

Méthode de marquage des spicules d'holothuries par fluorescence

Andrea Taylor¹

Résumé

Cet article présente les modifications apportées à la méthode utilisée actuellement dans le traitement des spicules d'holothuries marqués par fluorescence pour distinguer de leurs congénères naturels les individus produits en éclosérie et destinés à des programmes d'élevage en enclos marin ou de reconstitution et d'amélioration des stocks. Pour marquer les holothuries, on les plonge dans une solution de fluorochrome. Le produit est alors absorbé par les spicules calcaires en formation sur le tégument. Pour repérer le produit de marquage, il suffit de prélever un échantillon sur le tégument externe, puis de le plonger dans de l'eau de Javel afin d'éliminer les tissus mous. On peut ensuite observer les spicules au microscope à épifluorescence. Cette méthode exige toutefois de pratiquer cinq rinçages successifs à l'eau douce pour éliminer la Javel, ce qui prend beaucoup de temps, surtout si le nombre de prélèvements est important. Il existe une autre méthode, qui permet de neutraliser efficacement l'eau de Javel à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium, sans effet notable sur les échantillons. Cette méthode représente un gain de temps appréciable et contribue par ailleurs à réduire les risques de perte et de contamination croisée liés à la manipulation de multiples échantillons.

Introduction

Le marquage des invertébrés a fait la preuve de son utilité dans le cadre des études par marquage et recapture, dont l'objet est d'évaluer des paramètres tels que la croissance, les déplacements et les taux de survie des individus marqués. Il joue un rôle essentiel dans les pêcheries sauvages où sont introduits des animaux produits en éclosérie, le suivi et l'évaluation des programmes de lâchers exigeant en effet de pouvoir distinguer les individus d'élevage de leurs congénères naturels (Blankenship and Leber 1995).

La production en éclosérie d'holothuries destinées à des programmes de repeuplement, d'élevage en enclos marin ou d'amélioration des stocks (Juinio-Meñez *et al.* 2013 ; Purcell 2012 ; Purcell and Blockmans 2009 ; Purcell and Simutoga 2008) a nécessité la mise au point de méthodes adaptées de marquage et d'identification des individus marqués. Dans l'idéal, les méthodes de marquage devraient être à la fois durables et peu coûteuses, et permettre le repérage des individus marqués dans le milieu naturel sans effet sur leur croissance ou leurs déplacements (Purcell *et al.* 2008). Dans la pratique, les méthodes de marquage les plus courantes ont donné pour la plupart des résultats décevants chez les holothuries, en raison du faible taux de rétention des marques et du stress causé aux animaux (Conand 1990 ; Purcell *et al.* 2008 ; Purcell *et al.* 2006). Les marques à transpondeur passif intégré (PIT) utilisées depuis peu se sont révélées plus efficaces pour le marquage des individus les plus gros, mais beaucoup moins dans le cas des holothuries de petite taille (Gianasi *et al.* 2015). Elles se prêtent donc mal au lâcher à grande échelle de petites holothuries, en particulier s'il n'est pas nécessaire d'identifier des individus précis au sein de la cohorte considérée. Une nouvelle méthode de marquage fluorochromique des spicules calcaires du

tégument a été mise au point en 2006 (Purcell *et al.* 2006 ; Purcell and Blockmans 2009 ; Purcell and Simutoga 2008). C'est actuellement la méthode la mieux adaptée au marquage en grand nombre d'holothuries de petite taille. Le marquage fluorochromique est largement utilisé dans le cadre des recherches sur les juvéniles d'holothuries de sable *Holothuria scabra*, espèce commerciale de l'Indo-Pacifique (Conand 1990 ; Hamel *et al.* 2001), issus de l'aquaculture. Les animaux sont plongés dans une solution fluorochromique qui est absorbée par les spicules calcaires en formation sur le tégument. Les holothuries marquées puis lâchées dans le milieu marin peuvent ainsi être aisément distinguées de leurs congénères naturels. Malheureusement, l'identification des individus marqués ne peut s'effectuer qu'après recapture, et pas sur le terrain. Cette méthode peut également servir à l'identification d'individus précis dans le cadre d'études expérimentales. Il existe en effet différents types de fluorochromes qui donnent aux spicules des couleurs différentes, visibles au microscope à épifluorescence à l'aide de filtres optiques. On peut également effectuer un double marquage en utilisant plusieurs fluorochromes (Purcell and Blockmans 2009), ce qui facilite l'application de multiples traitements expérimentaux.

La détection des marqueurs s'effectue selon une méthode non destructive qui consiste à analyser des échantillons de très petite taille prélevés sur la face ventrale du tégument externe. On plonge d'abord les échantillons dans de l'eau de Javel (NaClO₂) afin de dissoudre les tissus et de dégager les spicules calcaires, qui sont ensuite rincés cinq fois de suite à l'eau douce. On sèche les spicules avant de les examiner au microscope à épifluorescence afin de déterminer la présence de fluorochrome (figure 6 dans Purcell 2012) (tableau 1).

¹ Darwin Aquaculture Centre, Department of Primary Industry and Fisheries, GPO Box 3000 Darwin NT 0801, Australie.
Tél. : 61 408303285 ; 61 8 89244261. Adresse : 23 Solomon St. Millner, Northern Territory, Australie 0810
Courriel : AndreaL.Taylor@nt.gov.au

Le rinçage des spicules, qu'il faut répéter cinq fois d'affilée afin d'éliminer toute trace de Javel, doit être effectué avec la plus grande minutie et prend donc beaucoup de temps, en particulier si le nombre d'échantillons à traiter est élevé (ce qui multiplie d'autant les risques de pertes ou de contamination croisée liés à la manipulation de multiples échantillons). Dans la mesure où il suffit de quelques spicules marqués sur un même échantillon pour confirmer la présence et la couleur du marqueur fluorochromique, la contamination croisée des spicules compromet fortement la fiabilité des résultats.

Cet article décrit les modifications apportées à la méthode originale (Purcell *et al.* 2006), telle qu'exposée en détail dans Purcell (2012) et Purcell and Blockmans (2009), afin d'en accroître l'efficacité et de réduire les risques de perte et de contamination croisée des échantillons.

Matériel, méthodes et résultats

La méthode modifiée consiste à substituer aux rinçages successifs à l'eau douce un simple bain dans une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Ce composé, qui a pour propriété de neutraliser le chlore dans l'eau (DAFF 2008 ; McCauley and Scott 1960 ; OIE 2003), est couramment utilisé dans les éclosiers pour éliminer la Javel contenue dans l'eau de stérilisation. On trouvera au tableau 1 un descriptif comparatif détaillé de la méthode modifiée et de la méthode décrite par Purcell (2012) et Purcell et Blockmans (2009), ainsi que des notes explicatives techniques.

Conformément aux recommandations de Purcell et Blockmans (2009), on utilise du papier aluminium

pendant toute la durée des opérations de marquage, afin de réduire l'exposition à la lumière et la photodégradation du marqueur fluorescent. Les pipettes doivent être nettoyées avec le plus grand soin après chaque utilisation. À défaut, on peut utiliser une micropipette à embout jetable afin d'éviter la contamination croisée des spicules.

Les prélèvements peuvent être placés sur des microplaques, comme indiqué, ou dans des fioles de type Eppendorf. Les microplaques ont pour avantage de faciliter les observations directes au microscope (à condition qu'un microscope adapté soit disponible), puisqu'il n'est pas nécessaire de transférer les spicules sur des lames pour observer les marqueurs fluorochromiques au microscope. En l'absence de microplaques, on peut utiliser des fioles Eppendorf de 2 ml, en particulier si le nombre d'échantillons à traiter est limité. Pour éviter d'avoir à rincer soigneusement les pipettes après chaque utilisation, ou pour réduire le nombre de pipettes jetables à utiliser, on peut aussi décanter le liquide contenu dans les fioles à chaque étape du processus, au lieu de l'extraire à l'aide d'une pipette. Ce procédé augmentant les risques de perte de spicules, il est préférable de travailler sur des échantillons de grande taille (5 à 8 mm²), comme le préconisent Purcell et Blockmans (2009). Les spicules traités dans des fioles sont ensuite déposés sur des lames à l'aide d'une micropipette à embout jetable, puis séchés avant d'être examinés au microscope à épifluorescence. L'utilisation d'échantillons de grande taille permet aussi de déposer un plus grand nombre de spicules sur chaque lame, ce qui en facilite l'observation (les échantillons traités en fioles étant moins concentrés que ceux placés dans des microplaques). L'expérience montre que le prélèvement d'échantillons mesurant au maximum

Tableau 1. Descriptif comparatif de la méthode modifiée de traitement des spicules d'holothuries marqués par fluorescence et de la méthode originale décrite par Purcell (2012);

Méthode originale	Méthode modifiée
Prélever sur la face ventrale du tégument externe et déposer dans un puits de microplaque un échantillon de 2,5 à 5 mm ² . Conserver l'échantillon dans de l'alcool tamponné.	Prélever sur la face ventrale du tégument externe et déposer dans un puits de microplaque un échantillon de 2,5 à 5 mm ² . Conserver l'échantillon dans de l'alcool tamponné s'il n'est pas traité immédiatement.
Retirer l'alcool.	Retirer l'alcool.
Ajouter de l'eau de Javel et laisser tremper pendant 30 min jusqu'à dissolution complète des tissus.	Ajouter 12 % d'eau de Javel et laisser tremper pendant 30 min jusqu'à dissolution complète des tissus. Attendre que les spicules se déposent au fond du puits.
Retirer l'eau de Javel.	Extraire la javel à l'aide d'une pipette, en laissant au maximum 0,5 ml de liquide au fond du puits, de manière à recouvrir les spicules.
Ajouter de l'eau douce, puis retirer le liquide.	Ajouter du thiosulfate de sodium (50 g L ⁻¹) et bien mélanger. Attendre que les spicules se déposent au fond du puits avant de retirer la solution à l'aide d'une pipette.
Remettre de l'eau douce, puis rincer.	Ajouter de l'eau douce, attendre que les spicules se déposent, puis retirer le liquide à l'aide d'une pipette.
Remettre de l'eau douce, puis retirer le liquide.	Laisser l'échantillon sécher avant de l'observer au microscope à épifluorescence.
Remettre de l'eau douce, puis retirer le liquide.	
Remettre de l'eau douce, puis retirer le liquide.	
Laisser l'échantillon sécher avant de l'observer au microscope à épifluorescence.	

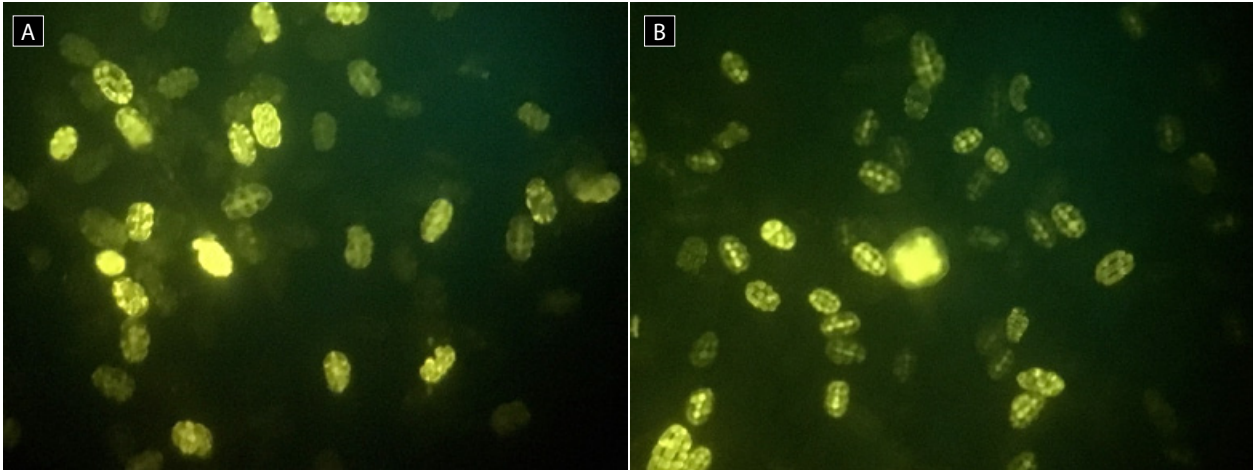


Figure 1. Des spicules d'holothurie *Holothuria scabra* marqués à la tétracycline et traités selon la méthode originale (A) et la méthode modifiée (B), observés au microscope à épifluorescence.

5 mm² sur des holothuries de petite taille et 10 mm² au plus sur les animaux les plus gros ne provoque pas d'infection bactérienne, et que les tissus cicatrisent rapidement chez tous les individus (A. Birch, données non publiées ; C. Hair, comm. pers.).

La dernière étape, à savoir le rinçage à l'eau douce, qui a pour objet d'éliminer la majeure partie de la solution de thiosulfate de sodium, a été intégrée à la méthode modifiée à titre de précaution. Les essais à venir montreront peut-être qu'elle n'est pas nécessaire. Il faudra, dans ce cas, déterminer quels pourraient être les effets de la suppression de cette dernière étape sur les échantillons, à court et long terme.

Les deux méthodes ont été testées sur des échantillons prélevés sur les mêmes individus, de manière à en évaluer les effets respectifs sur le résultat final. Aucune différence notable n'a pu être observée au microscope à épifluorescence, en ce qui concerne tant le nombre que la luminescence des spicules marqués (voir figure 1), et les échantillons séchés étaient encore fortement fluorescents après trois ans de conservation (dans l'obscurité).

La méthode modifiée a été utilisée pour traiter les spicules de plusieurs spécimens de *H. scabra* marqués à la tétracycline et à la calcéine dans le cadre de lâchers expérimentaux menés dans le Territoire du Nord, en Australie (A. Birch, données non publiées). Les tests réalisés avec de la calcéine bleue ont également été probants (C. Hair, comm. pers.). Outre qu'elle permet de limiter les risques de perte ou de contamination croisée des échantillons, la méthode modifiée contribue aussi à réduire le temps de traitement, favorisant le développement des protocoles de marquage des holothuries. Grâce à cette méthode, on devrait pouvoir traiter un plus grand nombre d'échantillons dans le cadre des campagnes de marquage et de recapture des holothuries.

Remerciements

L'auteur tient à remercier Cathy Hair et Steven Purcell des observations qu'ils ont bien voulu lui soumettre pendant la rédaction de cet article, et remercie également de son soutien le Darwin Aquaculture Centre de la Direction du secteur primaire et des pêches du Territoire du Nord. L'étude a été réalisée dans le cadre du projet FIS/2010/042, « Expansion et diversification des systèmes de production et de gestion des holothuries aux Philippines, au Viet Nam et en Australie septentrionale » du Centre australien pour la recherche agricole internationale (ACIAR), dont l'exécution a été confiée à l'Université de la Sunshine Coast.

Bibliographie

- Blankenship H.L. and Leber K.M. 1995. A responsible approach to marine stock enhancement. *American Fisheries Society Symposium* 15:167-175.
- Conand C. 1990. The fishery resources of Pacific Island countries. *FAO Fisheries Technical Paper*. Rome, FAO. Part 2: Holothurians.
- DAFF (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry). 2008. Operational procedures manual — Decontamination (Version 1.0). Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVETPLAN), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, ACT.
- Gianasi B.L., Verkaik K., Hamel J.-F. and Mercier A. 2015. Novel use of PIT tags in sea cucumbers: Promising results with the commercial species *Cucumaria frondosa*. *PLoS ONE*, 10(5), e0127884. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0127884>
- Hamel J.-F., Conand C., Pawson D.L. and Mercier A. 2001. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and exploitation as beche-de-mer. *Advances in Marine Biology* 41:129-233.

- Juinio-Meñez M.A., Evangelio J.C., Olavides R.D., Paña M.A.S., De Peralta G.M., Edullantes C.M.A., Rodriguez B.D.R. and Casilagan I.L.N. 2013. Population dynamics of cultured *Holothuria scabra* in a sea ranch: Implications for stock restoration. *Reviews in Fisheries Science* 21(3-4):424-432.
- McCaughey R.W. and Scott D.P. 1960. Removal of free chlorine from running water by sodium thiosulphate. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 17.4:601.
- OIE (World Organisation for Animal Health). 2003. Methods for disinfection of aquaculture establishments. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003*. World Organisation for Animal Health, Paris.
- Purcell S.W. 2012. Principles and science of stocking marine areas with sea cucumbers. p. 92-103. In: Hair C.A., Pickering T.D. and Mills D.J. (eds). *Asia-Pacific tropical sea cucumber aquaculture*. ACIAR Proceedings No. 136. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra. <http://aciarc.gov.au/publication/PR136>
- Purcell S.W. and Blockmans B.F. 2009. Effective fluorochrome marking of juvenile sea cucumbers for sea ranching and restocking. *Aquaculture* 296:263-270.
- Purcell S.W. and Simutoga M. 2008. Spatio-temporal and size-dependent variation in the success of releasing cultured sea cucumbers in the wild. *Reviews in Fisheries Sciences* 16:204-214.
- Purcell S., Agudo N. and Gossuin H. 2008. Mauvais pourcentage de rétention des marques à micropuce apposées sur des holothuries tropicales. *La bêche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 28:53-55.
- Purcell S.W., Blockmans B.F. and Nash W.J. 2006. Efficacy of chemical and physical tags for large-scale release of an exploited holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334:283-293.