



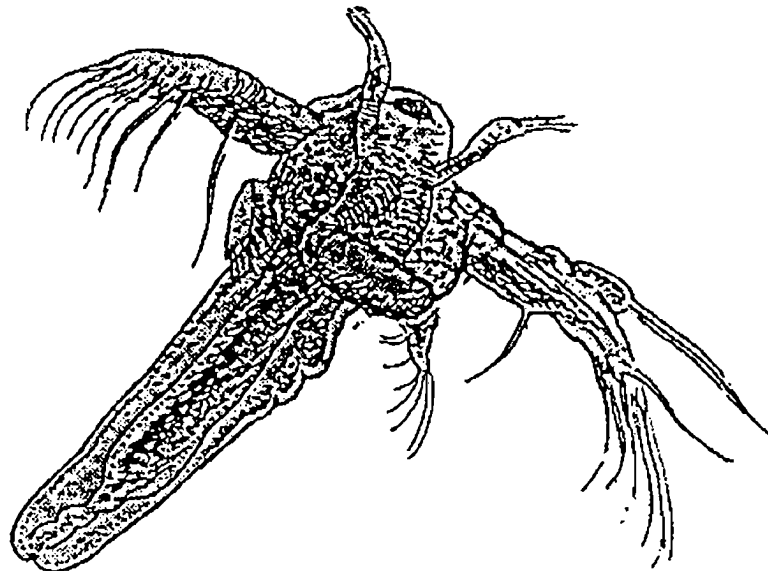
Université Française du Pacifique
Centre Universitaire de Nouvelle Calédonie

DEUST AQUACULTURE

Rapport de stage de 2^{ème} année
(11/9/95 - 27/10/95)

présenté par
Mireille Mousseux

TEST DE TOXICITE SUR LARVES D'*Artemia salina* ENTRETIEN D'UN ELEVAGE DE BALANES



Laboratoire d'accueil :

Département Santé, UR des substances naturelles d'intérêt thérapeutique, laboratoire des biotechnologies marines, centre ORSTOM de Nouméa - Nouvelle Calédonie

SOMMAIRE

TABLEAUX DES FIGURES	p 2
REMERCIEMENTS	p 3
INTRODUCTION	p 4
I TEST DE TOXICITE SUR LARVES D'<i>Artemia salina</i>	
a) Systématique	p 5
b) Répartition des <i>Artemia</i> dans le biotope	p 5
c) Morphologie des cystes lyophilisés	p 5
d) Préparation des <i>Artemia</i>	p 7
e) Eclosion des <i>nauplii</i>	p 7
f) Préparation des extraits	p 7
g) Réalisation du test	p10
h) Lecture des résultats	p10
II PREPARATION DES LARVES DE BALANES	
a) Systématique	p12
b) Mode de vie dans le milieu naturel	p12
c) Elevage de balanes en aquarium	p14
1) Entretien	p14
2) Nourriture	p14
3) Culture d'algue	p14
4) La ponte	p18
CONCLUSION	p19
BIBLIOGRAPHIE	p20

TABLEAUX DES FIGURES

Figure 1 : schéma de la structure du cyste d' <i>Artemia</i>	p 6
Photo 1 : préparation des <i>Artemia</i>	p 8
Figure 2 : éclosion des <i>Artemia</i>	p 9
Tableau 1 : résultats des essais de toxicité	p11
Figure 3 : stade nauplien d'une larve de balane	p13
Photo 2 : aquarium de balanes	p15
Photo 3 : culture de <i>Tetraselmis sp.</i> en fiole de Fernbach	p17

REMERCIEMENTS

A :

M^{me} Debitus Cécile:

responsable du programme biotechnologies marines de l'ORSTOM pour m'avoir accepté au sein de son équipe et son aide apportée lors de la rédaction de ce rapport.

M^{me} Gaudichon Véronique:

pour sa patience et gentillesse,

Pascal, Jean, Josiane pour leur sympathie témoignée à mon égard ainsi que toutes les personnes rencontrées au cours de mon stage

A tous merci pour votre grande amabilité et disponibilité durant cette période d'un mois et demi.

INTRODUCTION

Ce stage de 2^{ème} année de DEUST AQUACULTURE en milieu professionnel s'est effectué au centre de l'ORSTOM de Nouméa, département santé, unité de recherche des substances d'intérêt thérapeutique, dans le cadre du programme Biotechnologies Marines.

Environ 600 organismes marins ont déjà été étudiés au centre ORSTOM de Nouméa pour leur intérêt pharmacologique. De nombreux extraits (environ 10%) ont montré un intérêt particulier sur l'une des activités étudiées : antibiotique, antifongique, antitumorale et antivirale.

Le but de ce travail est, d'une part, la réalisation des tests de toxicité sur larves d'*Artemia salina*, et, d'autre part, d'entretenir un élevage de balanes afin de procéder également à des tests de recherche d'activité antifouling.

L'essai sur *Artemia* est un test de toxicité générale facile à mettre en œuvre et largement utilisé dans l'évaluation de la toxicité générale d'extraits naturels d'origine terrestre ou marine. Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances antibiotiques utilisables en aquaculture, ces larves de crustacés ont l'avantage d'être proches des organismes à protéger des infections en élevage larvaire. Les substances trop toxiques sont *a priori* éliminées pour une utilisation en aquaculture.

L'activité antifouling est recherchée sur les substances antibiotiques qui stoppent la formation du film microbien sur les surfaces immergées, première étape du phénomène de "fouling" ; le test sélectionné permet d'évaluer l'inhibition de la fixation des larves de balanes sur leur support *in vitro*.

I TEST DE TOXICITE SUR LARVES D'*Artemia salina*.

a) Systématique

- Classe des arthropodes,
- Embranchement des crustacés,
- Sous classe des branchiopodes,
- Ordre des anostracés,
- Famille des artemidae,
- Genre *Artemia*,
- Espèce *salina*.

b) Répartition des *A. salina* dans le biotope

Les *Artemia* sont très répandus dans les eaux dont le taux de salinité est supérieur à la normale et sont rejetés sur les côtes par le vent et les vagues. Ils se présentent sous forme de petits grains apparemment inactifs qui ont la capacité d'entrer en période de latence.

Notons qu'il est possible d'élever des *Artemia* dans un milieu artificiel.

c) Morphologie des cystes lyophilisés

Au niveau commercial, la présentation d'*Artemia* se fait sous la forme de cystes déshydratés sous vide en boîte de conserve pour faciliter le stockage.

Les cystes sont constitués de trois structures (figure 1):

— un chorion : sorte de coque brune résistante entourant le cyste constitué de chitine et d'hématine (produit décomposant l'hémoglobine; la concentration d'hématine détermine la couleur du crustacé). La fonction principale du chorion est de protéger l'embryon contre les rayonnements lumineux et d'un dysfonctionnement organique.

— une membrane externe : elle évite la pénétration de molécules plus grosses que le CO₂ fonctionnant ainsi comme une membrane perméable.

— une enveloppe embryonnaire : transparente et très élastique, elle sépare l'embryon de la membrane interne

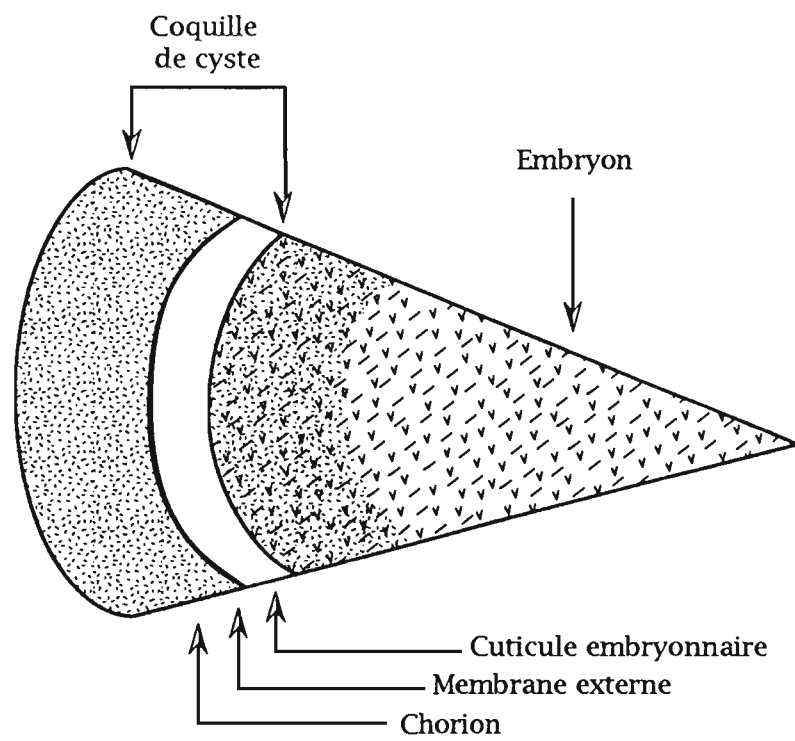


Figure 1 : schéma de la structure du cyste d'*Artemia*

d) Préparation des Artemia

Ces *Artemia* vont servir d'une part à la réalisation du test mais aussi à nourrir un élevage de balanes. Pour cela, il faut préparer tous les matins 2g de cystes : ils sont mis à éclore dans une ampoule à décanter dans 1 litre d'eau de mer à 70‰ sous fort bullage.

La photo 1 illustre ce procédé.

Remarque : la préparation s'effectue la veille, l'éclosion étant supérieure à 80% en 24 heures.

* *Paramètres de culture* :

- La température : il est préférable de la maintenir entre 25 et 30°C; si ce paramètre n'est pas respecté le métabolisme du cyste est stoppé de façon irréversible.

- La salinité : favorable entre 20 et 25 g/l.

- L'aération : permet d'homogénéiser le milieu et de favoriser l'éclosion.

- L'éclairage : une lumière artificielle continue favorise un meilleur rendement.

e) Éclosion des nauplii

Au bout de 30 heures, le bullage est stoppé pour récolter les *nauplii*. Une source lumineuse est dirigée vers le bas de l'ampoule à décanter. Par phototropisme, les larves se séparent des cystes non éclos et des débris d'oeufs (figure 2). Il suffit alors de les recueillir pour nourrir les élevages de balanes et procéder à la réalisation des tests.

f) Préparation des extraits

8 extraits d'organismes marins, bactéries et spongiaires, ont été sélectionnés pour une activité antibiotique intéressante sur des pathogènes aquacoles ou comme substance antifouling. Leur toxicité sur larves d'invertébrés marins doit être évaluée.

Ces extraits sont soit hydroalcoolique (R1280B), soit chlorométhylénique (R401C, R1280C) en ce qui concerne les spongiaires. Les cultures bactériennes réalisées à partir de souches isolées de surface de spongiaires (R1533S5), ou de broyats (R191E4, R1533E14 et E15, R1572E4) ont été extraites à l'acétate d'éthyle.

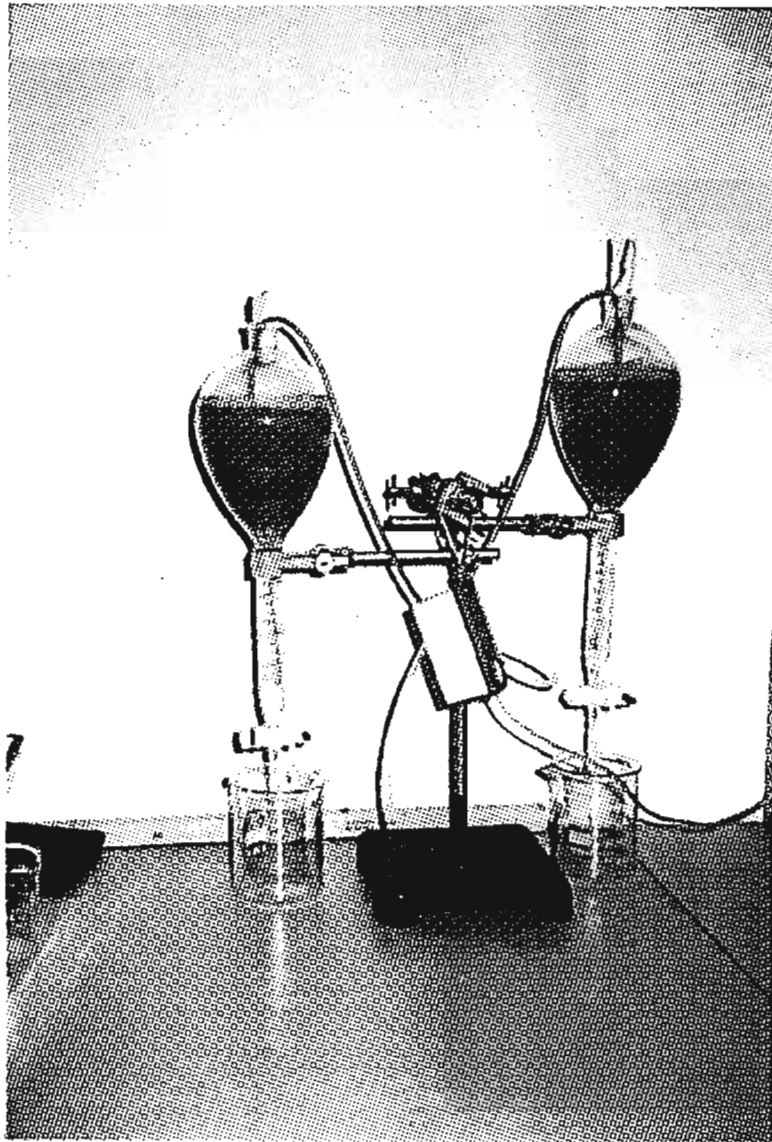
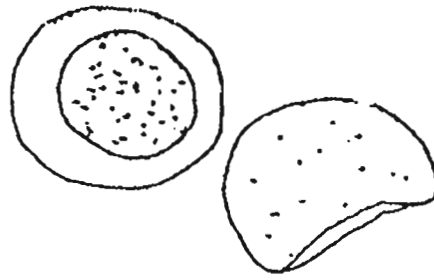
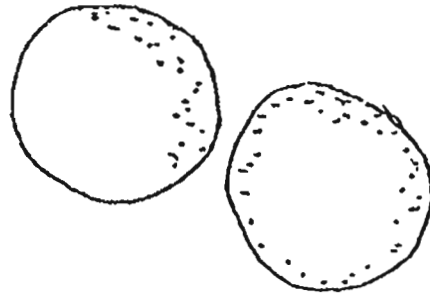


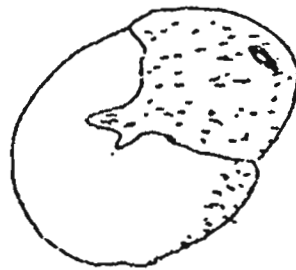
Photo 1 : préparation des *Artemia*



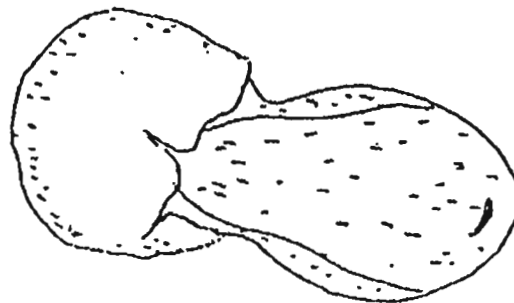
Cystes secs



Cystes hydratés



Stade d'éclatement



Stade d'éclosion



Nauplius éclos

Figure 2 : Eclosion d'*Artemia*

25mg d'extrait sont pesés avec précision et dissous dans 1ml de solvant (diméthyle sulfoxyde DMSO) : nous obtenons alors une solution 1 à 25mg/ml.

0,4ml de cette solution sont ensuite prélevés et ajoutés à 1,6ml de DMSO. La solution 2 à 5mg/ml servira à la réalisation du test.

g) Réalisation du test

Chaque extrait est testé à trois concentrations différentes : 100, 50 et 10µg/ml. Pour chaque concentration cinq tubes sont préparés. La solution d'extrait à tester est ajoutée dans le tube contenant les larves. A l'aide d'une pipette Pasteur dix larves sont transférées dans chaque tube à hémolyse. Le volume est ensuite ajusté à 5ml avec de l'eau de mer à 70%. Une série de tubes témoins est réalisée aux concentrations suivantes : (2%, 1%, 0,2%) avec le DMSO et (1%, 0,2%, 0,1%) avec l'éthanol.

Les tests sont ensuite laissés 24 heures sous éclairage.

h) Lecture des résultats

Après 24 heures, le nombre de larves survivantes est compté dans chaque tube et la mortalité calculée à chaque concentration (tableau 1).

Mortalité : % morts = (% morts essai - % morts témoin) / (100 - % morts témoin).

Remarque: La mortalité témoin ne doit pas excéder 15%. Les produits antifouling de référence, nonyl- phénol et acétate de tributylétain sont dissous dans l'éthanol, et le sulfate de cuivre dans l'eau.

A partir des résultats, la Concentration Létale 50% (CL50) reflétant la toxicité des produits, est estimée :

CL50	Toxicité
CL50 ≥ 100µg/ml	-
100µg/ml > CL50 ≥ 50µg/ml	+
50µg/ml > CL50 ≥ 10µg/ml	++
CL50 < 10µg/ml	+++

Extraits bruts

Extraits :	extraits de spongiaire entier			extraits de cultures de bactéries marines				
	R401C	R1280B	R1280C	R191E4	R1533E14	R1533E15	R1572E4	R1533S5
10µg/ml	0%	12%	2%	0%	0%	4%	100%	0%
50µg/ml	24%	78%	0%	19%	11%	47%	100%	84%
100µg/ml	67%	83%	4%	21%	74%	100%	100%	95%
Toxicité	+	++	-	-	+	+	+++	+

Extrait :	R1572E4 dilué au1/10
1µg/ml	4%
5µg/ml	51%
10µg/ml	100%
Toxicité	+++

Produits purs de référence

Produits	CuSO4	Tributylétain	Nonylphénol
1µg/ml	38%	100%	23%
5µg/ml	68%	/	/
10µg/ml	72%	100%	100%
50µg/ml	92%	/	/

Tableau 1 : résultats des essais de toxicité

II PREPARATION DES LARVES DE BALANES

a) Systematique

- Classe des rémipèdes,
- Embranchement des crustacés,
- Sous ordre des cirripèdes,
- Ordre des thoraciques,
- Famille des balanoides,
- Genre *Balanus*,
- Espèce *amphitrite*.

b) Mode de vie dans le milieu naturel

La balane, parce qu'elle possède une "coquille" calcaire, est souvent prise pour un mollusque, or c'est un crustacé. Elle s'est construit une sorte de carapace et se développe sur des supports immergés mais aussi sur de nombreuses formes de la vie marine.

Les balanes sont hermaphrodites. Il faut néanmoins deux individus pour que la reproduction sexuée puisse s'effectuer. Les adultes ne pouvant se déplacer pour s'accoupler, vont se fixer près de leurs congénères, afin que les tubes spermatiques des unes puissent aller féconder les oeufs dans les conduits génitaux femelles des autres et vice-versa.

Au cours des différents stades juvéniles, la larve nage librement. Ce n'est que plus tard, lorsqu'elle est pratiquement arrivée à maturité, qu'elle devient sédentaire. Elle se fixe alors à un substrat solide quelconque. Lorsqu'elle sort de l'oeuf, simple larve planctonique, celle-ci ressemble beaucoup aux larves des autres crustacés. C'est le stade nauplien (figure 3), libre nageur. Cette larve subit ensuite des mues successives avant d'atteindre le stade cypride : c'est alors qu'elle se fixe et acquiert une "coquille" (dont un muscle adducteur assure la fermeture), une paire d'yeux et une glande cémentaire. Celle-ci sécrète une substance qui lui permettra d'adhérer à un support solide.

Une fois parvenue au stade adulte, la balane s'installe définitivement et devient entièrement tributaire en ce qui concerne son alimentation du mouvement des eaux environnantes. Elle attire vers sa bouche les particules par le truchement d'un pied en forme d'éventail. La balane possède alors un piège apte à retenir les particules en suspension dans l'eau : ce capteur est constitué par des soies qui recouvrent les appendices que l'animal laisse émerger hors de sa "coquille".

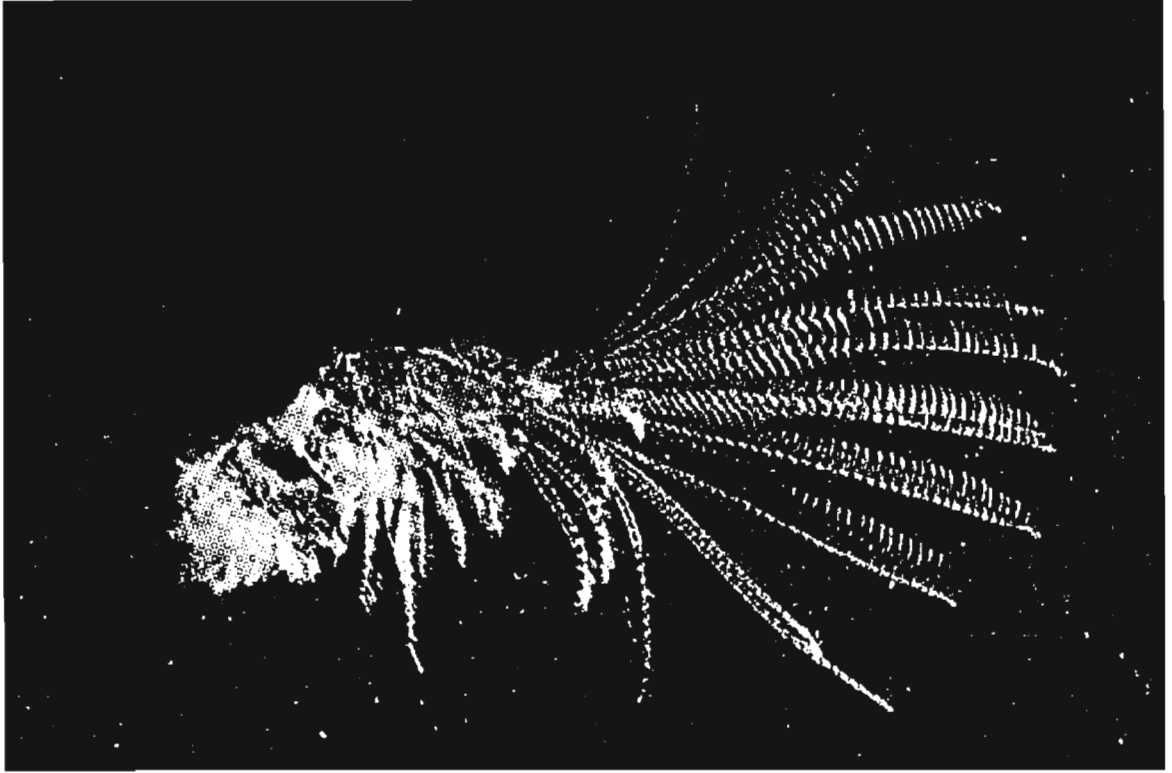


Figure 3 : stade nauplien d'une larve de balane

c) Elevage de balanes en aquarium

1) Entretien

Les balanes ont été récoltées avec leurs supports sur les bords des bassins d'élevage de crevettes de Saint-Vincent ; ces organismes colonisent rapidement toutes les surfaces immergées dans moins d'un mètre d'eau. Elles sont maintenues dans deux aquariums de : 25x35x30cm (lxLxh) fortement aérés (photo 2), à raison d'environ 400 individus par bac. L'eau de mer utilisée est filtrée sur 0,3µm (16 litres d'eau par aquarium). Elle doit être changée trois fois par semaine. Les balanes sont alors soigneusement nettoyées à l'eau douce ainsi que l'aquarium.

Remarque : si l'eau se trouble, elle doit être renouvelée immédiatement évitant ainsi le développement de contaminants bactériens.

2) Nourriture

Chaque matin, les balanes sont nourries avec 250ml par aquarium de *Tetraselmis sp.* Les 500ml restant sont distribués l'après-midi en même temps que les *Artemia* (voir I d).

En ce qui concerne les larves de balanes, la nourriture est constituée uniquement d'algues diatomées *Chaetoceros fragilis* environ 60ml/jour.

3) Culture d'algue

** stérilisation du matériel:*

L'eau de mer doit être filtrée sur 0,3µm et stérilisée ainsi que tout le matériel par autoclavage (20min à 120°C) afin d'éviter une contamination du milieu.

** composition du milieu:*

Les différentes solutions utilisées au laboratoire sont les suivantes :

- la solution mère de Conway :

FeCl ₃ 6H ₂ O	1,3g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36g
H ₃ BO ₃	33,6g
EDTA	45g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	20g
NaNO ₃	100g/l
Solution métaux	1ml
H ₂ O distillée et filtrée sur 0,2µg/ml : QSP	1 litre

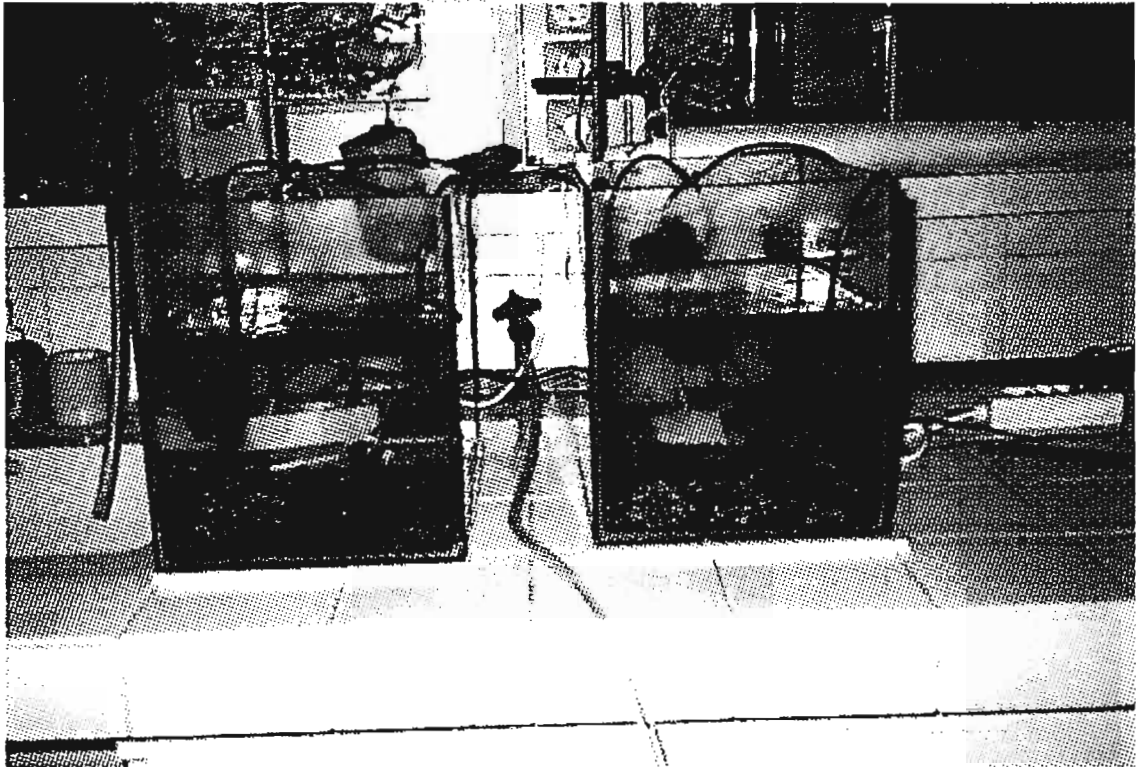


Photo 2 : aquarium de balanes

– La solution vitaminique :

Fredop	14ml
ampoules (4ml) B12 Gerda	2
ampoules (1ml) H Biotine Roche	2

– La solution de silicates :

Na ₂ SiO ₃	20g/l
----------------------------------	-------

Le milieu nutritif de Conway utilisé est constitué de la solution mère de Conway (1ml), d'une solution vitaminique (0,1ml) et de silicates (1ml) dans 1litre d'eau de mer.

** repiquage des algues:*

Le travail s'effectue sous hotte. A l'intérieur d'une bouteille d'eau de mer stérilisée de 1 litre sont versés : 0,1ml de vitamines, 1ml de solution mère de Conway et 1ml de silicates. Le mélange est ensuite homogénéisé par agitation.

L'entretien des *Tetraselmis sp.* se fait tous les huit jours, celui des *Chaetoceros fragilis* tous les quatre jours.

Pour les souches de *Tetraselmis sp.* et *Chaetoceros fragilis*:

1,5ml de suspension d'algue (1×10^6 cellules/ml) sont dilués dans des tubes de 15ml de milieu nutritif frais.

**culture en Erlenmeyer de 250ml :*

220ml de milieu de Conway sont prélevés à l'aide d'une éprouvette, puis les suspensions d'algues (25ml) sont transvasées directement dans chaque contenant.

Pour les fioles de 1 litre de *Tetraselmis sp.* :

100ml de suspension d'algues sont prélevés et versés directement dans 1litre de milieu de Conway en fiole de Fernbach (photo 3).

Note : un soin tout particulier doit être porté lors de la manipulation d'où la nécessité de travailler en milieu stérile.



Photo 3 : culture de *Tetraselmis sp.* en fiole de fernbach

* *paramètres de culture* :

A chaque espèce de microalgues correspondent des valeurs optimales précises des paramètres de culture :

- La lumière : quand les cultures sont peu concentrées les intensités lumineuses sont comprises entre 500 et 1000 lux. Pour les cultures concentrées, l'éclairage varie de 5000 à 10000 lux. La source lumineuse utilisée est le tube fluorescent.

- La température : celle-ci est importante car elle conditionne le taux de croissance. Pour *Tetraselmis sp.* la température est à 26°C de même pour les *Chaetoceros fragilis*.

- La salinité : elle est de 35g/l.

- L'aération par bullage : elle permet de brasser et d'homogénéiser le milieu et d'éviter la sédimentation des algues.

- La solution nutritive : il s'agit du milieu de Conway.

4) La ponte

Les larves sont recueillies par phototropisme après arrêt du bullage et addition des *Tetraselmis sp.*

Au bout de deux heures, les *nauplii* sont attirées vers une source lumineuse polarisée et recueillies à l'aide d'une pipette Pasteur. Le bullage est remis en route dès la fin de la récolte.

Après la ponte, les *nauplii* sont transvasées sur un tamis à plancton et rincées avec de l'eau de mer filtrée et stérilisée dans des bacs de 1 litre contenant des antibiotiques : Gentalline (36mg/l) et de l'Augmentin (21mg/l). Une faible aération est nécessaire.

Au bout de cinq jours, l'eau des bacs est filtrée sur un premier tamis à 265µm retenant les *nauplii* puis sur un deuxième à 160µm retenant les cyprides. A l'aide d'un entonnoir ils sont transférés dans une petite bouteille d'eau de mer stérile et conservés au réfrigérateur à 6°C pendant 11 jours au maximum.

Ces cyprides serviront à la réalisation du test de recherche d'activité antifouling au laboratoire.

CONCLUSION

Différentes techniques ont été acquises durant ce stage : élevage larvaire de crustacés, cultures de microalgues, essais de toxicité.

Elles ont été mises à profit pour étudier la toxicité de quelques extraits de spongiaires et de cultures de bactéries isolées de spongiaires qui présentent un intérêt potentiel en tant qu'antibiotique aquacole ou substance antifouling.

La toxicité relativement faible de ces substances permet d'envisager une étude plus approfondie de leur activité antibiotique sur des agents pathogènes aquacoles (vibriosis). Cependant l'un des extraits de culture bactérienne se montre particulièrement toxique et toute perspective d'utilisation en tant qu'antibiotique vétérinaire doit être proscrite.

L'étude de l'activité de cet extrait est poursuivie dans le domaine des antifouling. Sa toxicité est comparable à celle du sulfate de cuivre ($CL_{50} \approx 5 \mu\text{g/ml}$). Elle est largement inférieure à celle du tributylétain dont la toxicité a conduit à sa suppression du marché et à la recherche de substances de remplacement.

BIBLIOGRAPHIE

- 1974 " L'art du mouvement "
J.-Y. Cousteau, Encyclopédie Cousteau, Tome IV, ed. R. Lafont
- 1982 "Brine shrimp : a convenient bioessay for active plant constituents"
B.N. Meyer, N.R. Ferigni, J.E. Patnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. Mc Laughlin,
Planta medica **45**, 31-34
- 1986 "Manuel for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture"
P. Sorgeloos, P. Lavens, P. Leger, W. Tackaert and D. Versichele, FAO report, State
University of Ghent (Belgium)
- 1987 "Invertebrate zoology"
R D. Barnes, ed. CBS college publishing (fifth edition)
- 1992 "An investigation of larval barnacle attachment to bacterial films : an investigation
of physical properties"
J.S. Maki, D. Rittschoff, R. Mitchell
Microb. Ecol. **23**, 97-106
- 1992 "Fatty acids as antifoulants in a marine sponge"
R. Goto, R. Kado, K. Muramoto, H. Kamiya
Biofouling **6**, 61-68
- 1994 "A field guide to Crustaceans of Australian waters"
D S. Jones and G J. Morgan, ed. J. Young