 / DOXORUBICINE		
	10	1	10	1	0,1	10	1	0,1
<u>Eponges</u>								
R 1375 C	93		80					
R 1363 C	43,5		80					
R 1385 C	98		80					
R 1387 B	59		82					
R 1383 C	75		100	0	19	20	24	0
R 1395 B	61		100	0	0	14	0	20
R 1399 C	64		100	11	18	46	36	14
R 1401 C	93		64	32	13	74	32	24
R 1402 C	62		100	12	--	13	11	--
R 1407 A	80		53	0	0	69	0	6
C	100	100	93	58	0	100	73	5
R 1391 C	100	33	91	0	0	96	23	22
R 1409 A	100	0	7	0	0			
R 1408 A	100	0	100	0	0			
C	100	100	100	100	0			
R 1388 C	50		0	0	0	33	6	23
R 1410 C	100	0	34					
<u>Ascidies</u>								
UA 120 C	45		100					
UA 269 C	61		97	0	0	14	12	22
UA 268 A	63		97	66	0	35	15	16
B	32		90	0	0	19	14	13
C	100	93	99	100	94	100	18	20
UA 284 C	100	0	87	0	0			
<u>Algues</u>								
Al 398 C	80		84	3	0	25	25	19
Al 401 C	50		0	0	0	16	18	16

TABLEAU N° 5 (suite)

N° SMIB \ ug/ml	Kb		P 388			P 388 / DOXORUBICINE		
	10	1	10	1	0,1	10	1	0,1
<u>Zoanthaire</u>								
HZ 2 A	100	100	100	99	0	100	97	9
B	100	23	100	0	0	95	14	21
C	100	100	89	0	0	0	12	27
<u>Organismes non testés par RP Santé</u>								
<u>Eponges</u>								
R 1411 C	55							
R 321 C	78							
<u>Ascidies</u>								
UA 288 A	100	0						
UA 101 C	100	30						
<u>Gorgones</u>								
HG 106 A	100	50						
C	100	5						
HG 122 C	82	10						
<u>Madréporaire</u>								
HS 200 A	70							
<u>Etoiles de mer</u>								
EA 13 acétone	100							
EA 17 acétone	90							

Cellules P388 : résultats RP Santé / C.R.V.

TABLEAU N° 6

% DE TOXICITE SUR kb DES FRACTIONS MACRO ET MICRO MOLECULAIRES D'EXTRAITS A

Classe et N° SMIB	EXTRAIT "A" TOTAL		MACRO ou "DIALYSE"		MICRO ou "DIALYSAT"	
	10 ug/ml	1 ug/ml	10 ug/ml	1 ug/ml	10 ug/ml	1 ug/ml
<u>Eponges</u>						
R 1407	80	10	74	0	0	0
R 1408	100	0	100	0	0	0
R 1409	100	0	0	0	0	0
R 165	60	—	31	0	0	0
<u>Zoanthaire</u>						
HZ 2	100	100	100	100	0	0
<u>Ascidies</u>						
UA 288	100	0	100	0	0	0
UA 268	63	—	50	0	65	16
<u>Gorgone</u>						
HG 106	100	50	100	96	0	0

8 - Conclusion

Le test sur cellules Kb est facile à mettre en oeuvre, nécessite relativement peu de moyens et est assez rapide (3 jours d'incubation). Les résultats obtenus au C.R.V. sur un autre type de cellules cancéreuses ont confirmé en général les activités constatées sur cellules Kb et démontrent l'interêt de l'étude de deux grandes classes d'organismes du lagon calédonien : Les éponges et les ascidies.

L'action cytotoxique constatée sur cellules Kb peut être due à une simple agression chimique des membranes cellulaires (effet cytotoxique non spécifique) ou bien à une action spécifiquement antitumorale apparaissant après ingestion et métabolisation de la molécule responsable de l'activité.

Par conséquent le test tel qu'il est mené, donne une information sur le niveau de toxicité de l'extrait (relation dose-effet) mais ne permet pas d'apprécier le mode d'action particulier du produit responsable de l'effet constaté.

C'est pourquoi, cette action toxique peut être précisée par un test sur embryons d'oursin, décrit par M. le Professeur N.KOBAYASHI de l'université de Kyoto. (voir page 19)

PROCOLES OPERATOIRES

TEST DE CYTOTOXICITE SUR CELLULES KB

I - PREPARATION DES DIFFERENTS MILIEUX ET SOLUTIONS

- . Préparation des B.C.C. (Bouillon-Coeur-Cervelle) utilisés pour contrôler la stérilité.

- peser et dissoudre 37 g de poudre lyophilisée dans 1 litre d'eau stérile
- répartir la solution en tubes à raison de 10 ml par tube
- stériliser 20 minutes à 120°C à l'autoclave
- contrôler la stérilité par un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°C, puis les stocker au réfrigérateur.

- . Préparation du mélange d'antibiotiques 100XC

- Pour 50 ml de mélange :
- 1 flacon de pénicilline 500.000 UI/streptomycine 0,5 g
 - 1 flacon de kanamycine (4 ml) dosé à 1 gramme
 - eau distillée stérile qsq 50 ml
 - suspension de fungizone 50 mg (amphotéricine B) à 5 mg/ml : 2,5 ml

- Concentrations finales (100XC) :
- Penicilline : 10.000 UI
 - Stretomycine : 10 mg/ml
 - Kanamycine : 20 mg/ml
 - Fungizone : 250 µg/ml

- . Préparation des milieux et des réactifs

1/ Solution de trypsine :

Ajouter à 90 ml d'EDTA 1/5.000 commercial (Versène, bioMérieux) 10 ml de trypsine à 2,5 % 10XC commerciale.
Conserver à 4°C, chauffer à 37°C pour emploi.

2/ Solution de glutamine :

Ajouter 10 ml d'eau distillée stérile dans un flacon de glutamine lyophilisée bioMérieux (concentration : 200 m Mole/l).
Répartir en tubes de 1 ml ou de 2 ml.
Conserver au réfrigérateur (4°C).

.../...

3/ Milieu de croissance :

Pour 500 ml de milieu : - eau distillée stérile 430 ml
- milieu MEM 10XC commercial bioMérieux 50 ml
- bicarbonate de sodium à 5,6 % bioMérieux 15 ml
- tampon HEPES commercial bioMérieux 10 ml

Répartir en flacons de 100 ou 200 ml stériles. Contrôler la stérilité en inoculant une goutte de milieu dans un tube de BCC, ou stocker 24 heures à 37°C.

4/ Milieu complet :

Pour 100 ml de milieu : - milieu de croissance 88 ml
- solution de glutamine 1 ml
- solution d'antibiotiques 1 ml
- sérum de veau foetal (Eurobio) 10 ml

Milieu de croissance et milieu complet : à conserver à 4°C. Contrôler la stérilité du milieu complet comme pour le milieu de croissance.

5/ Solution de rouge neutre à 1 % :

- rouge neutre 1 gramme
- éthanol à 50 % 100 ml

Filtrer sur millipore 0.22 µm.

A préparer extemporanément : Solution à 0,02 %

- solution à 1 % 0,2 ml
- tampon HEPES bioMérieux 0,2 ml
- PBS commercial bioMérieux 9,6 ml

Filtrer sur millipore 0.22 µm pour emploi.

6/ PBS (phosphate buffered saline - pH 7,2) commercial bioMérieux :

Diluer 1 dose dans 1 litre d'eau distillée stérile.

7/ Solution de Lauryl sulfate de sodium à 1 % :

Diluer au 1/4 la solution de MERCRYL LAURYLE commerciale dans de l'eau distillée.

.../...

II - PROTOCOLE D'ENTRETIEN DES CULTURES (boîte de 75 cm²)

. Manipuler sous hotte à flux laminaire

- 1/ Elimination du milieu de la boîte. Rincer par 10 ml de tampon phosphate (PBS), éliminer le PBS.
- 2/ Rincer avec 4 ml de d'EDTA 1/5.000 (Versène) commercial.*
Laisser en contact 1 minute puis éliminer.
- 3/ Trypsiner par 4 ml de la solution de trypsine.*
Laisser en contact 1 minute.
- 4/ Eliminer la solution de trypsine sans égoutter.
- 5/ Mettre la boîte à l'étuve à 37°C pendant 10 ou 15 minutes jusqu'au décollement du tapis cellulaire.
- 6/ Ajouter 10 ml de milieu complet puis homogénéiser à la pipette.
- 7/ Dans une boîte de 75 cm², introduire 10 ml de milieu complet puis 2 ml de suspension cellulaire.
- 8/ Laisser 24 heures à 37°C.
- 9/ Vider le milieu de la boîte et remplacer par 10 ml de milieu complet neuf.
- 10/ Mettre à l'étuve à 37°C jusqu'à confluence.

* Amené(e) à 37°C au bain-marie.

III - TESTS SUR MICROPLAQUES A 96 PUIITS

. Manipuler sous hotte à flux laminaire

Trypsination et préparation des plaques :

- 1/ Elimination du milieu de la boîte. Rincer par 10 ml de tampon phosphate (PBS) éliminer le PBS.
- 2/ Rincer avec 4 ml d'EDTA 1/5.000 (Versène) commercial.*
Laisser en contact 1 minute puis éliminer.
- 3/ Trypsiner par 4 ml de la solution de trypsine.*
Laisser en contact 1 minute.
- 4/ Eliminer la solution de trypsine sans égoutter.
- 5/ Mettre la boîte à l'étuve à 37°C pendant 10 ou 15 minutes jusqu'au décollement du tapis cellulaire.
- 6/ Ajouter 10 ml de milieu complet puis homogénéiser à la pipette. Procéder au repiquage comme décrit précédemment (page 3).
- 7/ Effectuer un comptage sur cellule de Malassez.
Diluer dans du milieu complet pour avoir 100.000 cellules par ml.
- 8/ Sur plaques à 96 puits (stériles), introduire dans chaque cupule 200 ul de la suspension cellulaire.
- 9/ Introduire ensuite 20 ul de la solution à tester.
- 10/ Réaliser un Blanc ** et un Témoin.***
- 11/ Incubation 48 heures à 37°C.
- 12/ Ajouter dans chaque cupule 25 ul de rouge neutre à 0,02 %.
- 13/ Incubation 24 heures à 37°C.

Révélation :

- 14/ Eliminer le milieu.
- 15/ Rincer deux fois par 100 ul de PBS commercial pour éliminer les traces de rouge neutre.
- 16/ Ajouter dans chaque cupule, 150 ul de Solution de lauryle sulfate de sodium à 1 %.
- 17/ Agiter et éviter la présence de bulle.
- 18/ Effectuer la lecture des DO à 540 nm.
- 19/ Calculer le % de cellules vivantes par rapport au témoin.

* Amené(e) à 37°C au bain-marie.

** 200 ul de milieu complet sans cellule.

*** 200 ul de suspension cellulaire + 10 ul du solvant de l'extrait testé.

IV - PREPARATION DES EXTRAITS ET REPARTITION

Extraits A et B : Peser 5 mg d'extrait dans un flacon stérile, muni d'un bouchon à vis, les dissoudre dans 5 ml d'eau distillée stérile. On obtient une solution à 1.000 µg/ml (α).
 Diluer au 1/10 ème cette solution dans un flacon stérile de 5 ml, muni d'un bouchon à vis. On obtient la solution à tester (100 µg/ml).

Extrait C : Peser 5 mg d'extrait dans un flacon stérile, muni d'un bouchon à vis ; ajouter 5 ml d'eau distillée stérile puis disperser au Sonificateur Ultrason afin d'obtenir une très fine suspension de l'extrait dans l'eau. Diluer au 1/10 ème comme précédemment.
 Si la dispersion de l'extrait s'effectue mal, amorcer sa dissolution par agitation dans 0,5 ml d'éthanol absolu, compléter à 5 ml avec de l'eau distillée stérile puis disperser au sonificateur comme précédemment.

Répartition-type des extraits

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Témoin	Témoin	Org 1 A	Org 1 B	Org 1 C	Org 2 A	Org 2 B	Org 2 C	Org 3 A	Org 3 B	Org 3 C
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Blanc : 200 µl de milieu complet sans cellule + 20 µl d'eau distillée stérile.

Témoin : 200 µl de suspension cellulaire à 100.000 cellules/ml + 20 µl d'eau distillée stérile.

Colonne 4 : 200 µl de suspension cellulaire à 100.000 cellules/ml + 20 µl de solution à tester de l'organisme 1, extrait A (concentration finale : environ 10 µg/ml).

REACTIFS ET MATERIEL UTILISES

=====

1 - Réactifs

a) réactifs bioMérieux stériles

MEM 10XC sans bicarbonate	réf. 82202
EDTA (versenate de sodium) à 1/5.000	réf. 89681
Bicarbonate de sodium à 5,6 %	réf. 89511
Tampon Hépès	réf. 89661
Trypsine à 2,5 %	réf. 89651
Glutamine à 200 mmol/l	réf. 89531
PBS (tampon phosphate)	réf. 75511

b) réactifs EUROBIO

Sérum veau foetal	réf. SER VF 010
-------------------	-----------------

c) antibiotiques

Penicilline 500.000 UI/Streptomycine 0,5 g Spécia	
Fungizone (amphotéricine B) EUROBIO	réf. FUN 3000

d) divers

Rouge neutre EUROBIO	réf. ALR 2300
Mercryl Laurylé (Mercurbutol) LABAZ.	

2 - Matériel

- . Hotte à flux laminaire "EUROPE" Bioblock
- . Plaques de microtitration à 96 puits de 0,3 ml à fond plat COSTAR stériles, réf. 3596
- . Pipettes de 5 ml et de 10 ml stériles, sous emballage unitaire bioMérieux réf. 97528 et 97551
- . Pipettes de 1 ml stériles, sous emballage unitaire Falcon réf. 7520
- . Boîtes de culture Falcon 75 cm², réf. 3024 F
- . Boîtes de culture Falcon 25 cm², réf. 3013 F
- . Tubes stériles Falcon, réf. 2027
- . Eppendorf Combitips stériles de 0,5 ml sous emballage unitaire
- . Eppendorf Multipipette 4780
- . Pipette à 8 canaux Titertek 5-50 µl
- . Pipette à 8 canaux Titertek 50-200 µl
- . Embouts pour pipette à 8 canaux Titertek
- . Réservoirs à réactifs pour pipettes à 12 canaux Titertek
- . Filtre Millex-GS Millipore 0,22 µm
- . Cellules de Malassez (hématimètre) 0,2 mm
- . Microscope inversé Wilovert (r) WILL
- . Seringue 20 ml stériles sous emballage unitaire LUER

TEST SUR OEUF S D'OURSIN

1) Principe

Ce test consiste à mesurer le rendement des trois stades critiques du développement de l'embryon d'ourşin de l'espèce: Echinometra mathaei, en présence du produit à étudier.

Ces trois stades sont : la fertilisation de l'oeuf, sa première division et la différenciation cellulaire jusqu'aux stades "gastrula" (24 heures) et "pluteus" (48 heures). Voir ANNEXE 1.

L'introduction dans le milieu de substances à potentialités pharmacologiques permet de mettre en évidence trois effets :

- 1) Un effet cytotoxique sur les membranes cellulaires : non formation de la membrane de fertilisation sur les ovules, après contact avec les spermatozoïdes (toxicité sur la fertilisation).
- 2) Un effet spécifiquement antimitotique : blocage des oeufs en première division.
- 3) Des effets embryotoxiques et tératogènes à long terme : apparition de stades anormaux ou de retards dans le développement de l'embryon aux stades "gastrula" et "pluteus".

2) Matériel

- Microscope muni d'une optique X10 et d'un oculaire X10
- Seringue de 0.5 ou 1 ml.

- Béchers de 400 ml. environ.
- Cupules de verre de 5 ml. (environ 35 mm. de diam. et 10 mm. de prof.).
- 1 compte gouttes et une pipette Pasteur.
- Tubes à essais de 5 ml. environ.
- Compte-cellules

3) Reactifs

- Chlorhydrate d'acétylcholine pur.
- Formaldéhyde pur.
- Eau de mer.

IMPORTANT : Le matériel doit être propre. A défaut de verre, le plastique peut être utilisé. Il faut éviter toute contamination du matériel et des réactifs (à l'exception du formaldéhyde) par des métaux ou des sels de métaux qui perturberaient la fertilisation et le développement des oeufs.

4) Mode opératoire

4-1) Obtention des oeufs et du sperme

- Disposer une demi -douzaine de bechers de 400 ml. environ remplis d'eau de mer à ras bord.

- Prendre une demi -douzaine d'oursins de l'espèce Echinometra mathaei et les disposer sur l'ouverture des béchers, bouche ou péristome tourné vers le haut, de telle manière à ce que l'eau de mer affleure l'anus et les pores génitaux situés sur le pôle supérieur ou pôle aboral de l'animal.

- Pour chaque oursin, sur la face orale tournée vers le haut, injecter dans le péristome (partie molle entourant la bouche) 0.5 ml. d'une solution d'acétylcholine à 0,1 Molaire pour provoquer la ponte ou l'éjaculation. Attendre quelques minutes en maintenant l'oursin sur l'ouverture du bécher pour que l'eau de mer reste en contact avec les pores génitaux.

- Le sperme sort sous forme de filaments fins et blancs.

- Les oeufs sortent sous la forme de masses granuleuses orange qui s'accumulent au fond du bécher.

IMPORTANT : Il est indispensable d'utiliser des oursins pendant leur période de fécondation, au maximum de leur maturité sexuelle et avant la ponte (fin décembre à février - mars pour Echinometra mathaei en Nouvelle-Calédonie). Il faut également utiliser les oursins dans les 24 ou 48 heures, au maximum, qui suivent la récolte.

- Conserver les oeufs produits dans un peu d'eau de mer (quelques heures au maximum au réfrigérateur).

- Retenir un oursin mâle et éliminer l'eau de mer contenant le sperme, en évitant tout contact avec les oeufs.

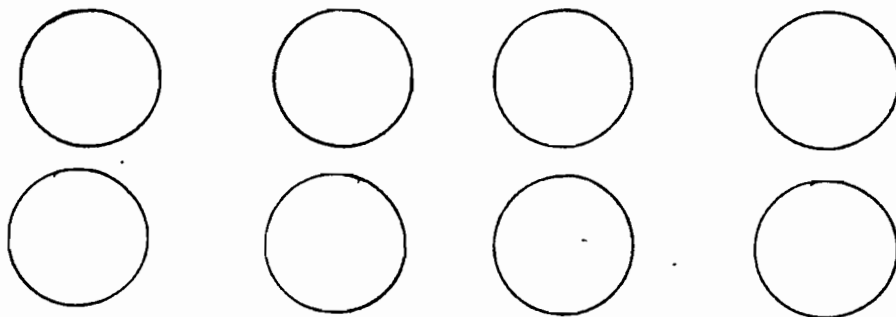
- Sur l'oursin mâle : découper aux ciseaux le péristome et retirer la bouche. A partir du péristome, découper le test en se dirigeant vers le pôle génital pour mettre à nu les gonades et les intestins. Ceux ci se présentent sous forme d'une masse noire allongée à laquelle sont accrochées les gonades (masses blanches granuleuses).

- A l'aide de pinces à dissection, bien séparer les gonades des intestins et les conserver dans une cupule en verre au réfrigérateur (1 ou 2 jours au maximum).

4 - 2) Mise en place des cupules

- Disposer deux rangées de cupules en verre de 5 ml munies de couvercles et les remplir avec 2 ou 3 ml d'eau de mer contenant le produit à étudier, aux différentes concentrations à tester.

- Disposer deux cupules Témoin remplies avec de l'eau de mer sans le produit.



Témoin concentration 1 concentration 2 concentration 3

- Triturer quelques milligrammes de gonade mâle dans un peu d'eau de mer afin d'obtenir une suspension de spermatozoïdes.

- A l'aide du compte gouttes, disposer dans chaque cupule une ou deux gouttes

de la suspension d'oeufs prélevés au fond des béchers.

- Ajouter ensuite dans chaque cupule une goutte de la suspension de spermatozoïdes, remuer doucement pour homogénéiser, puis rajouter encore une goutte et homogénéiser à nouveau; Départ du test.

4 - 3) Observation et Interpretation

4-3-1) La fertilisation

Environ 3 minutes après la mise en contact des oeufs et des spermatozoïdes, vérifier au microscope, dans les cupules Témoin, l'apparition de la membrane de fertilisation autour des oeufs (ANNEXE I).

A l'aide du compte-cellules, calculer le taux de fertilisation (nombre d'oeufs fertilisés / nombre total d'oeufs comptés), ce taux doit être supérieur ou égal à 90%.

Répéter cette opération pour chaque cupule correspondant aux différentes concentrations testées et reporter les valeurs des taux de fertilisation.

Pour une concentration donnée, si le taux calculé est voisin de celui du Témoin, le produit n'exerce pas d'action toxique sur la fertilisation.

Effets toxiques

si le produit a un effet toxique sur les oeufs et pour une dose donnée, on peut voir:

- Une cytolysse plus ou moins massive des oeufs.
- Un taux de fertilisation très bas (inférieur à 10%).

Dans le cas d'un effet toxique inhibant ou détruisant presque tous les oeufs (à plus de 90%), et à toutes les concentrations, il est inutile de poursuivre le test.

4-3-2) Le premier clivage

Dans les conditions de températures du laboratoire de Nouméa (25 à 30°C) et pour l'espèce utilisée, le premier clivage apparaît généralement une heure environ après la fertilisation.

Selon les conditions et l'espèce utilisée, ce temps peut être très variable (ANNEXE I).

Comme pour la fertilisation, il convient de commencer par calculer le % de premier clivage dans les cupules Témoin (nombre d'oeufs en première division/ nombre total d'oeufs observés) puis de le calculer dans les autres cupules. Pour le Témoin, ce taux doit avoisiner le taux de fertilisation.

Effets toxiques

- % de premier clivage très faible ou nul : met en évidence une action toxique sur la première mitose.
- Blocage des oeufs en première division : caractérise un effet antimitotique.
- Polyspermie (ANNEXE II) : ce phénomène peut également apparaître si les oeufs sont trop mûres ou s'ils ont été conservés trop longtemps dans de mauvaises conditions de température.

Note : ces effets sont facilement interprétables si le % de fertilisation au départ est suffisamment élevé ou voisin du Témoin.

4-3-3) Toxicité sur le développement de l'embryon

L'observation des cupules après 24 et 48 heures de développement permet par comparaison avec le Témoin, de mettre en évidence des retards ou des malformations des embryons mis en contact avec le produit étudié.

Observation à 24 heures

Dans les conditions décrites, les embryons sont généralement au stade Gastrula (ANNEXE I) avec formation des spicules.

Les effets toxiques observés peuvent être :

- Une cytolysse massive
- Des troubles de la gastrulation :

. Un blocage au stade Blastula ("Permanent Blastula") ou "animalisation" (ANNEXE I).

. Une exvagination du tissu correspondant à l'endoderme : "Exogastrula" ou "Végétalisation" (ANNEXE II).

Observation à 48 heures

Les embryons sont alors au stade Pluteus (ANNEXE I) avec des spicules et un tractus digestif bien développés et caractéristiques.

Les larves ainsi formées doivent être mobiles.

Les effets toxiques observés sont des retards dans le développement et notamment des spicules peu développées ou des larves immobiles.

5) Fixation par le formol

La numération des oeufs fertilisés et des oeufs en première division doit être faite assez rapidement, dans les premières minutes du test, avant qu'apparaisse la deuxième division (4 cellules).

Il est possible de fixer les oeufs par le formol, aux temps précis correspondant à ces deux stades, afin de faire un comptage ultérieur plus précis.

Note : Le formol étant un fixateur très puissant, il est nécessaire d'éviter toute contamination de l'air ambiant entourant les cupules.

5-1) Calcul du % de fertilisation

Pour chaque cupule, trois minutes après la mise en contact spermatozoïdes-oeufs :

- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire, une quantité suffisante d'oeufs (environ la moitié) et la verser dans un tube à essai où on aura introduit préalablement une ^{goutte} de formol pur. La pipette Pasteur ne doit en aucun cas entrer en contact avec la paroi du tube à essai (contamination par le formol). Les tubes contenant le formol doivent être maintenus à l'écart des cupules.

- Pour chaque tube : déposer en traits la suspension des oeufs fixés sur une plaquette verre et procéder

au comptage sur microscope.

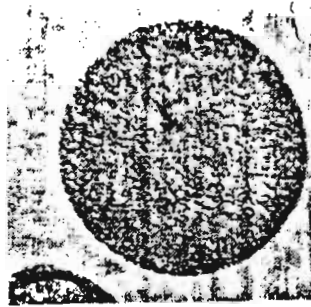
5-2) Calcul du % de première division

Dès que la première division apparaît dans les cupules Témoin, procéder comme précédemment, avec un nouveau jeu de tubes, en laissant à chaque fois une quantité suffisante d'oeufs dans les cupules pour les observations ultérieures.

Fertilisation et Développement

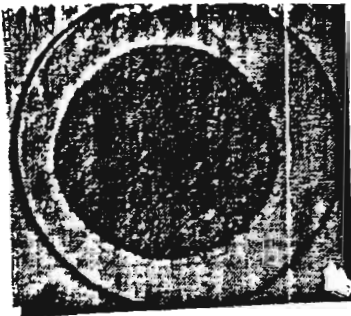
Oeufs non fertilisés

Anthocidaris Crassispina (28°C)

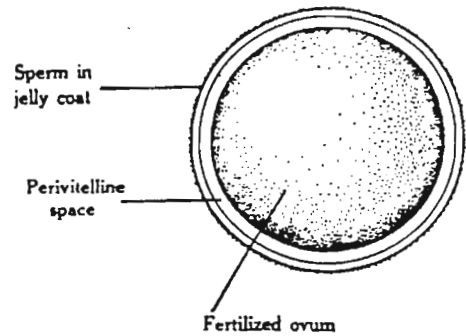


Oeufs fertilisés: Formation de la membrane de fertilisation 3 minutes apres insémination

Anthocidaris Crassispina (28°C)



Héliocidaris Herytrogramma (25°C)



Premier clivage

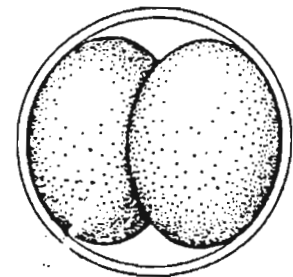
Anthocidaris Crassispina (28°C)

à 45 minutes



Héliocidaris Herytrogramma (25°C)

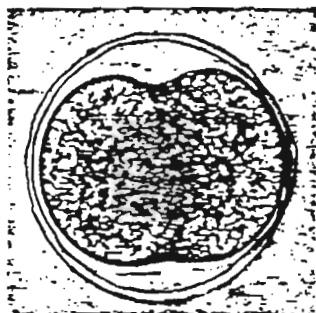
à 1 heure



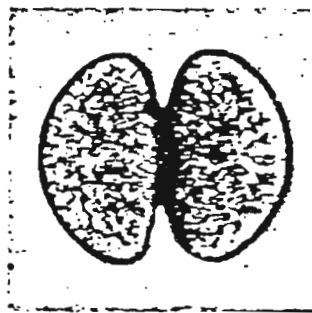
Fertilisation et Développement

Premier clivage (suite)

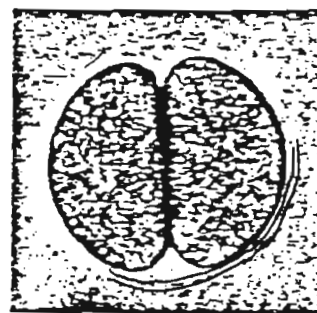
Arbacia Punctulata (23°C)



45 min



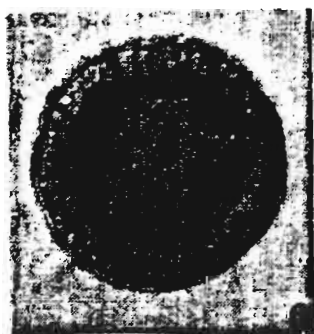
50 min



70 min

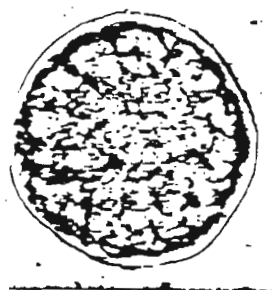
Blastula

Anthocidaris Crassispina (28°C) à 8 heures

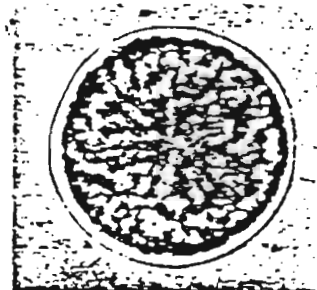


Arbacia Punctulata (23°C)

à 5 et 7 heures



4 1/2 hrs



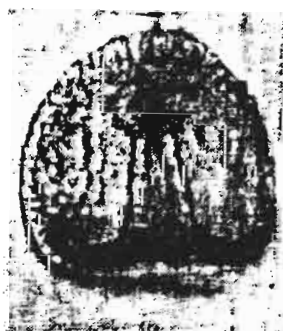
6 hrs



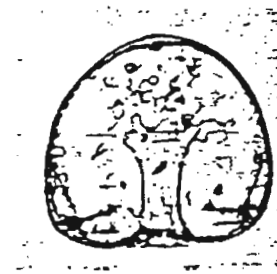
7 hrs

Gastrula

Anthocidaris Crassispina (28°C) à 12 heures



Mespilia Globulus (27°C) à 13 et 14



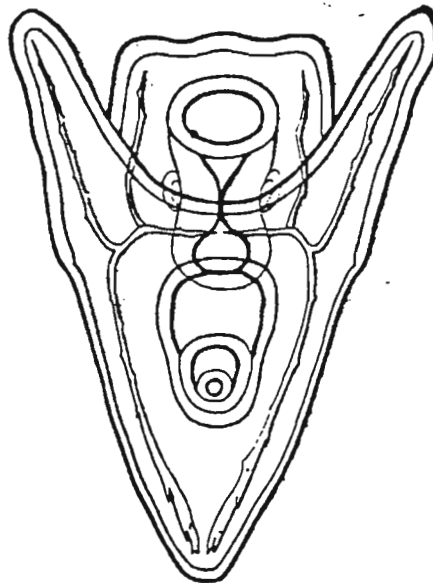
Fertilisation et Développement

Plutéus

Anthocidaris Crassispina (28°C) à 24 heures



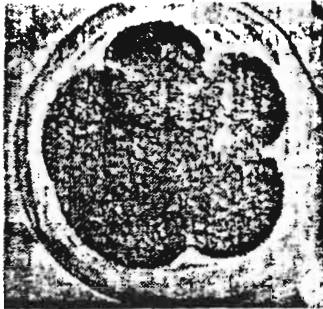
Hemicentrotus Pulcherimus à 120 heures



ANNEXE II
anomalies de développement

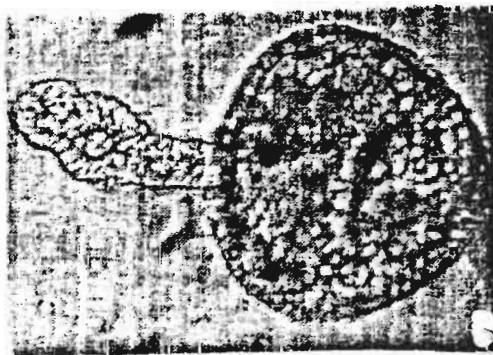
Polyspermie

Anthocidaris Crassispina (28°C) à 45 minutes apres insémination



Exogastrula

Anthocidaris Crassispina (28°C) 12 heures apres insémination



6 - Résultats expérimentaux

13 organismes donnant des résultats positifs au test de cytotoxicité sur cellules Kb (sauf deux éponges et 1 bryzoaire) ont été testés par cette méthode ainsi qu'une molécule purifiée, extraite d'une ascidie, Lissoclinum bistratum (SMIB N° UA 79), la bistramide.

Les résultats obtenus (voir tableau N°7) montrent que 6 extraits d'organismes, très actifs à 10 ug/ml sur cellules Kb, se révèlent spécifiquement antimitotiques sur oeufs d'oursin à des teneurs inférieures ou égales. D'autre part la bistramide A se révèle antimitotique entre 0,2 et 0,03 ug/ml, embryotoxique ou tératogène de 0,01 à 0,001 ug/ml et toxique sur la fertilisation à partir de 1 ug/ml.

7 - Conclusion

La mesure de l'action toxique d'extraits marins sur des cellules cancéreuses humaines peut être complétée par un test sur embryons d'oursin.

Si la fertilisation n'est pas perturbée, on peut mettre en évidence le pouvoir antimitotique d'un extrait sur les oeufs d'oursin. Malheureusement ce test est assez long et ne peut s'effectuer tout au long de l'année du fait que la fertilisation des oursins est saisonnière.

A la différence du test sur cellules Kb, ce n'est pas un test de préscreening, mais il peut être effectué sur certains extraits actifs sur Kb, afin d'affiner les résultats.

TABLEAU N° 7

TOXICITE SUR OEUFS FERTILISES D'OURSIN (en ug/ml)

Classe et N° SMIB.	% toxicité sur Kb	tox	amit	terat
R 1369C	—		1	
R 1375C	93		0,02	0,01
R 1378C	—			2
R 1396C	50		1	
R 1356C	—	10		
R 1402C	62		5	
<u>Ascidies</u>				
UA 120C	40			20
UA 269C	61			1
UA 284C	100	10	1	
<u>Zoanthaire</u>				
HZ 2 C	100		10	4
<u>Bryozoaire</u>				
Ba 11 C	—		50	20
<u>Gorgone</u>				
HG 106 A	100			1
<u>Pennatulaire</u>				
HA 266C	—	10		
BISTRAMIDE A	—	1	0,2 à 0,03	0,01 à 0,001

Tox. : effet toxique sur la fertilisation.
Empêchement de la formation de la membrane
de fertilisation.

Amit. : effet antimittotique. Bonne fertilisation mais
inhibition du clivage de l'oeuf.

Térat. : effet tératogène. Apparition de malformation
au stade gastrula ou pluteus.

TEST HERBICIDE SUR AMARANTE

1 - Principe

Ce test de pré-screening a été réalisé dans le cadre du S.M.I.B. en collaboration avec Rhône-Poulenc Agrochimie, afin de détecter les potentialités herbicides des extraits d'organismes marins. Il consiste à faire germer des graines d'amarante (Amaranthus caudatus, Amaranthacées) à l'obscurité sur un milieu solide constitué par de l'agar-agar, dans lequel est dispersé l'extrait testé, à une teneur déterminée. La lecture s'effectue après une semaine de contact en comparant la hauteur moyenne des pousses dans les tubes correspondant à l'extrait étudié à celle obtenue dans les tubes témoin ne contenant que de l'agar.

2 - Protocole opératoire

Afin d'éviter toute contamination fongique, opérer en milieu stérile (hotte à flux laminaire).

Dans un tube à essais stérile de 120 mm x 30 mm :

- déposer 100 µl de l'échantillon à tester
- ajouter 5 ml de gélose (agar-agar à 7 g/l) préalablement stérilisés et ramenés à 40°C
- homogénéiser par agitation lente
- après refroidissement, déposer une vingtaine de graines d'amarante la surface de la gélose
- boucher les tubes
- garder les tubes une semaine à l'obscurité avant de faire la lecture.

3 - Résultats expérimentaux

136 organismes, soit environ 400 extraits ont été testés entre Mars 1987 et Mars 1988. La majeure partie des organismes est constituée par des éponges (41 %), des ascidies (14 %) et des madréporaires (14 %). Le tableau N° 8 expose les résultats trouvés pour les organismes présentant une toxicité supérieure ou égale à 50 % à 100 µg/ml.

TABLEAU N° 8

% DE PHYTOTOXICITE SUR AMARANTE A 100 ug/ml

<u>Eponges</u>	
1362 A	51
B	40
1374 A	57
B	85
1375 A	45
B	38
C	74
1380 A	50
B	50
1381 C	50
1383 B	67 (64 à 10)
C	100 (0 à 10)
1385 C	80
1387 C	100 (0 à 10)
1407 A	50 (50 à 10)
C	50 (50 à 10)
1404 C	50
132 A	68
B	56
1408 A	80
C	100 (100 à 10)
1411 B	54
1413 B	70
1414 C	Taux de germination faible
1396 A	65
B	50
C	81 (73 à 10)

TABLEAU N° 8 (suite)

<u>Ascidies</u>	
UA 269 C	100 (0 à 10)
UA 268 A	100 (0 à 10)
C	100 (100 à 10)
UA 263 C	50
UA 262 C	64
<u>Gorgones</u>	
HGP 41 C	100 (0 à 10)
HG 106 C	Taux de germination faible
<u>Zoanthaire</u>	
HZ 2 B	40 à 70
C	100
<u>Etoile de mer</u>	
EA 13 sap	100

4 - Conclusion

Le tableau IV expose l'ensemble des résultats obtenus pour tous les organismes testés sur cellules Kb, sur amarante et sur oeuf d'oursin.

Sur 136 organismes testés, 12 présentent des extraits actifs sur cellules Kb et sur amarante. Il s'agit des éponges R 1375, 1383, 1385, 1396, 1408, 1387 et 1411, des ascidies UA 268, 269, et 263, du zoanthaire HZ2 et de l'étoile de mer EA 13 (dont l'extrait saponoside est 100% toxique sur amarante et 0% toxique sur cellules Kb et l'extrait acétonique 0% toxique sur amarante et 100% toxique sur Kb).

IV - Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins	N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
R 1358 04/85	Eponge <u>Haliclona sp.</u>	A, B, C	—	-	C -	R 1372 09/85	Eponge profonde (405 m) <u>Corallistes undulatus</u>	A, B, C	—	-	
R 1359 06/85	Eponge <u>Toxochalina sp.</u>	A, B, C	—	(-) -		R 1373 09/85	Eponge profonde (425 m) <u>Pheronema semiglobosum</u>	A, B, C	—	-	
R 1361 09/85	Eponge profonde (510 m) <u>Corallistes undulatus</u>	A, B, C	—	-		R 1374 09/85	Eponge profonde (425 m)	A, B, C	A+ B+ C-	-	
R 1362 08/85	Eponge profonde (600 m) <u>Myxillide sp.</u>	A, B, C	A+ B+ C-	-		R 1375 09/85	Eponge profonde (500 m) <u>Podospongia aff. loventi</u>	A, B, C	A ++ B ++ blé C +++ A ++ B ++ amar C +++	(C +++) C +++ 2è réc C+++ 3è réc C+++	C amit. (0,02 γ)
R 1363 09/85	Eponge profonde (510 m) <u>Erylus sp.</u>	A, B, C	—	(C +++) (in vivo) 2è réc C +		R 1376 01/86	Eponge <u>Calcarea sp.</u>	A, B, C	-	(-) -	
R 1364 09/85	Eponge profonde (500 m) <u>Geodia sp.</u>	A, B, C	—	-		R 1377 02/86	Eponge profonde (500-640) <u>Regadrella okinoseana</u>	A, B, C	—	-	
R 1365 09/85	Eponge profonde (500 m) <u>Pleroma menoui</u>	A, B, C	—	-		R 1378 02/86	Eponge profonde (500-640) <u>Xetospongia sp.</u>	A, B, C	- blé - amar	(-) -	B - C térat. (10 γ)
R 1366 09/85	Eponge profonde (250 m) <u>Stylotella sp.</u>	A, B, C	—	(C +++)		R 1379 02/86	Eponge profonde (410 m) <u>Petrosia sp.</u>	A, B, C	—	-	
R 1368 09/85	Eponge profonde (275 m) <u>Corallistes sp.</u>	A, B, C	-	-		R 1380 02/86	Eponge profonde (500-640)	A, B, C	A+ B+	-	
R 1369 09/85	Eponge profonde (255 m) <u>Jereicopsis</u> <u>graphidiophora</u>	A, B, C	-	-		R 1381 02/86	Eponge profonde (500-640) <u>Cladrocroce incurvata</u>	A, B, C	C+	-	
R 1371 09/85	Eponge profonde (405 m) <u>Pheronema semiglobosum</u>	A, B, C	—	C +		R 1382 02/86	Eponge profonde (410 m) <u>Pheronema conicum</u>	A, B, C	—	-	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
R 1383 02/86	Eponge profonde (415 m) <u>Pheronema semiglobosum</u>	A, B, C	C+ B+++	C ++ (confirmé)	
R 1384 02/86	Eponge profonde (415 m) <u>Corallistes undulatus</u>	A, B, C	-	-	
R 1385 02/86	Eponge profonde (500 m) <u>Corallistes fulvodesmus</u>	A, B, C	C++	(C +++) (in vivo) 2è réc C+++	
R 1386 02/86	Eponge profonde (480-640) <u>Geodia sp.</u>	A, B, C	-	-	
R 1387 02/86	Eponge profonde (400 m) <u>Phloeodictyon sp.</u>	A, B, C	C + amar	(B +++) (C +) B ++, C +	
R 1388 02/86	Eponge profonde (480-640) <u>Tethya sp.</u>	A, B, C	-	C ++ (-)	
R 1390 05/86	Eponge.	A, B, C	-	-	
R 1278 06/86	Eponge <u>Echinochalina sp.</u>	A, B, C	-	C +	
R 1395 09/86	Eponge profonde (500 m)	A, B, C	-	B ++ (confirmé)	
R 1396 09/86	Eponge profonde (400 m)	A, B, C	/	C +	C amit. (1 Y)
R 1398 10/86	Eponge profonde (300 m) <u>Reniera sp.</u>	A, B, C	-	-	
R 1399 10/86	Eponge profonde (360 m) <u>Stelleeta</u>	A, B, C	-	C ++ (confirmé)	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
R 1400 10/86	Eponge profonde (650 m) <u>Thenea sp.</u>	A, B, C	-	-	
R 1401 10/86	Eponge profonde (350 m) <u>Corallistes sp.</u> + <u>Jaspis sp.</u>	A, B, C	- amar.	C +++ (confirmé)	
R 1402 10/86	Eponge profonde (360 m) <u>Stelleeta</u>	A, B, C	-	C ++ (confirmé)	C amit. (5 Y)
R 1300 12/86	Eponge <u>Mycale neofibularia</u>	A, B, C	-	-	
R 1396 bis 10/86	Eponge profonde (530 m) <u>Reidia coerulea</u>	A, B, C	A ++ B - blé C +++ A + B + amar C +++	A +++ C +++ B + C +++ (confirmé)	
R 1407					
R 165 12/86	Eponge (<u>Haliclona</u>) <u>Callyspongia subermigera</u>	A, B, C	-	A ++	
R 189 12/86	Eponge	A, B, C	-	-	
R 1225 12/86	Eponge <u>Dendrylla sp.</u>		/	/	/
R 652 03/87	Eponge	A, B, C	-	A +	
R 1391 03/87	Eponge <u>Liosinasp.</u>	A, B, C	-	C +++ (confirmé)	
R 1404 04/87	Eponge : Clione	A, B, C	A +	-	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P368 - RP)	ω fert. d'oursins
R 132 04/87	Eponge : Clione	A, B, C	A + B +	-	
R 1405 05/87	Eponge profonde (520) <u>Geodia vaubani</u>	A, B, C	-	-	
R 1406 05/87	Eponge profonde (520) <u>Geodia sp.</u>	A, B, C	-	-	
R 1408 05/87	Eponge profonde (520) <u>Neosiphonia supertes</u>	A, B, C	A + C +++	A +++ C +++ (CONFIRMÉ)	
R 1409 05/87	Eponge profonde(500-530) <u>Geodia sp.</u>	A, B, C	-	A +++ ?	
R 1410 05/87	Eponge profonde(500-530) <u>Corallistes undulatus</u>	A, B, C	-	C +++ ?	
R 1411 05/87	Eponge profonde(230-280) <u>Phloeodictyon sp.</u>	A, B, C	B + amar	B ++	
R 1413 10/86	Eponge profonde (200) <u>Agelas noveacaledoniae</u>	A, B, C	B ++	-	
R 1414 10/86	Eponge profonde (270) <u>Ircinia sp.</u>	A, B, C	C +	-	
R 321			-	C+++	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P368 - RP)	ω fert. d'oursins
HGP 14 ou HGP 50 09/85	Gorgone profonde (405) <u>Chrysogorgia sp.</u>	A, B, C	-	-	
HGP 41 09/85	Gorgone profonde (500) <u>Fanellia sp.</u>	A, B, C	C+	(-)	
HG 240 02/86	Gorgone profonde (405) <u>Solenocaulon sp.</u>	A, B, C	-	-	
HA 66 09/86	Alcyonaire profond (480-640 m) <u>Anthomastus sp.</u>	A, B, C	-	-	
HA - 03/86	Alcyonaire <u>Cespitularia</u>		/	/	/
HA 60 05/86	Alcyonaire <u>Umbellulifera sp.</u>	A, B, C	-	-	
HA 285 06/86	Alcyonaire <u>Dendronephthia sp.</u>	A, B, C	/	-	
HG 136 06/86	Gorgone <u>Euplexaura sp.</u>	A, B, C	-	-	
HG 143 06/86	Gorgone <u>Solenocaulon sp.</u>	A, B, C	-	-	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
HA 65 03/86	Pennatulaire <u>Cavernularia sp.</u>	C	/	-	
HA 266	Pennatulaire <u>Lituaria sp.</u>	B et C	C -	/	
HA 240	Alcyonaire <u>Solenopodium steckei</u>	B et C	-	-	
HA 244	Alcyonaire <u>Paraerythropodium</u>	Me OH CH2 C12	-	-	
HA 292 10/86	Alcyonaire profond	A, B, C	-	-	
HC 7 06/86	Gorgone <u>Rhumphella sp.</u>	A, B, C	-	-	
HA 297 10/86	Alcyonaire profond	A, B, C	-	-	
HC 106 09/87	Gorgone <u>Villogorgia sp.</u>	A, B, C	-	A +++ C +++	
HC 112 09/87	Gorgone <u>Ellisella sp.</u>	A, B, C	-	-	
HC 122 09/87	Gorgone <u>Siphonogorgia sp.</u>	A, B, C	-	C +++	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
Ba 04 01/86	Bryzoaire <u>Celleporaria sp.</u>	A, B, C	-	A + (-) C ++	
Ba 08 09/85	Bryzoaire <u>Iodyctium buchneri</u>	A, B, C	-	-	
Ba 11 02/86	Bryzoaire <u>Celleporaria sp.</u>	A, B, C	- blé - amar.	(-) -	C térat. (20γ) amit(50)
ML 30 12/85	Mollusque bivalve <u>Amusium bailloti</u>	A, B, C	-	(-) -	
ML 279 08/86	Mollusque <u>Strombus luhuanus</u>	A, B, C	-	A +	
MG 42 03/87	Mollusque	A, B, C	-	C +	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
UA 30 09/85	Ascidie <u>Polycarpa aurata</u>	A, B, C	-	-	
UA 120 08/85	Ascidie <u>Didemnum sp.</u>	A, B, C	-	(C +++) C ++	C - Terat (20%)
UA 121 08/85	Ascidie <u>Pyura momus</u>	A, B, C	-	-	
UA 4 10/86	Ascidie <u>Microcosmus</u>	A, B, C	-	-	
UA 231 03/87	Ascidie <u>Pyura sp.</u>	A, B, C	-	C ++	
UA 56 03/87	Ascidie <u>Polycarpa cryptocarpa</u>	A, B, C	-	C ++	
UA 241 03/87	Ascidie <u>Polyandrocarpa rollandi</u>	A, B, C	-	C ++	
UA 23 03/87	Ascidie <u>Polycitor</u>	A, B, C	-	-	
UA 269 03/87	Ascidie <u>Polyclinum sp.</u>	A, B, C	C +++	C ++ (confirmé)	Terat (1%)
UA 268 03/87	Ascidie <u>Lissoclinum sp.</u>	A, B, C	A + C +++	A ++ C +++ (confirmé)	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
UA 34 04/87	Ascidie <u>Aplidiopsis gelidium</u>	A, B, C	-	-	
UA 263 04/87	Ascidie <u>Didemnum sp.</u>	A, B, C	C +	C ++	
UA 70 04/87	Ascidie <u>Didemnum sp.</u>	A, B, C	-	-	
UA 262 04/87	Ascidie <u>Didemnum sp.</u>	A, B, C	C +	-	
UA 131 08/87	Ascidie <u>Polysyncraton sp.</u>	A, B, C	-	-	
UA 282 08/87	Ascidie	A, B, C	-	-	
UA 284 08/87	Ascidie	A, B, C	-	C +++ (confirmé)	C amit (1%) Tox(10%)
UA 288	Ascidie	A, B, C	-	A+++ A-(1%)	
UA 101	Ascidie	A, B, C	-	C+++ C+ (1%)	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P368 - RP)	ω fert. d'oursins
HS 198 05/86	Madrépore <u>Lobophyllia sp.</u>	A, B, hex	—	—	
HS 199 05/86	Madréporaire <u>Pocillopora histrix</u>	A, B, hex	—	—	
HS 200 05/86	Madréporaire <u>Goniopora sp.</u>	A, B, hex	—	A++	
HS 209 05/86	Madréporaire <u>Caulastrea furcata</u>	A, B, hex	—	—	
HS 210 05/86	Madréporaire <u>Alveopora sp.</u>	A, B, hex	—	—	
HS 211 05/86	Madréporaire <u>Merulina ampliata</u>	A, B, hex	—	—	
HS 302 10/86	Madréporaire profond (270 m)	A, B, C	—	—	
HZ 2 10/86	Zoanthaire	A, B, C	G+ B+	A+++ B+++ C+++ (confirmé)	C amit. (10 γ) et térat. (4γ)
HZ 21 10/86	Antipathaire	A, B, C	—	—	
HS 94 07/87	Madréporaire <u>Cynarina lacrymalis</u>	A, B, C	—	—	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P368 - RP)	ω fert. d'oursins
HS 236 08/87	Madréporaire <u>Plerogyra sinuosa</u>	A, B, C	—	—	
HS 525 09/87	Madréporaire <u>Pocillopora sp.</u>	A, B, C	—	—	
HS 526 09/87	Madréporaire <u>Acropora palifera</u>	A, B, C	—	—	
HS 527 09/87	Madréporaire <u>Acropora sp.</u>	A, B, C	—	—	
HS 528 09/87	Madréporaire <u>Acropora sp.</u>	A, B, C	—	—	
HS 114		A,B,C	—	—	
HH 41		A,B,C	—	—	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
EH 194 12/85	Holothurie <u>Holothuria coronopertusa</u>	A, B, C	—	—	
EA 13	Etoile de mer <u>Fromia monilis</u>	Sap., Acét	sap+++ Acét —	acét+++ — à 1X	
EA 17	Etoile de mer <u>Celerina effernani</u>	Sap., Acét	acét —	acét+++ — à 1X	
EA 65 08/85	Etoile de mer <u>Thromidia catalai</u>	Sap., Acét	—	—	
EA 215 02/86	Etoile de mer <u>Rosaster sp.</u>	Sap., Acét	/	/	
EC 114 02/86	Crinoïde profonde (410) <u>Metacrinus sp.</u>	A, B, C	—	—	
EE 92 09/85	Oursin profond (425) <u>Heterobrissus niasicus</u>	A, B, C	—	—	
EE 95 02/86	Oursin profond (400) <u>Areosoma sp.</u>	A, B, C	—	—	
EE 9 08/86	Oursin <u>tripneustes gratilla</u>	A, B, C	—	—	
EE 98 09/86	Oursin profond (400) <u>Diadema sp.</u>	A, B, C	—	—	

N° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
EE 99 09/86	Oursin profond (400) <u>Lovenia sp.</u>	A, B, C	—	—	
EE 100 09/86	Oursin profond <u>Asthenosoma sp.</u>	A, B, C	—	—	
EA 274 09/86	Etoile profonde	A, B, C	/	/	
EE 101 10/86	Oursin profond (320)	A, B, C	—	—	
EC 16 /86	Crinoïde <u>Comanthus benetti</u>	A, B, C	—	—	
EA 282 05/87	Etoile profonde (2.000 m)	Sap, acét	—	—	
EH 292 05/87	Holothurie profonde (2.000 m)	A, B, C	—	C +	
EO 237 05/87	Ophiure profonde (2.000)	A, B, C	—	—	
EC 117 06/87	Crinoïde profond (240-440)	A, B, C	—	—	

n° Zool	Organismes	extrait	phytotox.	Kb (P388 - RP)	ω fert. d'oursins
AL 397 03/86	Algue <u>Dictyota sp.</u>	/	/	/	/
AL 398 03/86	Algue : Cyanophycée <u>Symploca hydroïdes et</u> <u>Schyzothrix arenaria</u>	A, B, C	-	C +++ (confirmé)	
AL 401 03/87	Algue : Cyanophycée	A, B, C	-	C ++ C-)	

Phytotoxicité sur :
blé et amar.: amarante

- pourcentage de toxicité < 50 à 100 µg/ml
+ pourcentage de toxicité > 50 à 100 µg/ml
++ pourcentage de toxicité < 50 à 10 µg/ml
+++ pourcentage de toxicité > 50 à 10 µg/ml

Cytotoxicité sur :
cellules Kb

- activité in vitro < à 30 % (10 µg/ml)
+ activité in vitro de 30 % à 50 %
++ activité in vitro de 50 % à 80 %
+++ activité in vitro > à 80 %

() résultats obtenus par R.P. Santé sur P 388 "in vitro"

Oeufs fertilisés d'oursins :

Tox. : effet toxique sur la fertilisation.
Empêchement de la formation de la membrane
de fertilisation.

Amit. : effet antimitotique. Bonne fertilisation mais
inhibition du clivage de l'oeuf.

Térat. : effet tératogène. Apparition de malformation
au stade gastrula ou pluteus.

: concentration à laquelle l'effet est observé,
en µg/ml..

Bibliographie

- 1 - CZIHAK, G. 1975. Thesea urchin embryo.
Springer-Verlag : Berlin - 700 p.
- 2 - HARVEY, E.B. 1956. American Arbacia and others sea urchins.
Princeton University Press : Princeton - 298 p.
- 3 - HAGSTRÖM, B.E., LÖNNING, S. 1973. The sea urchin test egg as a testing
object in toxicology. Acta pharmacol. Toxicol. 32, Supp. I : 1-49.
- 4 - KOBAYASHI, N. 1984. Ecotoxicological testing for the marine environment.
G. Persoone, E. Jasper, C. Clause : State univ. Ghent and Inst. Mar.
Scient. Res., Bredene, Belgium Vol. 1 - 798 p.
- 5 - KOBAYASHI, N. 1980. Comparative sensitivity of various developmental
stages of sea urchins to some chemicals. Mar. Biol. 58 : 163-171.
- 6 - KOBAYASHI N., 1973. Studies on the effects of some agents on fertilised
sea urchin eggs, as a part of the bases for marine pollution bioassay I.
Publ. Seto. Mar. Biol. Lab. 21 : 109-114.
- 7 - KOBAYASHI, N. 1974. Marine pollution bioassay by sea urchin eggs,
an attempt to enhance accuracy. Publ. Seto. Mar. Biol. Lab. 21 : 377-391.
- 8 - OKADA, K., MIYAUCHI, Y. 1954. Normal table of the early developmental
stages on the sea urchin, Hemicentrotus pulcherrimus. Journal of
Gakugei, Tokushima University vol. V.
- 9 - WILLIAMS, D.H.C., ANDERSON, D.T. 1975. The reproductive system,
Embryonic Development, Larval Development and Metamorphosis of the
Sea Urchin Heliocidaris erythrogramma (Val.)
(Echinoidea : Echinometridae) Aust. J. Zool., 23 : 371-403.

Imprimé par le Centre ORSTOM
de NOUMEA
Avril 1989

 CFCOM 12265A

