

EFFETS DE LA PREHUMIDIFICATION SUR LES KYSTES  
D' ARTEMIA (TAUX D'ECLOSION, TAILLE ET ULTRASTRUCTURE)J. CASTRITSI-CATHARIOS<sup>1</sup>, Th. KATSORCHIS<sup>2</sup>, V. KIORTSIS<sup>1</sup>, N.  
APOSTOLOPOULOS<sup>1</sup>.

## RESUME

Des kystes «inertes» d'une souche amphigonique d' Artemia ont été soumis à un traitement de préhumidification, de durée et d' humidité variables, avant leur hydratation et éclosion.

En général, le taux d' éclosion le plus élevé s' observe avec le maximum d' humidité et le minimum (24h) de la durée de préhumidification, ce qui indique une activation du développement embryonnaire.

Les mesures de la taille des kystes et l' étude préliminaire du chorion au mi croscopie électronique, suggèrent que les modifications structurales observées sont en relation avec cette activation.

## ABSTRACT

Dormant cysts of an amphigonous strain of Artemia were submitted to a pre-humidification treatment before their hydration for hatching. The cysts were exposed for different time periods at various relative humidities. Hatchability was maximal at the highest humidity and the shortest prehydration time (24h), thus indicating an activation of the embryonic development. Measurements of cysts dimension and electron microscopic observations of the chorion suggest that the structural changes observed are related to this activa-

## 1. INTRODUCTION

L' importance d' Artemia pour l' aquaculture est à l' origine d' un grand nombre de recherches. P. Sorgeloos (1972, 1973) a déterminé le rôle des différents paramètres (lumière, oxygène, salinité, races géographiques etc) sur le mode de reproduction et sur l' éclosion des kystes d' Artemia.

Clegg (1974, 1976, 1978, 1980) a étudiée à fond les rapports entre le métabolisme des kystes d' Artemia et leur contenu en eau. Les kystes commencent leur activité métabolique quant l' hydratation atteint le niveau de 0.65 grH<sub>2</sub>O/gr de poids kystes secs (Clegg, 1975).

Ce niveau critique peut être atteint en exposant les kystes à différentes humidités relatives pendant une période de plusieurs jours (Clegg et Cavagnaro, 1975).

Les kystes viables qui sont vivant hydratés dans une phase liquide ou gazeuse, équilibrent leur contenu d' eau (de leur milieu intérieur) par absorption

d' eau jusqu' à une certaine limite. Par contre, chez les kystes morts, a lieu un ajustement d' humidité à n' importe quelle valeur de l' humidité relative de l' environnement (Clegg, 1976).

## 2. MATERIEL ET METHODES

Les kystes utilisés appartenait à la souche amphigonique *Artemia franciscana*. L' éclosion se fait dans l' eau de mer synthétique (salinité 38‰) à une température de  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  sous éclairage et aération continus.

L' obtention d' une humidité donnée et son maintien constant dans une enceinte close, se faisaient par l' utilisation de cristallisoirs de verre, contenant une des solutions aqueuses saturées suivantes:  $\text{CaCl}_2$  (pour humidité 30-32%),  $\text{ZnCl}_2$  (pour 40-43%) et à des concentrations appropriées de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (pour les humidités élevées: 63-65%, 85-87%, 94-95%).

Les kystes étaient placés dans les verres de montre à l' intérieur des cristallisoirs, pendant 24, 48 et 72 heures. Immédiatement après la préhumidification, les kystes étaient transférés dans des tubes à essai, à raison de 37 à 39 par tube (pour 24h). Après éclosion, le contenu du tube était additionné de rose bengale, qui colore les nauplii. On filtrait sur papier, qui, placé au fond d' une boîte de Petri, permettait le comptage des nauplii sous la loupe binoculaire. Au total, 7.800 kystes ont été étudiés

L' étude ultrastructurale des coupes de 500-700µm se faisait au microscope électronique de transmission (Phillips E.M. 200) avec des kystes soumis à une préhumidification à 94-95% pendant 24, 48, 72 heures et des kystes témoins placés dans des cristallisoirs à une humidité basse (30-32%).

Les kystes étaient fixés au glutaraldéhyde à 3%, tamponné au cacodylate de sodium. La postfixation se faisait au tetroxyde d' osmium et les coupes contrastées à l' acétate d' uranyle et au citrate de plomb.

La mesure des dimensions des kystes ovoïdes (grand axe, petit axe et loupe) se faisait au VISOPAN (Reichert) après préhumidification à 63-65%, pendant 24, 48 et 72 heures. Comme témoins, nous avons utilisés les kystes maintenus à l' humidité de 30-32%.

## 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les taux d' éclosion à 5 humidités relatives différentes (30-32%, 40-43%, 63-65%, 85-87%, 94-95%), appliquées pendant 24, 48 et 72 heures, sont donnés au tableau I et aux Fig. I.

A l' humidité de 30-32%, le taux d' éclosion ne varie pas après traitement de 24 et 48 heures et présente, après 72 h, une baisse insignifiante de 1 à 2%, qui n' est pas statistiquement significative.

Après séjour à une humidité de 40-43%, on remarque une augmentation des éclosions pour les trois temps d' incubation (24h = 9%, 48h = 11%, 72h = 7%). Par la suite, exception faite de quelques fluctuations, la tendance à une augmentation du taux d' éclosion est très nette pour l' expérience de 24h, passant à +19% pour l' humidité la plus forte (94-95%), tandis qu' elle baisse pour 72 heures de préhydratation (étant donné qu' après 24h, l' éclosion des

**Tableau I.**  
Préhumidification de kystes «inertes» d' *Artemia*

<i>Humidité relative</i>	<i>Durée en heures</i>	<i>Nombre de kystes</i>	<i>Nauplii éclos</i>	<i>Taux d'éclosion %</i>
30-32 %	24	850	410	48.23
	48	850	413	48.59
	72	850	404	47.53
41-43 %	24	600	345	57.50
	48	600	360	60.00
	72	600	328	54.66
63-65 %	24	700	369	52.71
	48	700	399	57.00
	72	700	326	46.57
85-87 %	24	300	189	63.00
	48	300	188	62.66
	72	300	129	43.00
94-95 %	24	150	104	69.33
	48	150	78	52.00
	72	150	58	38.66

larves ne se fait pas dans un milieu qui leur est convenable et, par conséquent, elles meurent).

Pour bien illustrer ces deux tendances opposées, on indique ici les différences des taux d'éclosions (E%), après traitement aux humidités élevées 85-87% et 94-95%, pour 24 heures et 72 heures respectivement:

$$E_{24} - E_{72} = 20,00 \text{ (85-87\%)}$$

$$E_{24} - E_{72} = 30,67 \text{ (94-95\%)}$$

L' étude de l' ultrastructure du chorion des kystes deshydratés (A) et après préhumidification (B) a montré quelques différences. Le chorion A semble plus épais (Figure 2) que le B (Figure 3) et la différence est de l' ordre de 25 à 30%. Cette différence d' épaisseur n' est due qu' à la couche alvéolaire interne et non à la couche corticale, qui, dans les deux chorions, est de même largeur. D' ailleurs, la forme des alvéoles rend parfaitement compte de la participation exclusive de la couche alvéolaire à cette modification dimensionnelle du chorion. On constate en effet que les alvéoles, après préhumidification, deviennent aplaties dans le sens de la longueur, tandis que celles des kystes deshydratés restent sphériques ou ovoïdes. En revanche, les aéropyles qui occupent la moitié interne de la couche corticale persistent dans les deux cas, sans modification, avec leur structure tubulaire typique. Sous l' effet de l' aplatisse-

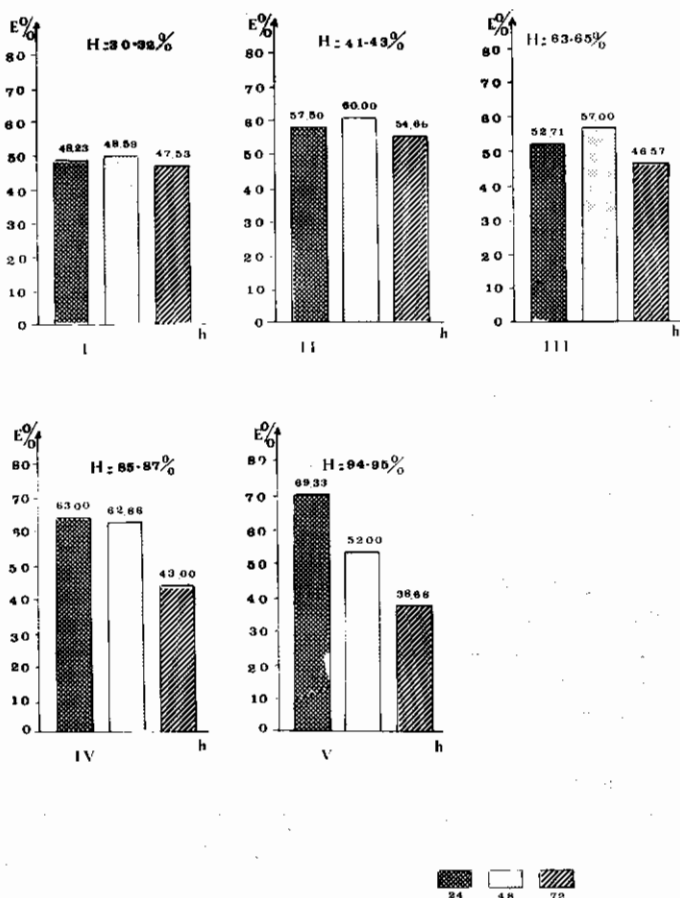


Fig. 1. Histogrammes I à V. Humidité relative H. Taux d'éclosion E. Durée en heures H

ment des alvéoles, les pores d'intercommunication pratiquement disparaissent (voir aussi Morris et Afzelius, 1967; Morris, 1971).

L'origine de cette différence d'épaisseur, due sans doute possible à la préhumidification, doit être recherchée aux conditions mécaniques créées à l'intérieur du kyste par un début de développement de l'embryon. D'ailleurs, l'accélération des éclosions observée après préhumidification milite en faveur de cette hypothèse.

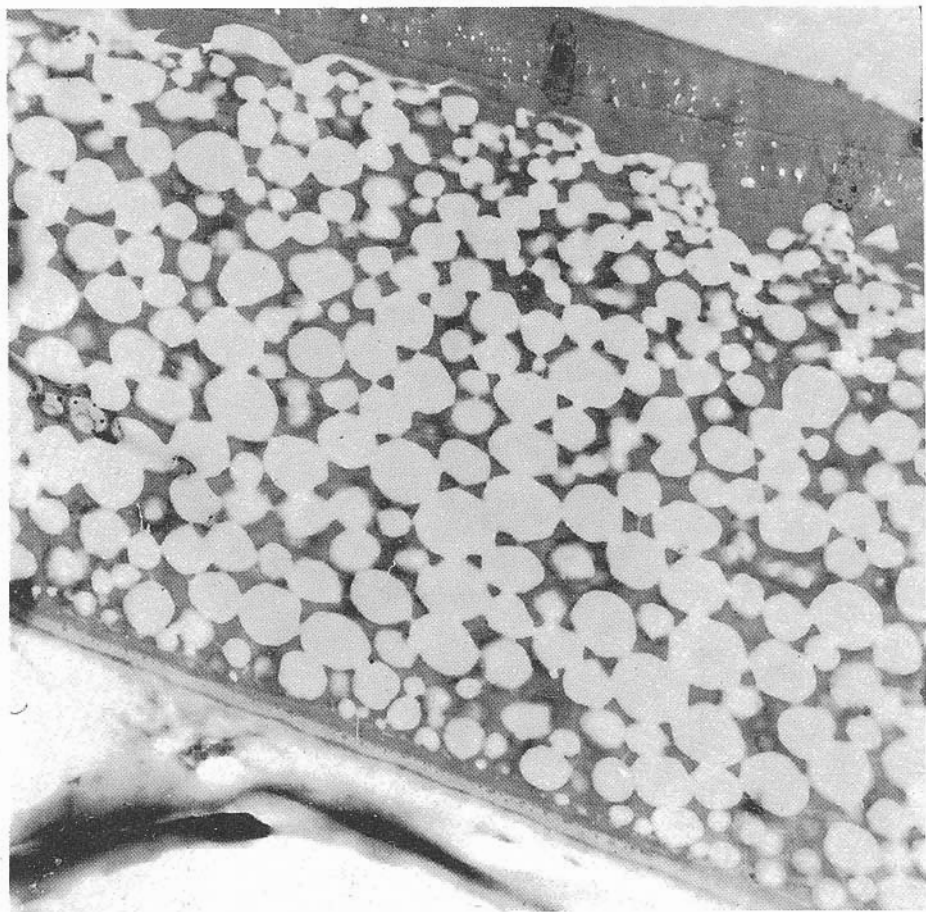


Fig. 2. Cyste deshydraté X 14.500

Les mensurations des dimensions des kystes apportent un élément supplémentaire, qui confirme encore l'hypothèse précitée. Après préhumidification à 63-65% pendant 24, 48 et 72 heures, on voit un changement de la forme des kystes, analogue à celui observé après hydratation. Les kystes deviennent sphériques, la «loupe» se réduit et les dimensions totales s'accroissent dans une proportion de 20% environ (Tableau II et Fig. 4).

Il ressort de ces résultats que, pour les préhumidifications jusqu'à 63-65% à 3 temps différents, nous n'avons pas de grandes différences à l'éclosion. Au contraire, pour une préhumidification plus intense, l'abaissement du taux d'éclosion après 24 h est remarquable. Ce résultat coïncide avec ceux obtenus par J. Clegg (1976), qui écrit: «Viability in such populations decreased slowly but markedly with time of incubation (over long periods of time)».

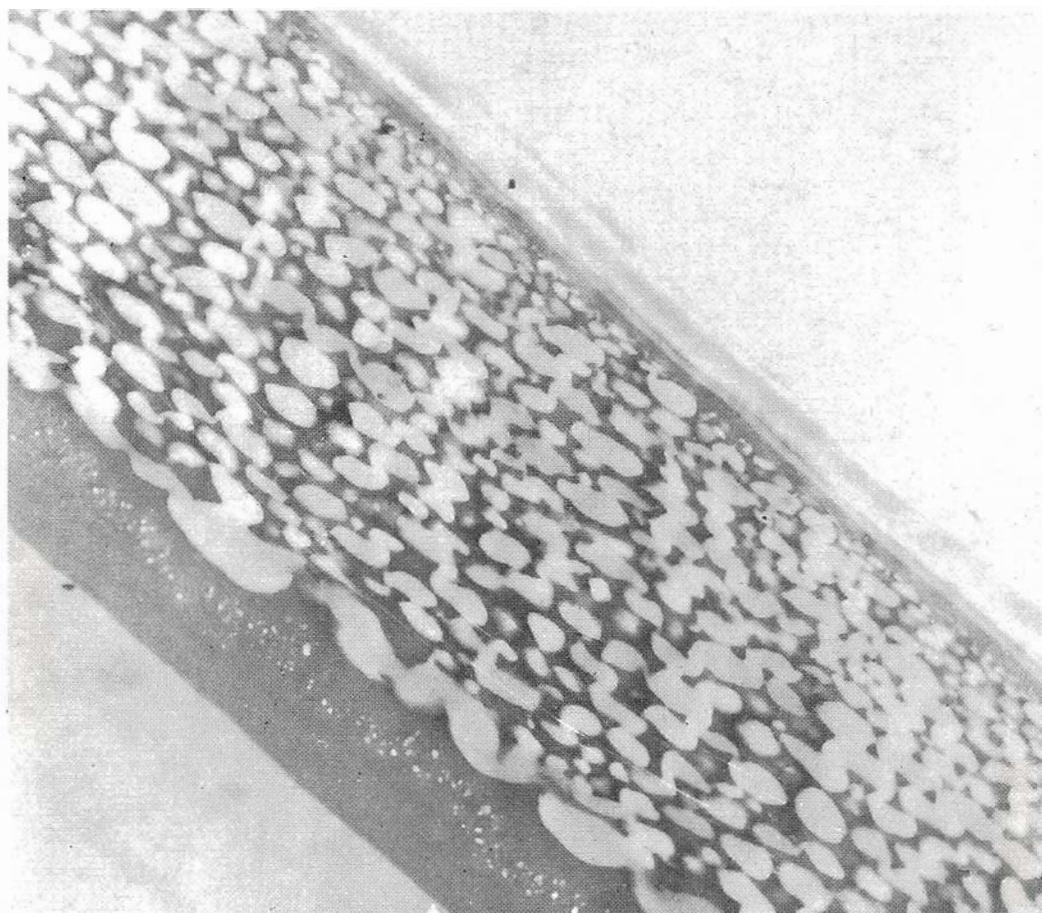


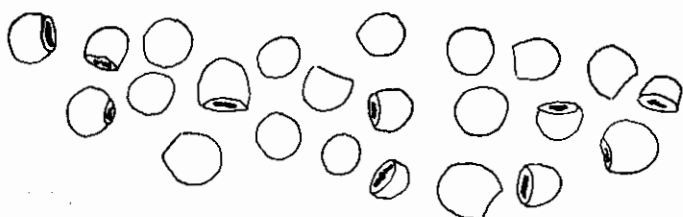
Fig. 3. Cyste après préhumidification X 14.500

Tableau II.  
Taille des kystes d' *Artemia* soumis à la préhumidification

Humidité relative	Durée en heures	Nombre n.	Dimensions en ( $\mu$ )				Loupe	
			Largeur		Longueur		X	SD
			X	SD	X	SD	X	SD
30-32%	24-27	50	204	26,8	168	36,5	82,4	54,4
63-65%	24	40	227,4	38,6	220,5	29,5	76	81,7
63-65%	48	40	236,5	28,2	224,2	23,8	57,5	64,4
63-65%	72	40	246,5	16,7	239,5	28,5	11,5	50,8

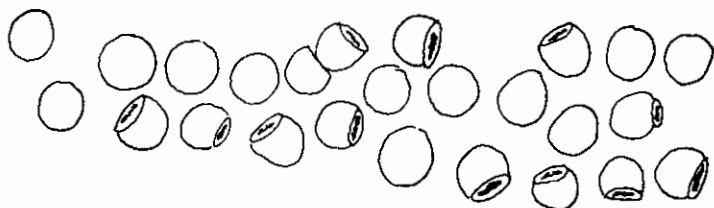


Humidité relative: 30-32%



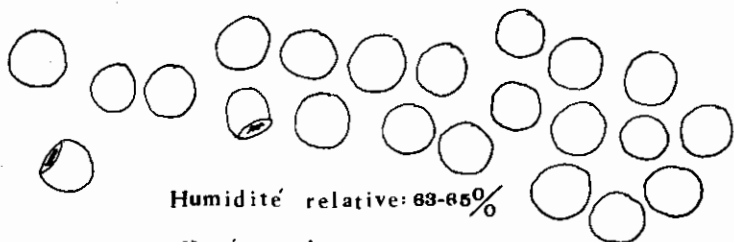
Humidité relative: 63-65%

Durée en heures: 24



Humidité relative: 63-65%

Durée en heures: 48



Humidité relative: 63-65%

Durée en heures: 72

Fig. 4. Dessins à la chambre claire de cystes d'Artemia après préhumidification. Echelle 1/50

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, E., LOCHHEAD, J.H., LOCHHEAD, M.S., HUEBNER, E., 1970. The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *Journal ultrastructural research*, vol. 32: 497-525.
- CLEGG, J.S., 1967. Metabolic studies of cryptobiosis in encysted embryos of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 20: 801-809.
- , 1974. Interrelationship between water and metabolism in *Artemia salina* cysts: Hydration-dehydration from the liquid and vapour phases. *J. Exp. Biol.* 61, 291-308.
- , 1974. Biochemical adaptations associated with the embryonic dormancy of *Artemia salina*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 93 (4): 481-490.
- , 1976. Interrelationships between water and metabolism in *Artemia* cysts. III; Respiration. *Comp. Biochem. Physiol.* 53A: 89-93.
- and J. CAVAGNARO, 1975. Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. *J. Physiol.* 88: 159-166.
- , 1976. Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. *J. Cell Physiol.* 89, 369-380.
- , 1976. Interrelationships between water and metabolism in *Artemia* Cysts-II Carbohydrates *Comp. Biochem. Physiol.* 53A: 83-87.
- , 1978. Interrelationships between water and cellular metabolism in *Artemia* cysts. VIII Sorption isotherm and derived thermodynamic quantities. *J. Cell. Physiology*, 94: 123-138.
- , 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*. *Phys. Bioch. Molecular Biology*, 2: 664.
- CLEGG, J.S., 1977. Hydration measurements on individual *Artemia* cysts (1). Labor for Quantitative Biology, University of Miami, Coral Gables, Florida 33124.
- MORRIS, J.E., AFZELIUS, B.A., 1967. The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 244-259.
- , 1971. Hydration, its reversibility and the beginning of development in the brine shrimp *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 39A: 843-857.
- NIMURA, Y. 1967. Biology of the brine shrimp. Review. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 33, 690-702.
- PERSOONE, G., SORGELOOS, P., ROELS, O., JASPERS, E., 1980. The brine shrimp *Artemia*. V. II, III, Universa press, Wetteren, Belgium.
- SORGELOOS, P., 1972. The influence of light on the growth rate of larvae of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Biol. Jaarb.*, 40: 317-322.
- SORGELOOS, P., 1973. The influence of light and dissolved oxygene on the reproduction of the brine shrimp *Artemia salina*. «8th European Symposium on Marine Biology» Sorrento (Napoli, Italy), October 1-7, 1973.