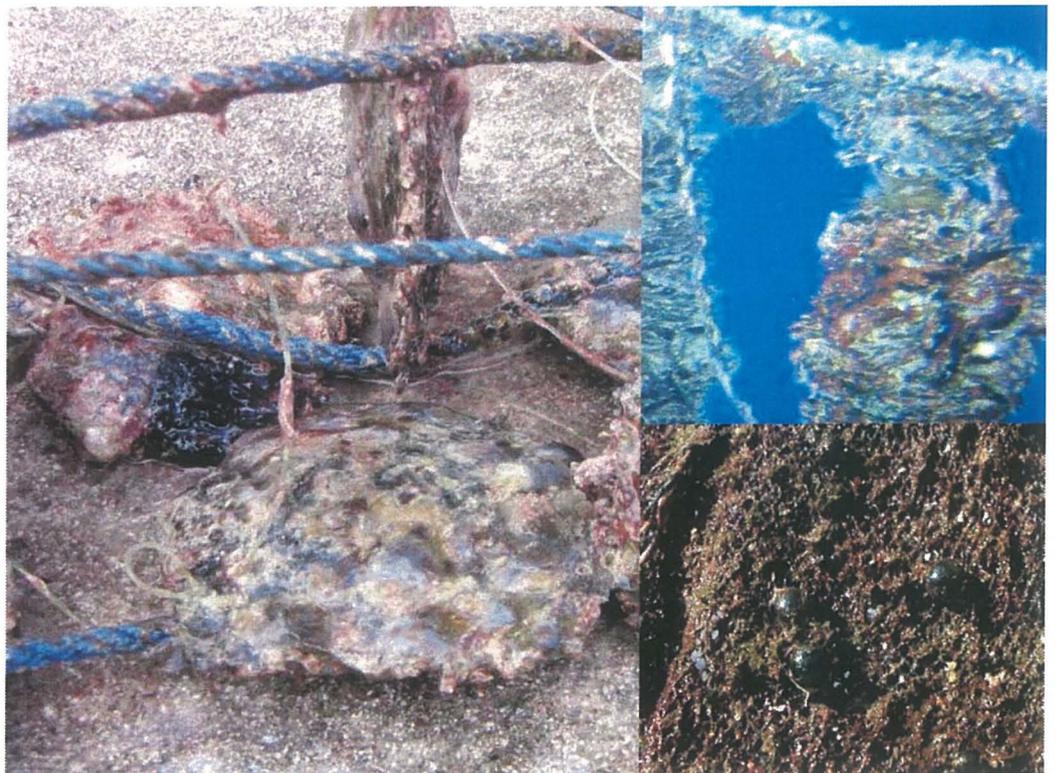


Pierre Garen, Jérôme Tiapari
février 2005

Rapport final de la Convention N° 4.0081

**Test du potentiel antisalissure de certaines macromolécules
exopolysaccharides pour l'élevage d'huîtres perlières**



SOMMAIRE

1 INTRODUCTION	2
2 ETAT DE L'ART	4
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	6
3.1 Facteur testé : activité des molécules.	6
3.2 Préparation des traitements :	6
3.3 Support des molécules :	7
3.4 Expérience 1	7
3.5 Expérience 2	9
3.6 Expérience 3	9
4 RÉSULTATS	11
4.1 Expérience 1	11
4.2 Expérience 2	11
4.3 Expérience 3	15
5 DISCUSSION ET CONCLUSION	19

1 Introduction

L'élimination des salissures biologiques recouvrant les huîtres est devenue indispensable dans la plupart des fermes perlières de Polynésie pour maintenir de bonnes conditions d'élevage. Le phénomène massif de biosalissure est dû au développement sur les coquilles des huîtres perlières et sur les structures d'élevage immergées d'espèces épibiontes animales et végétales. Ces nombreuses espèces ont été décrites sur *P. margaritifera* par Leca (1992).

Les bivalves en élevage sont souvent fortement colonisés par les biosalissures qui affectent de manière négative leurs performances (Claereboudt et al., 1994). Il a été montré que les biosalissures réduisaient également la croissance et la survie des huîtres perlières en élevage, *P. fucata* (Mohammad, 1976) et *P. margaritifera* (Doroudi, 1994). Les espèces épibiontes sont en effet commensales, compétitrices ou parasites et elles peuvent, ensemble, réduire fortement la circulation d'eau autour des animaux élevés, donc diminuer l'apport de nourriture et la disponibilité d'oxygène. Les équipements immergés souffrent de l'excès de charge dû à la masse des biosalissures et leur structure est progressivement dégradée.

La lutte antisalissure en perliculture se limite actuellement à des opérations de nettoyage plus ou moins fréquentes selon les atolls et les fermes. Le nettoyage est essentiellement réalisé par brossage et jet d'eau surpressée. Moins fréquemment des bains sursalés sont utilisés. L'action des poissons consommateurs naturels des épibiontes peut également être favorisée. Une nouvelle méthode utilisant l'ébouillantage de courte durée a été définie et est en cours de validation et de transfert à la profession. Toutes ces méthodes sont coûteuses et peuvent être stressantes pour les huîtres. Une autre manière d'envisager la lutte contre les biosalissures est d'en empêcher ou d'en limiter la formation.

Le développement de biosalissures est un phénomène naturel qui se produit dès qu'une surface solide quelconque est plongée dans un environnement aquatique. Il s'y forme d'abord très rapidement une pellicule primaire constituée majoritairement de macromolécules organiques. Puis se produisent deux étapes d'adhésion bactérienne, la première réversible et la seconde irréversible. La fixation des organismes supérieurs tels que microalgues, diatomées, larves, etc. vient ensuite.

L'objectif recherché dans cette étude est d'empêcher l'adsorption de la pellicule primaire ou l'adhésion bactérienne par l'utilisation de molécules exopolysaccharides dont nous évaluerons le potentiel. Ces molécules synthétisées naturellement par des microorganismes présentent des propriétés antibactériennes ou antimicrobiennes et peuvent maintenant être produites en grande quantité par biotechnologie.

Il a été prévu de mener cette étude du potentiel antisalissure des exopolysaccharides sur 2 années en trois phases. Ce sont :

- la sélection des molécules au laboratoire : cette phase consiste à évaluer sur supports inertes l'efficacité de quelques EPS à empêcher la formation de la bio-pellicule primaire.

- la vectorisation des EPS sélectionnés : il s'agit de vérifier l'efficacité de ces molécules après incorporation dans des matrices devant permettre leur mise en œuvre progressive.
- les tests d'efficacité sur huîtres perlières *in situ*, conditionnée à l'obtention de résultats positifs en phases A et B.

Les participants à cette étude sont le Laboratoire Domestication de l'Huître Perlière (LDHP / Ifremer Tahiti), le Laboratoire Biotechnologies et Molécules Marines (LBMM / Ifremer Brest) et le Service de la Perliculture de Polynésie Française.

L'objet de ce premier rapport est de décrire le travail réalisé pour la présélection des molécules actives.

2 Etat de l'art

La biosalissure peut être définie comme le processus d'adsorption, de colonisation et de développement de matériel vivant sur un substrat immergé. Les différents aspects de ce processus sont bien documentés (Butler & Connolly, 1996 ; Judge & Craig, 1997 ; Wahl, 1989). La recherche dans ce domaine s'est accélérée ces quinze dernières années et Clare (1996) a établi une liste des composés présentant en bioessai une activité inhibitrice envers les organismes biosalissant. Plusieurs substances isolées se sont révélées antibactériennes et antifongiques. Leurs effets antisalissures ne sont pas exclus parce que bactéries et champignons jouent un rôle clé dans les phases initiales du processus de biosalissure.

Ce travail est basé sur les résultats obtenus lors des études menées depuis plusieurs années au Centre Ifremer de Brest sur les exopolysaccharides bactériens. Les polysaccharides sont de longues molécules formées de l'enchaînement de motifs similaires de glucides. Leur diversité de structure offre un large spectre de propriétés fonctionnelles. Le criblage des souches bactériennes productrices de polysaccharides a été réalisé par le LBMM à partir de la collection obtenue durant plusieurs campagnes océanographiques. Cette collection comprend actuellement plus de 1500 isolats et plus de 25 molécules de nature polysaccharidique ont été à ce jour identifiées. Les bactéries qui les produisent appartiennent majoritairement aux genres *Alteromonas* et *Vibrio*. Les propriétés mises en évidence sur ces polysaccharides sont des activités anti-microbiennes aux possibilités d'applications dans les domaines médical et de l'environnement. Ces molécules peuvent également avoir des actions de nature physico-chimique comme une modification des paramètres de mouillabilité des surfaces.

Des expérimentations conduites en milieu marin synthétique et en milieu marin naturel sur des monocultures et des cocultures de souches bactériennes isolées du milieu marin ont montré leur influence très sensible sur la formation du biofilm. Cette action est illustrée dans les deux photo de la figure 1 ci-dessous (Ifremer / LBMM) :

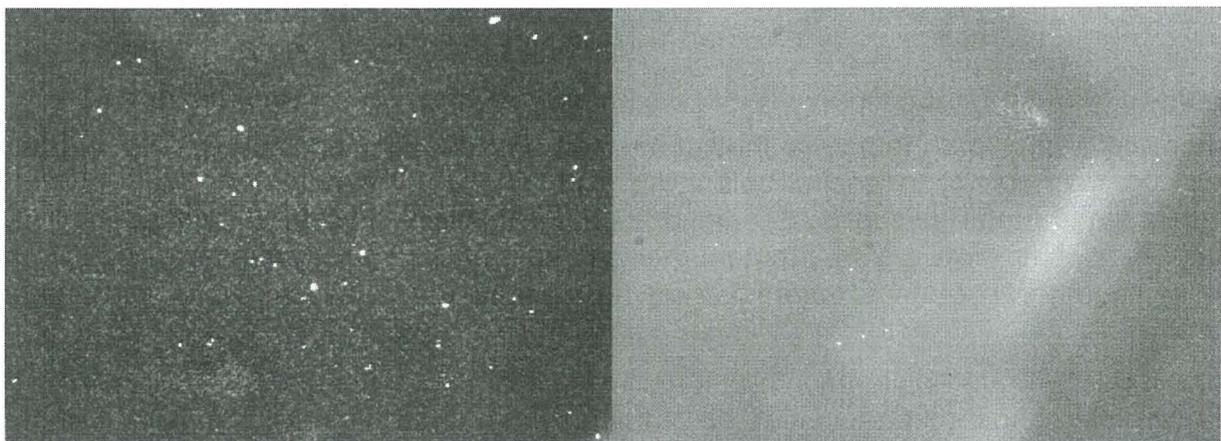


Fig. 1 : Effet d'un enrobage d'EPS sur la mise en place des biosalissures. On voit à gauche la présence d'un biofilm sur une surface exposée 4 jours en milieu marin naturel. A droite rien n'apparaît sur une surface exposée dans les mêmes conditions mais traitée préalablement par un film (200 Å) de biopolymère.

Une série de tests préliminaires qualitatifs a également été conduite en 2003 au COP. Les quelques molécules testées sur support inerte ont montré alors une influence significative sur l'inhibition de la formation de la bio-pellicule primaire après 18 jours d'immersion en milieu marin naturel.

3 Matériel et méthodes

Les essais ont été conduits en plusieurs étapes au « laboratoire » au Centre Océanologique du Pacifique sur des supports inertes immergés en eau de mer naturelle renouvelée.

3.1 Facteur testé : activité des molécules.

Sept molécules EPS ont été testées. Elles ont été préparées au Laboratoire Ifremer / BMM de Brest et mises à disposition au LDHP de Tahiti. Elles ont gardé pour les essais leur identification du LBMM :

716 – 785 – 800 – 907 – 941 – 1545 – 1644.

Ces molécules ont été testées à deux concentrations 0,1 et 0,5 %, en 3 réplicats par concentration. Un témoin non traité (pas de molécule EPS) a été préparé pour chaque concentration de chaque molécule.

L'activité potentielle des sept molécules EPS a été testée sur 5 durées d'immersion pour chaque concentration : effets à 6h, 24h, 48h, 72h, 5jours.

3.2 Préparation des traitements :

Les EPS à notre disposition étaient présentés sous la forme d'une mousse solide et légère (Fig. 2). Ils ont été dilués en eau de mer filtrée à 0,22 μ , à température ambiante avec agitation. Les dilutions à 0,1 et 0,5 % ont été préparées avec 0,1 et 0,5 g de produit dans 100 ml d'eau. Les quatorze solutions ainsi obtenues peuvent être conservées plusieurs jours à 4°C ou plusieurs semaines congelées.



Fig. 2 : Molécule d'EPS sous forme sèche

3.3 Support des molécules :

Des lames de verre pour microscopie (26 x 75 mm) avec bande de marquage ont été utilisées comme supports des molécules à tester. Elles ont été identifiées par le numéro et la concentration de la molécule et par leur temps d'immersion programmé en eau de mer. Les lames ont été trempées dans les solutions préparées d'EPS avec un légère agitation, puis mises à sécher une heure à l'air ambiant (température < 30°C) avant d'être immergées pour l'essai.

Les problèmes rencontrés dans la lecture des résultats ont révélé plusieurs difficultés dans la définition de la méthodologie d'expérience. Elles nous ont conduit à réaliser successivement trois essais expérimentaux dont les conditions particulières sont décrites ci-après.

3.4 Expérience 1

Les lames ont été trempées 30 secondes dans les solutions de polymère.

Enceintes d'essais

Des petits bacs (volume de 1,6 l) ont été fabriqués à partir de demi-tuyaux de PVC (Fig. 3). Les lames de verre recouvertes des molécules à tester ont été disposées dans les bacs, alignées sur leur plus grande tranche, perpendiculairement au sens d'écoulement de l'eau (Fig. 4). Un renouvellement minimum de 100% par heure en eau de mer naturelle a été assuré de manière continue dans chaque bac. Un bac a été utilisé pour chaque traitement (chaque concentration de chaque molécule) de manière à éviter d'éventuelles contaminations entre traitements. Ces bacs ont été placés en salle à température ambiante sous un éclairage naturel.



Fig. 3 : Bacs dans lesquels ont été disposées les lames recouvertes d'EPS – Expérience 1.



Fig. 4 : Lames sur leurs supports dans un bac expérimental – Expérience 1.

Lecture des résultats

La salissure des lames a été évaluée après des durées d'immersion de 6, 24, 72 heures et 5 jours. Pour chacun des 14 traitements, 4 lames (3 traitées et 1 témoin) ont été sorties de l'eau et préparées de la façon suivante pour la lecture.

Les lames ont été doucement rincées par trempage dans l'eau distillée et une de leurs faces a été entièrement nettoyée. Elles ont été ensuite égouttées puis plongées, encore humides, dans une solution de coloration. Deux fluorochromes permettant de colorer les acides nucléiques et d'indiquer les cellules vivantes ont été employés, DAPI ou Acridine orange. La coloration DAPI a été faite par trempage des lames de 10 minutes en solution à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. La coloration Acridine orange a été obtenue par trempage de 15 minutes en solution aqueuse à 1/1000 diluée à 10% en tampon de Krebs – Ringer. Les lames ont été après coloration doucement rincées une deuxième fois à l'eau distillée, égouttées puis recouvertes d'une lamelle. La conservation des lames est possible en congélation à -20°C .

L'observation des lames, sur lesquelles sa été déposée une goutte d'huile, a été faite en microscopie à épifluorescence (Leica Dialux 22) Sous une longueur d'onde d'excitation de 400 nm, le DAPI, lié à l'ADN, fait ressortir les cellules vivantes en bleu . L'acridine orange liée à l'ARN les fait apparaître en orange. Entre 5 et 7 champs ont été photographiés par lame observée et les images numérisées ont été enregistrées de manière à permettre une analyse d'image ultérieure pour quantifier la couverture épibionte.

3.5 Expérience 2

Les lames ont été trempées 30 secondes dans les solutions de polymère.

Enceintes d'essais

Les mêmes bacs de 1,6 l en PVC que dans l'expérience précédente ont été utilisés pour disposer les lames de verre. Le même renouvellement d'eau de mer naturelle a été employé et un bac a été mis en œuvre par traitement.

Les 14 bacs ont été placés dans un bassin extérieur en béton, aux parois peintes en blanc pour permettre une luminosité maximale et assurer une protection contre le vent et d'éventuels apports extérieurs.

Lecture des résultats

Les lames ont été sorties de l'eau pour lecture à 24h, 48h, 72h et 5 jours. Elles ont été délicatement rincées par trempage dans l'eau distillée et une de leurs faces a été entièrement nettoyée. Elles ont été ensuite égouttées puis plongées, encore humides, pour coloration dans une solution d'acridine orange (trempage de 15 minutes en solution au 1/1000 diluée à 10% en tampon de Krebs - Ringer). Les lames ont été après coloration doucement rincées à l'eau distillée et égouttées puis séchées en armoire ventilée à température ambiante. La conservation des lames est possible en congélation à -20°C .

L'observation des lames a été faite par numérisation au scanner (Epson 1660 Photo). Huit lames correspondant à une molécule et à une durée d'immersion ont été placées simultanément sur la vitre du scanner réglé en mode « Film transparent positif » et les images numérisées à 400 dpi ont été enregistrées.

Une analyse d'image a pu être réalisée ultérieurement à l'aide du logiciel d'analyse Image J®. La méthode suivante a été employée pour quantifier la couverture épibionte sur les lames. La longueur des images est de 760 points. Un trait horizontal de 616 points a été tracé de façon similaire sur chaque image de lame. La mesure des niveaux de gris, correspondant au degré de salissure, a été réalisée à chaque point le long de ce trait. Une mesure a été faite par lame, donc trois par traitement et deux mesures par témoin pour chaque molécule. L'analyse statistique des données a été menée par Anova sous XLSTAT-Pro®.

3.6 Expérience 3

Les lames ont été trempées 2 minutes dans les solutions de polymère.

Enceintes d'essais

Les lames de verre recouvertes des molécules à tester ont été disposées dans deux casiers ostréicoles Aquatray® fermés en plastique. Elles ont été collées en position horizontale sur une de leurs faces par un point de silicone (Fig. 5). Les casiers ont été immergés à 1,5 m de profondeur dans le lagon de Vairao, amarrés au ponton Ifremer (Fig. 6).

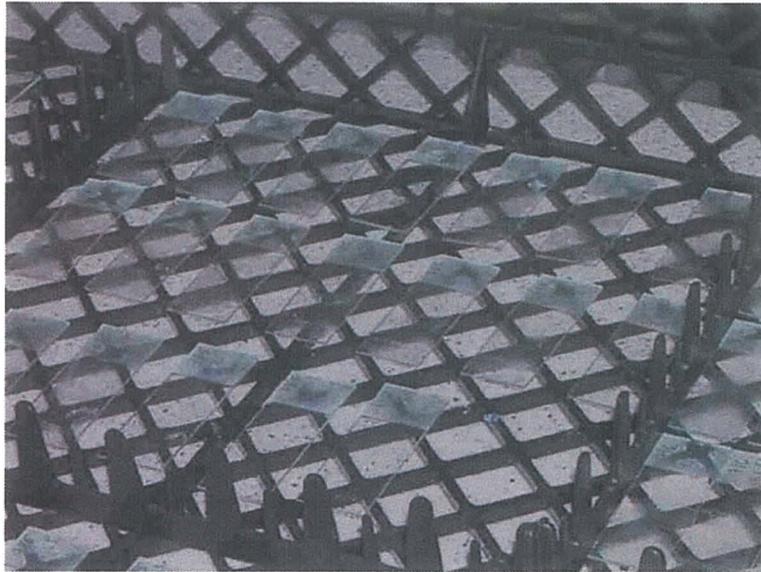


Fig. 5 : Lames traitées disposées en casier plastique avant immersion - Expérience 3.



Fig. 6 : Casier contenant les lames traitées EPS immergé dans le lagon - Expérience 3.

Lecture des résultats

Les lames ont été sorties de l'eau pour lecture à 24, 48, 72 heures, 5 et 34 jours. Elles ont été nettoyées comme dans l'expérience 2. L'observation des lames non colorées a été faite par numérisation au scanner selon les mêmes critères que précédemment.

Une analyse d'image a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse Image J[®] et la couverture épibionte sur les lames a été estimée selon la même méthode employée précédemment.

4 Résultats

4.1 Expérience 1

La coloration au DAPI a été réalisée sur les lames immergés pendant 6, 24, 72 heures et 5 jours. Les premières observations en microscopie à épifluorescence des lames immergées le plus longtemps ont révélé la présence de salissures. Elles ont surtout montré une fluorescence très faible en intensité et en couleur (Fig. 7), quel que soit le traitement examiné. La sélection des champs à photographier en a été très difficile et n'a pas pu être faite au hasard. Les zones fluorescentes peu démarquées du reste du champ n'ont pas pu être délimitées ni mesurées. Toutes les lames n'ont donc pas été observées ni photographiées.

La coloration à l'acridine orange a été menée sur des lames immergées pendant 5 jours. Les observations ont également mis en évidence la difficulté de détection des zones fluorescentes, malgré une fluorescence d'intensité et de coloration (orange) un peu plus marquées. Une grande variabilité des zones fluorescentes a été notée entre champs, sur tout traitement (Fig. 8). Une mesure standardisée des zones de salissure n'a pas pu être réalisée et toutes les lames n'ont pas été observées ni photographiées.

4.2 Expérience 2

Toutes les lames ont subi la coloration à l'acridine orange et ont ensuite été numérisées. Le mode de mesure réalisé en niveaux de gris a permis de comparer la salissure des lames aux différents traitements. La comparaison des témoins à 2 et 5 jours d'immersion (Fig. 9) a montré la pousse des biosalissures sur les lames durant cette période, avec une différence hautement significative au seuil de 95%.

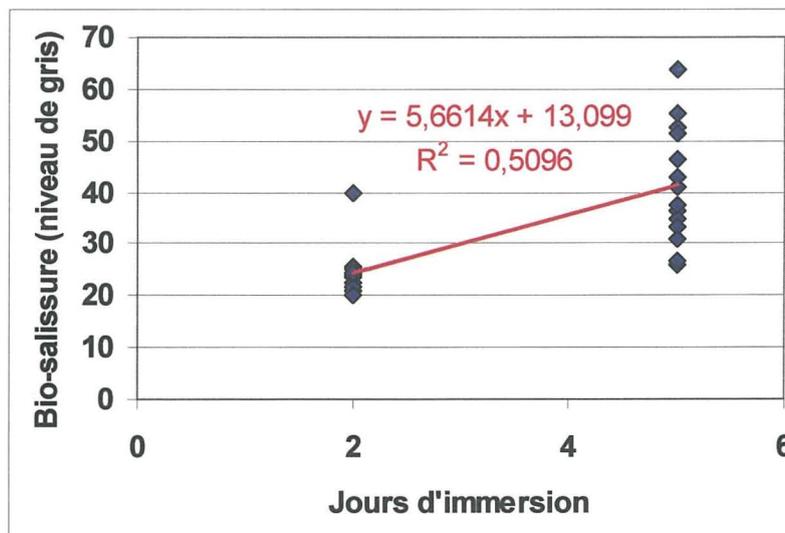
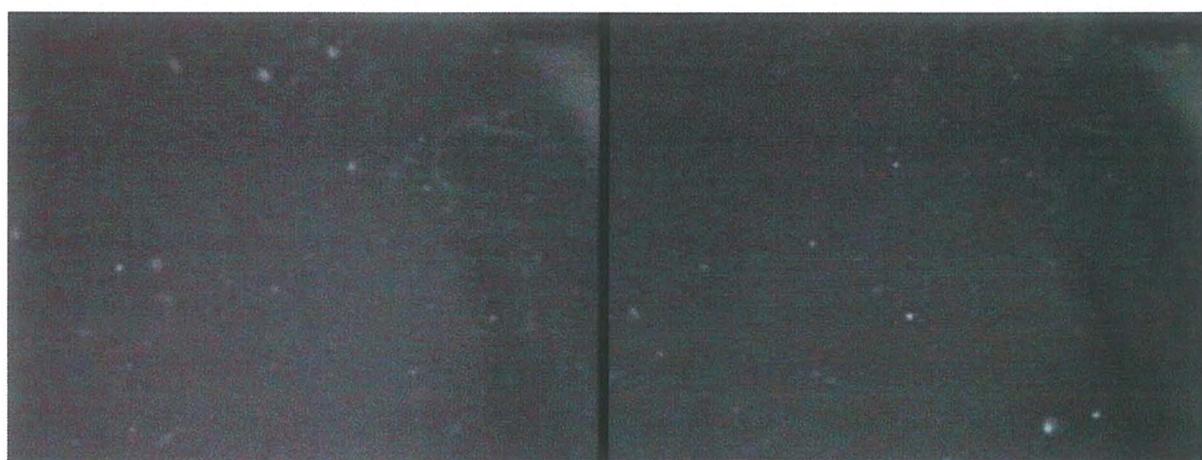
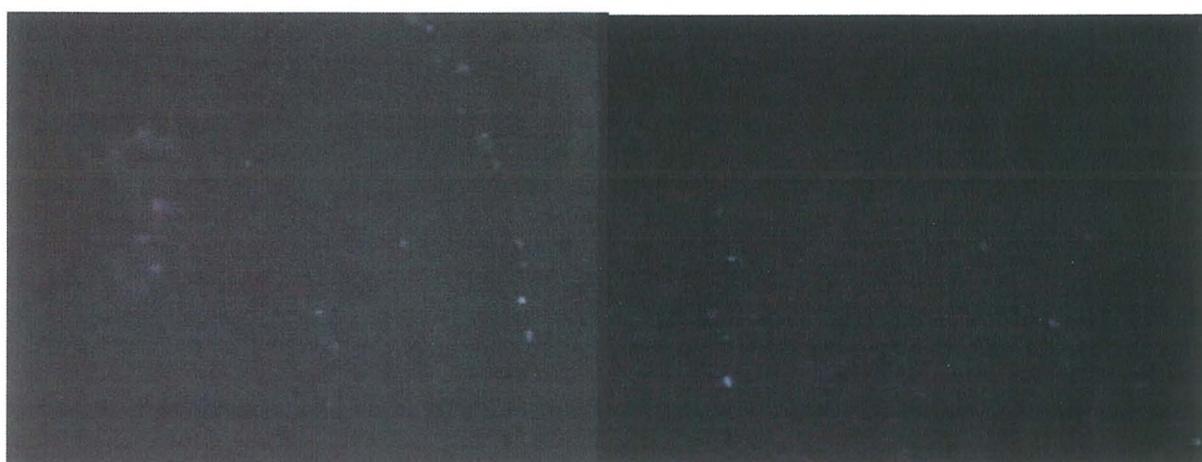


Fig. 9 : Évolution du niveau de salissure sur les témoins entre 2 et 5 jours - Expérience n°2.



Témoins 5j. DAPI



Témoins 72h. DAPI



n°800 - 0,5 % 72h. DAPI

Fig. 7 : Exemples de champs photographiés en microscopie à épifluorescence, DAPI, x 2,5.

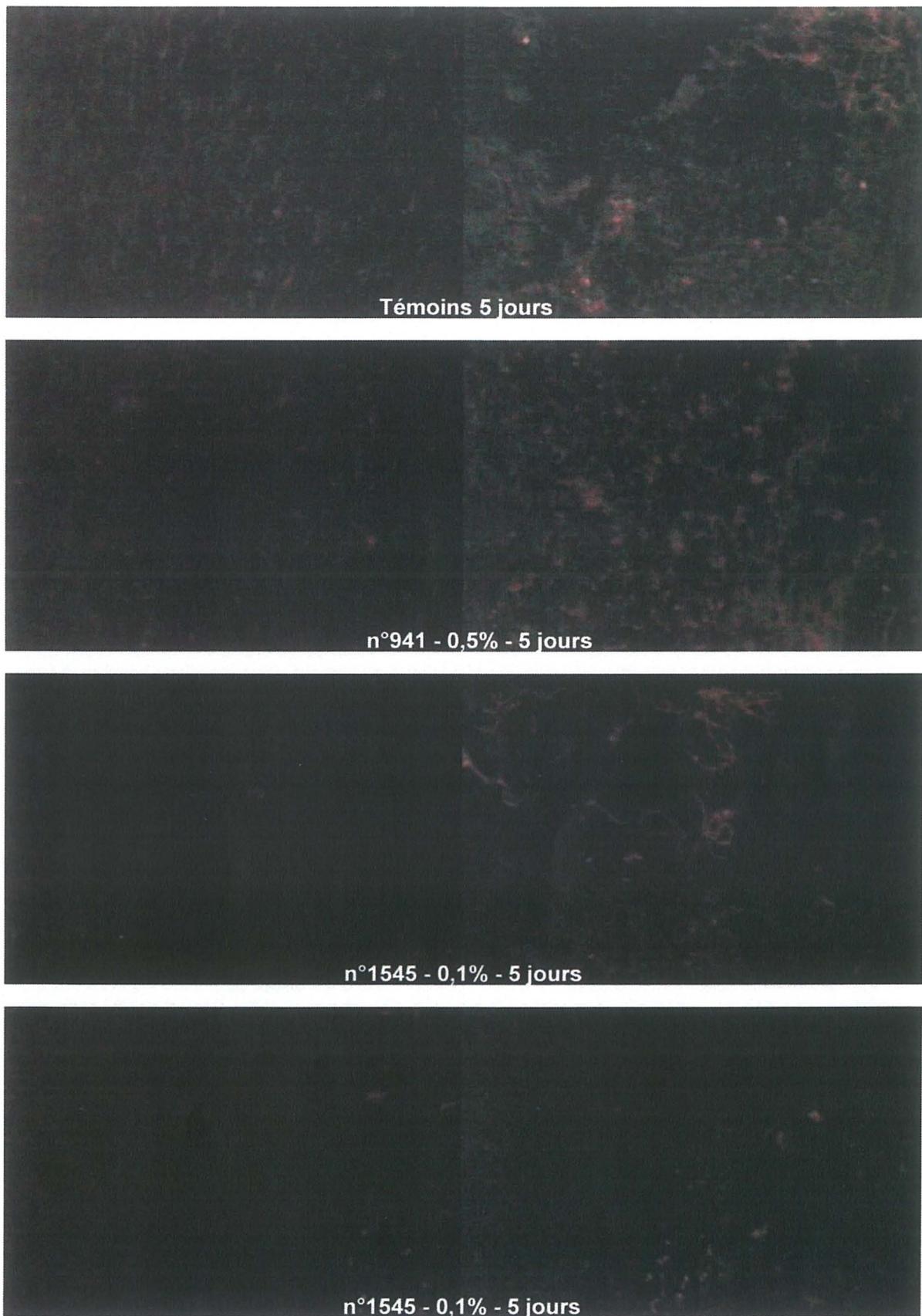


Fig. 8 : Exemples de champs photographiés en microscopie à épifluorescence, x 2,5. La coloration à l'acridine orange a été réalisée sur les lames immergées pendant 5 jours.

Pour une durée d'immersion de 2 jours (Fig. 10), les valeurs de biosalissure (valeurs de gris) ont varié dans la même gamme entre 20,2 et 39,7 ; 20,5 et 28,4 ; 24,7 et 53,8 pour les témoins, les EPS 0,1% et les EPS 0,5% respectivement. La salissure dans ce cas est toujours apparue plus élevée sur les lames traitées à la plus forte concentration d'EPS.

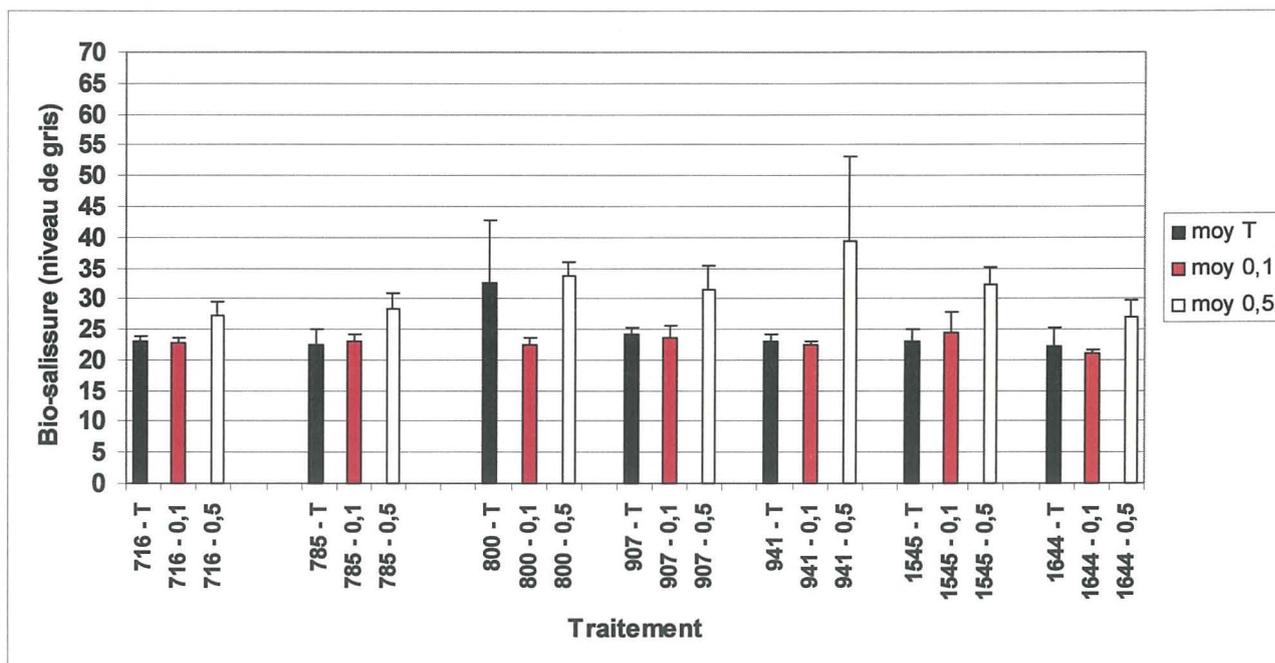


Fig. 10 : Niveau de salissure des lames (moy. + écart type) en fonction du traitement pour une durée d'immersion de 2 jours - Expérience n°2.

Après 5 jours d'immersion (Fig. 11) les valeurs de biosalissure ont évolué dans la même gamme entre 25,8 et 63,8 ; 24,9 et 53,1 ; 33,0 et 63,3 pour les témoins, les EPS 0,1% et les EPS 0,5% respectivement. La variabilité des valeurs mesurées est plus élevée que pour 2 jours d'immersion. Les valeurs des traitements à 0,5% ont encore été de manière générale les plus élevées, sauf pour l'EPS n°785.

Une Anova à trois facteurs - durée d'immersion, molécule, concentration - a été réalisée (Table 1). Le modèle global a confirmé une différence hautement significative sur la durée d'immersion et pas de différence sur le type de molécule EPS. Une différence significative a été mise également en évidence sur la concentration de polymère testée. L'analyse des différences entre les groupes (test de Bonferroni à 95%) a montré une différence hautement significative entre 0,5% et 0,1% ($p < 0,0001$) et très significative entre 0,5% et le témoin ($p = 0,002$). Il n'y a pas eu de différence significative entre 0,1% et témoin ($p = 0,034$).

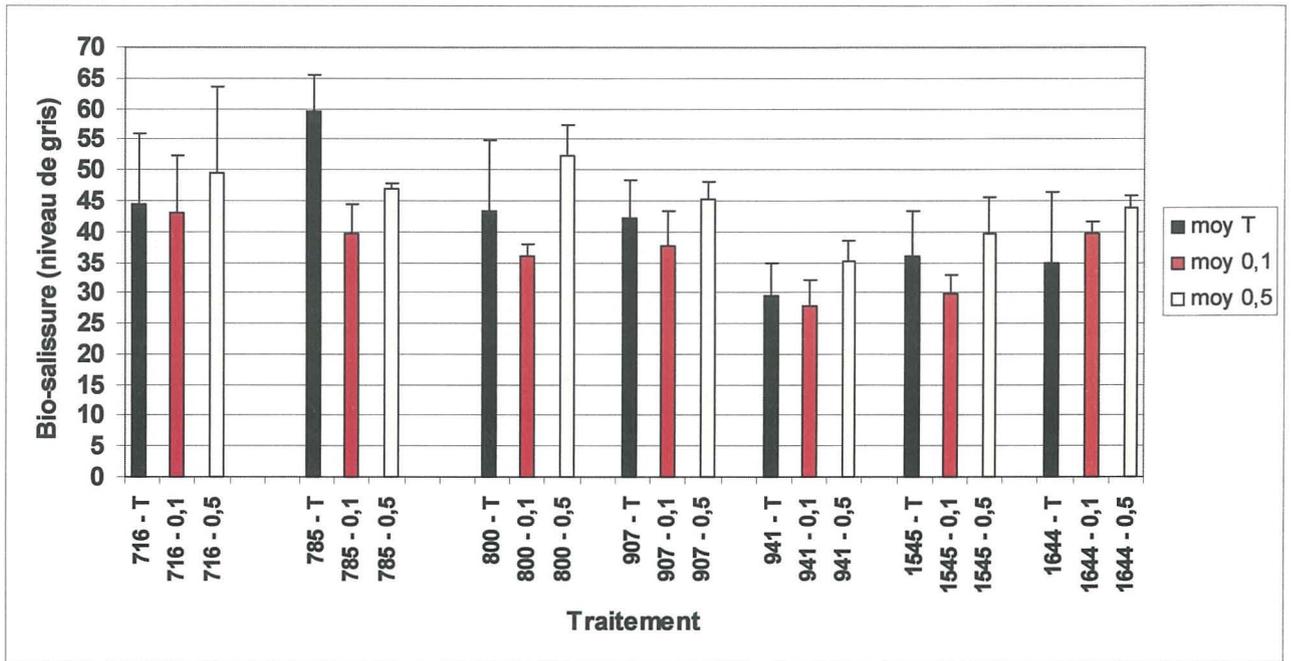


Fig. 11 : Niveau de salissure des lames (moy. + écart type) en fonction du traitement pour une durée d'immersion de 5 jours - Expérience n°2.

Table 1 : Anova et effets respectifs des variables dans l'expérience 2.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	9	7872,38	874,71	20,79	< 0,0001
Résidus	102	4292,06	42,08		
Total	111	12164,44			
durée	1	5684,89	5684,89	135,10	< 0,0001
EPS	6	650,70	108,45	2,58	0,023
concentration	2	1536,78	768,39	18,26	< 0,0001

4.3 Expérience 3

Toutes les lames ont été numérisées avant coloration. Le mode de mesure réalisé en niveaux de gris a permis de comparer la salissure des lames aux différents traitements (Fig. 12). La comparaison des témoins à 2, 5 et 34 jours d'immersion (Fig. 13) a confirmé la croissance des biosalissures sur les lames durant cette période. La variabilité des mesures de salissure a aussi fortement augmenté entre 2 et 34 jours d'immersion (écarts types de 3,4 ; 7,8 ; 19,0 à 2 ; 5 et 34 jours respectivement).

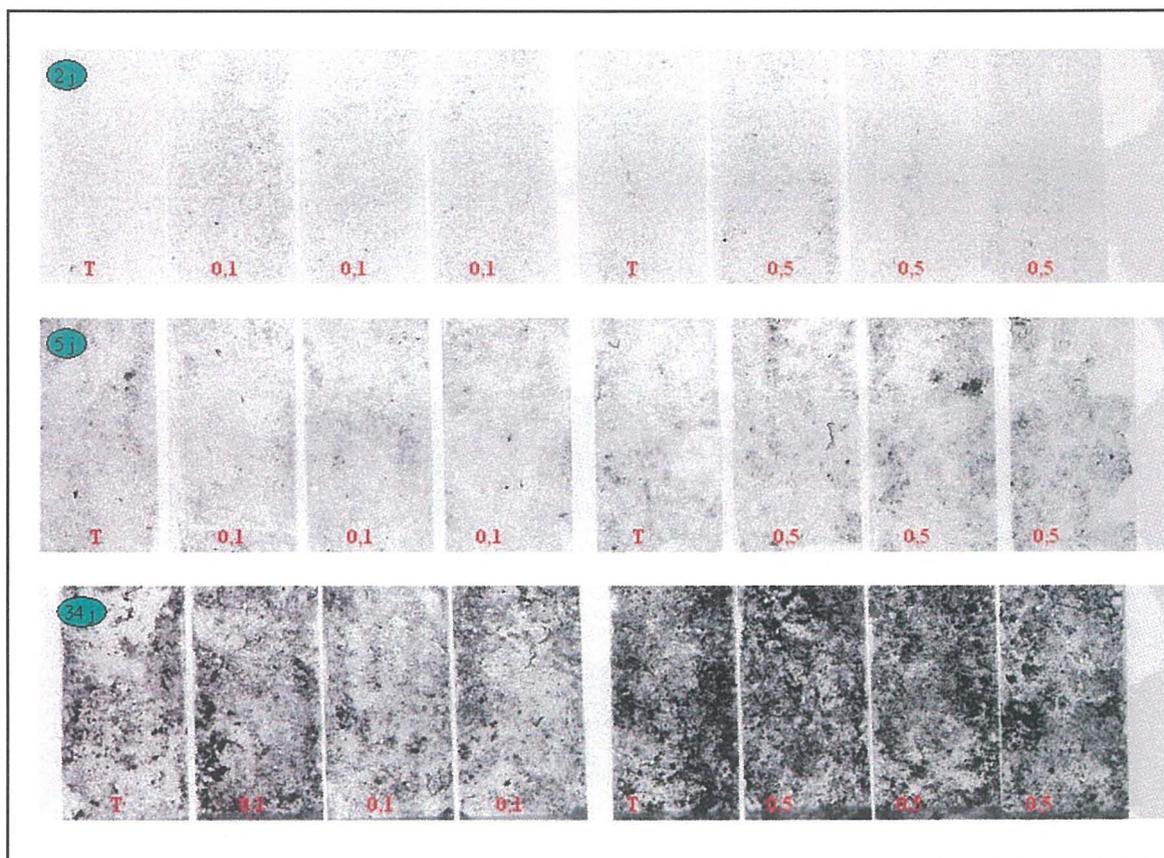


Fig. 12 : Exemples d'images numérisées de lames. EPS n°1644, témoin(T), 0,1 et 0,5%. Immersion de 2, 5 et 34 jours.

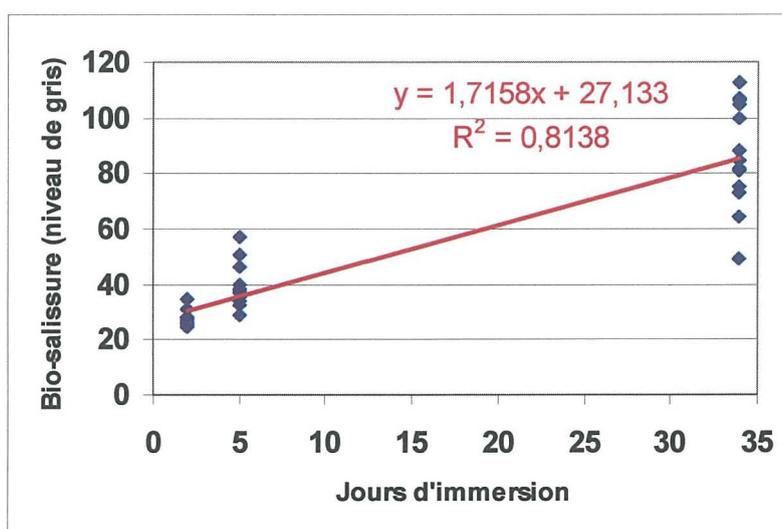


Fig. 13 : Évolution du niveau de salissure sur les témoins à 2, 5 et 34 jours - Expérience n°3.

Après 2 jours d'immersion (Fig. 14), les valeurs de salissure (valeurs de gris) ont varié dans la même gamme entre 24,3 et 34,7 ; 23,1 et 44,7 ; 25,5 et 38,9 pour les témoins, les EPS 0,1% et les EPS 0,5% respectivement. Excepté dans le cas de

la molécule 716, le niveau de salissure a toujours été plus élevé sur les lames traitées à la plus forte concentration d'EPS.

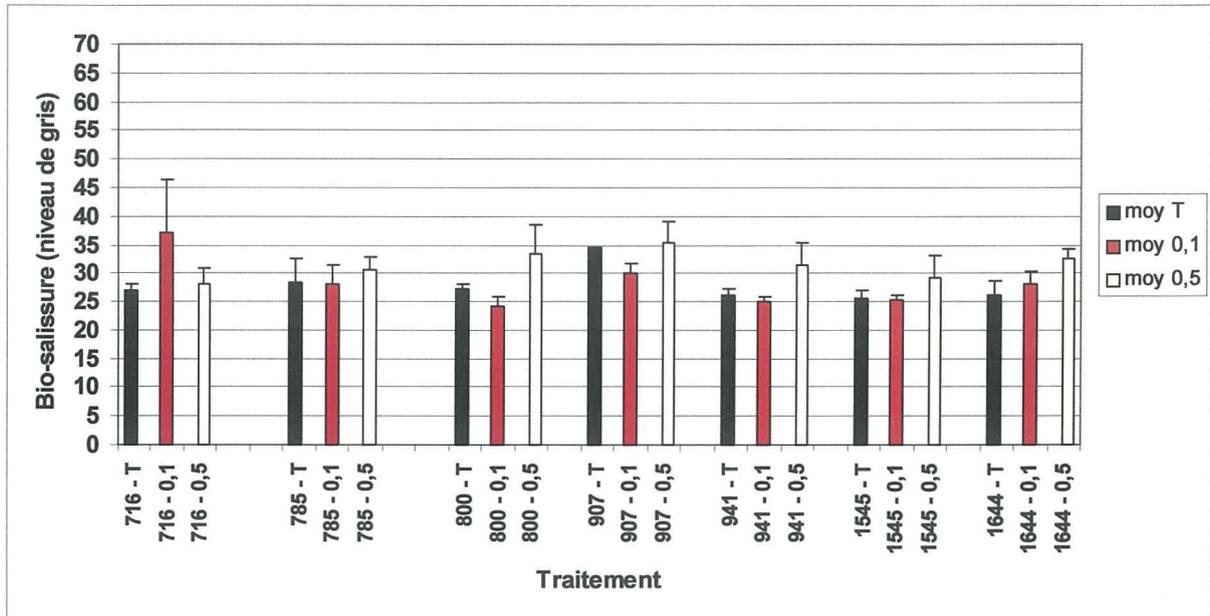


Fig. 14 : Niveau de salissure des lames (moy. + écart type) en fonction du traitement pour une durée d'immersion de 2 jours - Expérience n°3.

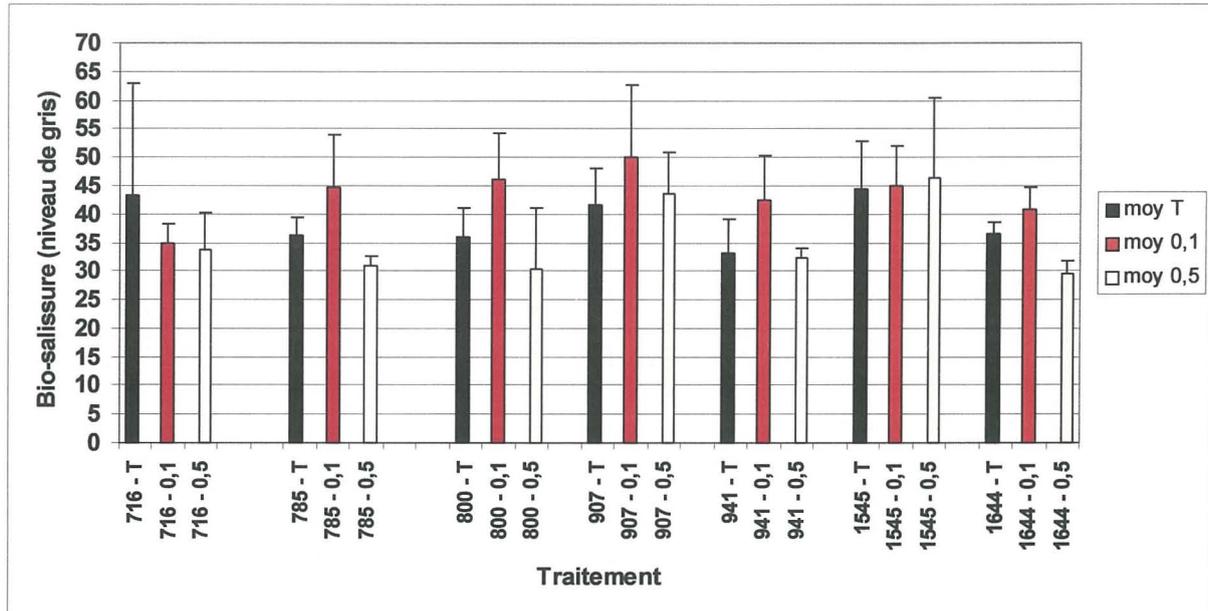


Fig. 15 : Niveau de salissure des lames (moy. + écart type) en fonction du traitement pour une durée d'immersion de 5 jours - Expérience n°3.

Après 5 jours d'immersion (Fig. 15) les valeurs de biosalissure ont évolué dans la même gamme entre 28,8 et 57,1 ; 32,6 et 64,8 ; 23,1 et 55,6 pour les témoins, les EPS 0,1% et les EPS 0,5% respectivement. La variabilité des valeurs mesurées est

plus élevée que pour 2 jours d'immersion. Les valeurs de salissure sur les lames non traitées n'ont pas été les plus élevées en général.

Les valeurs de biosalissure mesurées après 34 jours d'immersion (Fig. 16) ont évolué dans la même gamme pour les 3 niveaux de traitement : entre 49,5 et 112,5 ; 53,7 et 131,6 ; 52,3 et 145,7 pour les témoins, les EPS 0,1% et les EPS 0,5% respectivement.

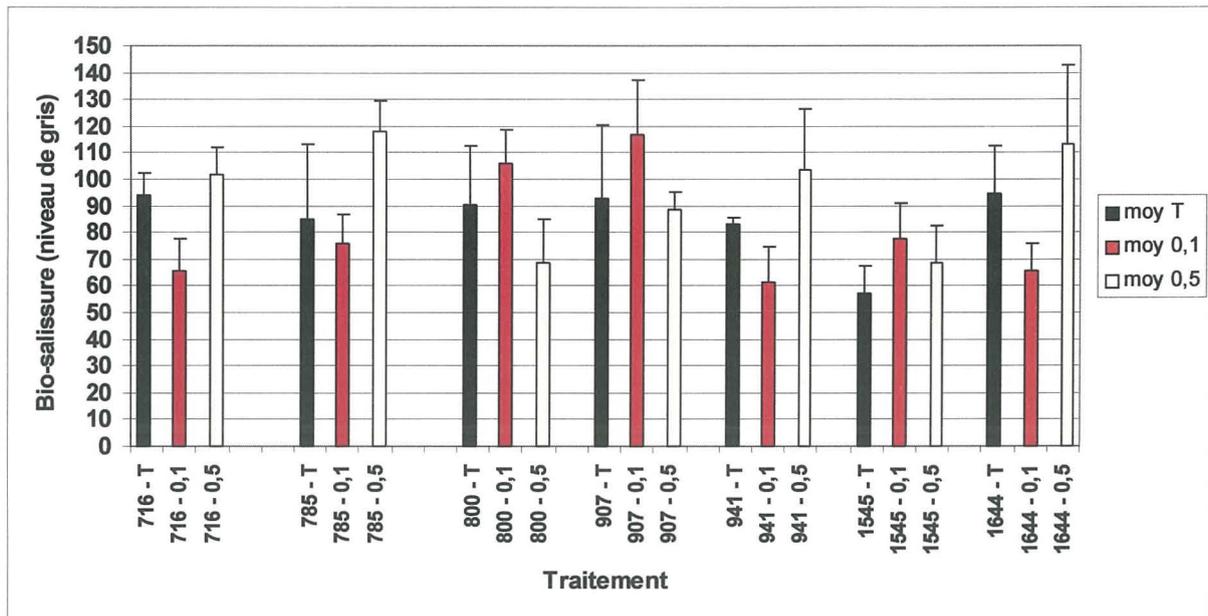


Fig. 16 : Niveau de salissure des lames (moy. + écart type) en fonction du traitement pour une durée d'immersion de 34 jours - Expérience n°3.

Une Anova à trois facteurs - durée d'immersion, molécule, concentration - a été réalisée (Table 2). Une différence hautement significative a été montrée entre les durée d'immersion et il n'y a pas eu de différence significative entre les molécules EPS ni entre leur concentrations.

Table 2 : Anova et effets respectifs des variables dans l'expérience 3.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	9	109623,15	12180,35	58,80	< 0,0001
Résidus	158	32727,43	207,14		
Total	167	142350,68			
durée	1	106992,01	106992,01	516,53	< 0,0001
EPS	6	2267,02	377,84	1,82	0,098
concentration	2	364,12	182,06	0,88	0,417

5 Discussion et conclusion

Dans la première expérience, très peu de fluorescence a été observée sur les lames qui sont apparues très semblables. En fait il y a eu très peu de salissures sur toutes les lames quel que soit le traitement et quel que soit le colorant de lecture. cela a certainement été dû à une lumière limitée parvenant sur les bacs dans la salle d'expérience. Il a donc été décidé de répéter l'expérience en extérieur.

En outre l'observation de champs au microscope a été difficile avec aussi peu de fluorescence. Le nombre de champs doit également être suffisamment grand pour être représentatif de la lame. Cela a dans notre cas nécessité trop de temps pour que la fluorescence persiste en lumière UV, rendant alors les lectures impossibles.

Les salissures se sont bien développées sur les lames dans la seconde expérience, non limitées par la lumière cette fois. Plus la durée d'immersion a été longue, plus les salissures se sont développées. La numérisation au scanner a permis de rendre ces biosalissures observables et mesurables. La coloration à l'acridine orange a été conservée même si l'observation a été faite en lumière normale, ce qui ne permet pas d'assurer que les salissures observées étaient vivantes.

Pourtant aucun effet des traitements EPS réalisés n'a été mis en évidence dans cette expérience. La seule différence significative a été notée avec une salissure plus importante pour une molécule EPS à 0,5%. C'est un résultat contraire à ce qu'on attendait. L'absence de différence significative entre témoins non traités et lames trempées en EPS pourrait être imputée à un « mauvais » accrochage du polymère en solution lors du trempage de la lame ou à une dissolution rapide en eau de mer ou encore à un rinçage trop efficace avant lecture des lames. Il a donc été décidé de prolonger le temps de trempage des lames jusqu'à 2 minutes avec une légère agitation.

L'expérience 3 a permis de confirmer le développement de salissures ainsi que son augmentation avec la durée d'immersion. La mesure du niveau de salissure a été possible après numérisation au scanner de lames non colorées. Cependant aucune différence significative n'a été montrée entre traitements, ni entre molécules ni entre concentrations. La prolongation de l'essai jusqu'à 34 jours n'a pas non plus permis de montrer un effet positif des EPS.

Le temps de trempage des lames en solution de polymère a été augmenté sans résultat. Il n'a pas semblé y avoir sur les lames une quelconque pellicule homogène, au contraire de l'essai préliminaire mené au COP en 2003 (Fig. 17). Trois molécules avaient été testées en solution préparées à 0,1 % en comparaison avec un témoin. Les lames de verre avaient été trempées 1 minute puis séchées à l'air et immergées sous 1 m d'eau dans le lagon. Une simple observation visuelle avait montré un effet négatif des 3 molécules testées sur la formation du biofilm après 18 jours d'immersion. Deux molécules, n°800 et n°1644, faisaient partie du test en 2003. Il est étonnant que leur effet antisalissure n'ait pas pu être mis en évidence dans cette série expérimentale en 2004.



Fig. 17 : Aspect du biofilm couvrant des lames de verre après 18 jours d'immersion en lagon. 800, 657 et 1644 sont les 3 molécules testées ; T est le témoin (en haut à gauche).

La première phase de l'étude concernant la présélection de molécules actives n'a pas pu être achevée. La seconde phase de confirmation de leur activité, une fois les molécules sélectionnées vectorisées (incluses dans une solution de protection et de durée) a donc dû être repoussée.

La présente étude a cependant été basée sur l'observation non contestable faite en 2003 de l'effet antisalissure de certaines molécules EPS. Un tel effet antisalissure n'a cependant pas pu être confirmé pour le moment, vraisemblablement à cause d'un mauvais accrochage des polymères sur les lames. Un effort particulier devra donc porter sur la méthodologie de trempage des supports dans les solutions de polymères, avant la poursuite des essais.

Bibliographie

- Butler A.J. and R.M.Connolly. 1996. Development and long term dynamics of a fouling assemblage of sessile marine invertebrates. *Biofouling*, 9(3):187-209.
- Claereboudt, M.R., Bureau, D., Côté, J., Himmelman, J.H., 1994. Fouling development and its effects on the growth of juvenile giant scallop (*Placopecten magellanicus*) in suspended cultures. *Aquaculture* 124: 337-342.
- Clare, A. S., 1996. Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling* 9 (3): 211-229.
- Doroudi, M.S., 1994. Infestation of the pearl oyster by the boring an fouling organisms in the pearl culture farm and natural beds from northern coast of Persian Gulf. *J. Shellfish Res.*, 13: 333-338.
- Judge, M.D. and Craig, S.F., 1997. Positive flow dependence in the initial colonization of a fouling community: results from in situ water current manipulations. *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.* 210 :209-222.
- Leca, L., 1992. Etude des épibiontes associés à l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L.) var. *cumingii* (Jameson) dans deux atolls de Polynésie française. Thèse de Doctorat, Laboratoire d'Ecologie Marine, Université Française du Pacifique, Tahiti, 170pp.
- Mohammad, M.B.M., 1976. Relationship between biofouling and growth of the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) in Kuwait, Arabian Gulf. *Hydrobiologia*, 51(2) : 129-138.
- Wahl, M., 1989. Marine epibiosis. 1 Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58: 175-189.