

# Utilisation de sels métalliques comme traitement anti-parasitaire en aquariologie marine

par Michel Hignette

Institut océanographique - Aquarium, Principauté de Monaco

## RÉSUMÉ

*Les parasites responsables de la mort des poissons marins d'aquarium sont très fréquemment les protozoaires Oodinium ocellatum Brown et Cryptocaryon irritans Brown. Actuellement, les traitements considérés comme les plus efficaces sont à base de sels de cuivre ou de zinc. Pour détruire les formes libres des parasites, la concentration en ions métalliques (0,15 mg/litre de  $Cu^{2+}$ ) doit être maintenue constante pendant au moins dix jours. Pour diminuer les phénomènes de précipitation et d'adsorption on peut complexer les sels métalliques par du Tris ou d'autres composés organiques à groupements aminé. Les poissons possèdent des facultés d'adaptation aux ions métalliques dont on peut tenir compte lors des traitements.*

## SUMMARY

*Parasites accountable for marine aquarium fishes death are mainly Oodinium ocellatum Brown and Cryptocaryon irritans Brown. Now most effective treatments are thought to be metallic salts like copper or zinc. In order to kill free swimming stage, metallic ions concentration must be kept constant (0,15 ppm  $Cu^{2+}$ ) at least for ten days. To minimise precipitation and adsorption it is possible to complex metallic salts with Tris or other organic compounds with amine components. It is possible to use the ability of fishes to adapt themselves to metallic ions, during treatments.*

Il existe deux causes principales aux fortes mortalités souvent constatées lors d'importations de poissons marins tropicaux et pendant les premiers jours de quarantaine:

- les techniques de pêche faisant appel à des ichtyotoxiques comme le cyanure qui peuvent être à l'origine de mortalités même tardives sans aucun symptôme apparent (**Herwig**, 1980).
- les mauvaises conditions de stockage des poissons avant l'exportation permettant un développement très important de certains parasites parmi lesquels les protozoaires *Oodinium ocellatum* Brown et *Cryptocaryon irritans* Brown sont les plus fréquents (**VioBetta**, 1980).

L'observation systématique des branchies de tous les poissons décédés chez un importateur travaillant à proximité de Monaco a pu montrer que jusqu'à 80 % de ces animaux, expédiés d'Asie du Sud-Est, pouvaient être porteurs d'*Oodinium*.

Les poissons de Méditerranée peuvent aussi subir d'importantes mortalités dues à ces parasites notamment en cas d'élevage intensif (**Paperna**, 1980) ou lors d'élévation de la température de l'eau des aquariums.

Actuellement on ne connaît pas de traitement susceptible d'éliminer les formes enkystées de ces parasites qui ne tue simultanément les poissons. Par contre le stade nageur infestant de ces protozoaires est fragile, sensible en particulier aux métaux lourds et le

traitement généralement préconisé consiste en l'utilisation de sels de cuivre ou de zinc en bains de longue durée. Après essais sur un grand nombre d'espèces de poissons dont les sensibilités sont très variables (les Chaetodontidae et les Pomacanthidae étant parmi les plus fragiles), la posologie de 0,15 mg/litre de cuivre est habituellement conseillée (**Dempster et Shipman**, 1969; **Blasiola**, 1978; **Herwig**, 1978; **Terver**, 1980).

Dans un aquarium en fonctionnement normal avec décors et filtration, la concentration du cuivre dans l'eau décroît très rapidement (**Mikiosz**, 1972), ce qui rend difficile l'application d'une posologie constante. Le but de ce travail était de trouver un moyen de garder en solution le cuivre pendant la durée du traitement.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des aquariums en verre collé contenant cent litres d'eau de mer naturelle filtrée à 10 µm ont été utilisés. L'eau est aérée et brassée par un diffuseur d'air comprimé. La filtration, lorsqu'elle est utilisée, est constituée par une cuvette, contenant du sable comme masse filtrante, sur laquelle un entonnoir renversé joue le rôle d'exhausteur. Les mesures de la concentration en cuivre ont été réalisées avec le coffret de mesures Aquaquant Merck (sensibilités 0,05 à 0,4 mg/litre) ou par mesures de spectrophotométrie à 595 nm d'une solution bleue obtenue en ajoutant à l'échantillon une solution citrate puis de l'acide oxalique bis (cyclohexylidène hydrazide), (**Tuck et Osborn**, 1960; **Pries et Getrost**, 1977).

Les poissons qui ont servi aux tests biologiques sont des Castagnoles: *Chromis chromis* Linné capturées dans des nasses puis acclimatées en aquarium d'abord en eau courante puis en circuit fermé. Ces Pomacentridae peuvent être considérés comme assez représentatifs d'une large gamme de poissons d'aquarium et ont une grande tolérance thermique.

## DECROISSANCE DE LA CONCENTRATION EN CUIVRE DE L'EAU DES AQUARIUMS

La chute très rapide de la concentration du cuivre dans les eaux des aquariums après traitement a souvent été attribuée à la formation de carbonate de cuivre insoluble qui précipiterait (**Takeshita**, 1975). Ceci semble vrai en eau douce où la toxicité du cuivre ou du zinc sont fonction de la dureté de l'eau (**Stiff**, 1971; **Syniey et al.**, 1974; **Chapman et Me Crady**, 1977 ; **Prosi**, 1981) mais pas en eau de mer où les anions dont le chlore entrent en compétition avec les carbonates (**Morin**, 1980).

Dans un aquarium marin non filtré la décroissance de la concentration du cuivre est très lente: au bout de vingt jours il reste plus de la moitié de la concentration initiale (figure 1 - A). Par contre si l'on filtre un tel aquarium avec cinq kilos de sable coquillier (algomarine granulométrie 2-7 mm) préalablement javellisé et rincé, la décroissance est très rapide : après quatre heures, il ne reste que le tiers de la concentration initiale (figure 2-A).

La nature de la masse filtrante intervient beaucoup: dans les mêmes conditions, en remplaçant le sable coquillier par de la quartzite concassée (granulométrie environ 5 mm) les résultats sont très différents. Après une phase de décroissance assez rapide, la concentration en ions cuivriques est rapidement stabilisée à la moitié de la concentration initiale (figure 1-B), ce qui peut s'expliquer de plusieurs façons:

- la quartzite offre beaucoup moins de sites d'absorption que le sable coquillier dont le rapport surface/volume est très supérieur.
- le sable coquillier contient beaucoup de carbonate de magnésium qui peut absorber sélectivement les ions métalliques (**Morin**, 1980)

**Keith**, (1981) ne signalait pas de différences significatives entre des masses filtrantes de nature calcaire ou siliceuse mais ses expériences ne duraient que vingt-quatre heures.

Pour éviter qu'un ion métallique en solution ne soit adsorbé par un substrat, il est classique d'ajouter un chélateur ou un complexant. En ce sens (**Dempster**, 1955) avait proposé d'ajouter au sulfate de cuivre de l'acide citrique à raison de 1 % puis avait augmenté cette proportion à deux parts d'acide citrique monohydraté pour trois parts de sulfate de cuivre pentahydraté (**Dempster et Shipman**, 1969). La **figure 2-B** montre que cette solution n'est pas efficace lorsque la masse filtrante est constituée de sable coquillier. **Keith**, (1981) donne des conclusions similaires pour d'autres substrats : coraux, dolomite et charbon actif.

Le chélateur le plus utilisé pour garder les ions métalliques en solution est l'EDTA: acide éthylène dinitrotétracétique. La toxicité du cuivre est en réalité due uniquement à l'ion cuivrique libre (**Sunda et Guillard**, 1976; **Sunda et Lewis**, 1978; **Jackson et Morgan**, 1978) et la chélation de ces ions par l'EDTA entraîne une diminution de la toxicité de la solution. La dose létale de cuivre pour 50 % des Castagnoles en vingt-quatre heures est de 0,8 mg/litre mais il est possible de maintenir en vie des groupes de dix Castagnoles dans 100 litres d'eau de mer contenant cinq grammes d'EDTA malgré une concentration en cuivre de 9 mg/litre (soit plus de onze fois la DL<sub>50</sub> 24 h). De plus, cette concentration s'est révélée inefficace contre les parasites puisque des Castagnoles préalablement contaminées sont décédées, onze jours après le début d'une expérience, d'infestation massive d'*Oodinium* sur les branchies.

Il faut donc chercher un produit qui tout en maintenant le cuivre en solution ne diminue pas trop sa toxicité et n'altère pas ses propriétés thérapeutiques. Les atomes donneurs

d'électrons susceptibles de se lier le mieux avec l'atome de cuivre sont dans l'ordre l'azote, l'oxygène et le soufre. Les meilleurs complexants du cuivre seraient donc des composés ayant un atome d'azote libre. Le plus simple, l'ammoniac, est malheureusement toxique pour les poissons. Il faut donc utiliser un composé à groupement aminé pas ou peu toxique pour les poissons. **Nigrelli et Rugieri**, (1966) ont mentionné l'utilisation de Tris pour amener à pH 7,5 une solution d'acétate de cuivre et de formol destinée à lutter contre *Cryptocaryon irritans* et signalent qu'un traitement est généralement suffisant. Le Tris: tris (hydroxyméthyl) aminométhane qu'ils avaient utilisé comme tampon pour élever le pH est un bon complexant du cuivre, ce qui peut expliquer les résultats de ce type de traitement. En présence de Tris, le cuivre garde sa toxicité vis à vis des Castagnoles: 0,8 mg/litre restant la dose létale 50.

La figure 3 montre qu'en présence de Tris la disparition des ions cuivriques d'une solution de sulfate de cuivre est considérablement ralentie. Elle dépend de la quantité de sable (masse filtrante) et de la quantité de Tris ajoutée. De plus dans un bac antérieurement traité au cuivre, l'ajout de Tris peut faire remonter la concentration en ions cuivriques (**figure 1-B**).

Tout ceci indique qu'en cas de traitement, il sera pratiquement impossible de prévoir la cinétique de décroissance de la concentration du cuivre dans un aquarium filtré et décoré et il sera donc indispensable d'associer au traitement des mesures de la concentration en ions cuivriques, l'avantage du Tris étant de ralentir leur disparition et donc de permettre des mesures et des ajouts plus espacés.

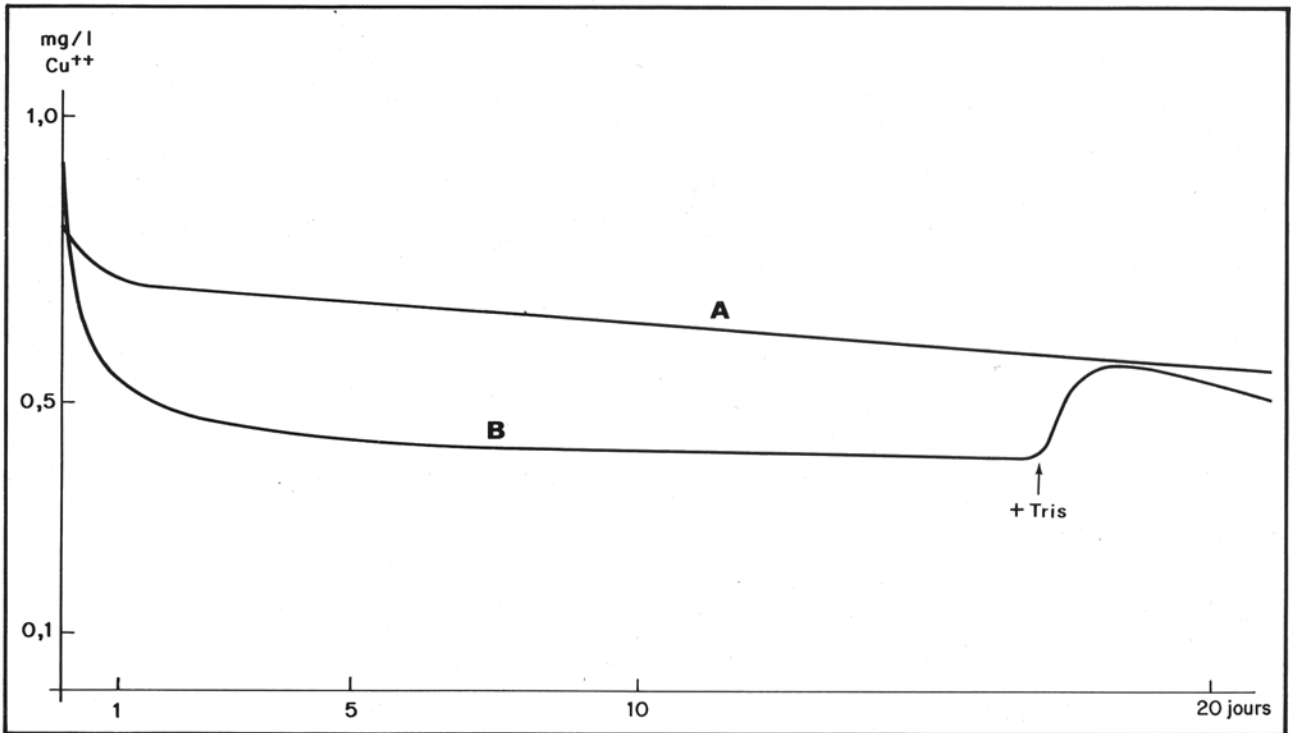
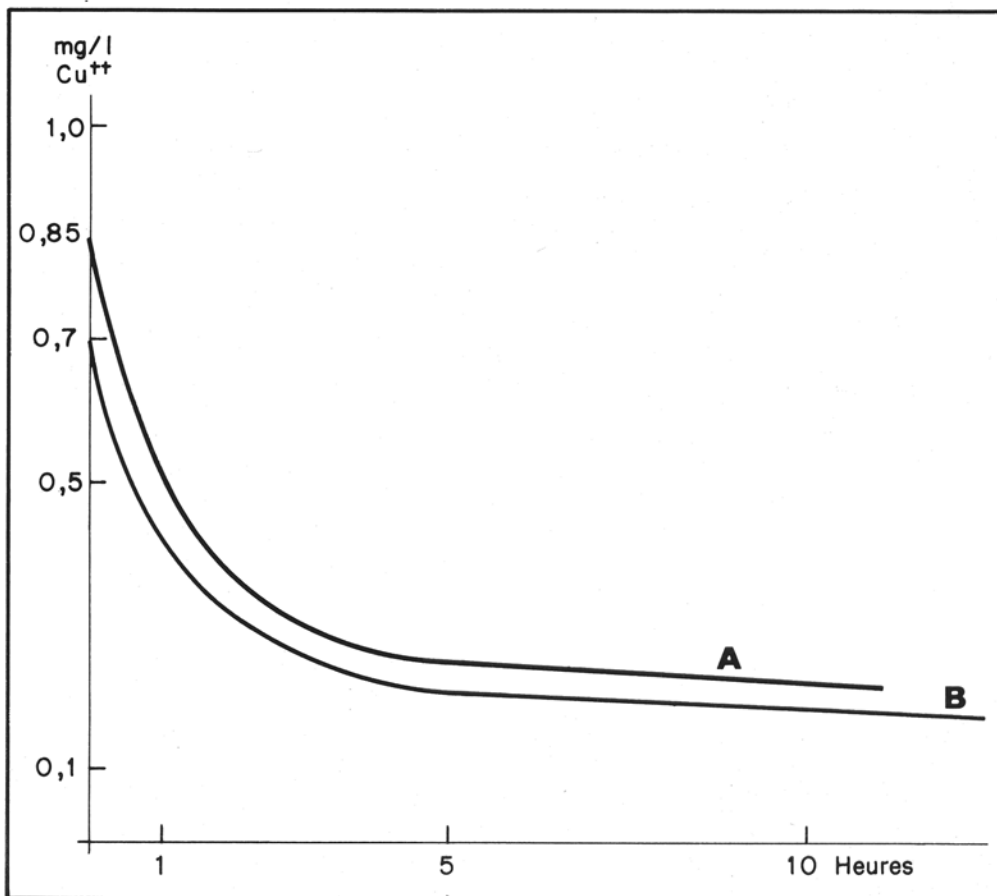


Figure 1 - Décroissance de la concentration en ions cuivriques dans un aquarium contenant 100 litres d'eau de mer : (A) dans un bac nu seulement aéré - (B) dans un bac filtré par 5 kilos de quartzite, l'ajout de 5 grammes de Tris fait remonter la concentration en ions cuivriques.

Figure 2 - Décroissance de la concentration en ions cuivriques dans un aquarium contenant 100 litres d'eau de mer : (A) dans un bac filtré par 5 kilos de sable coquillier - (B) dans un bac filtré par 5 kilos de sable coquillier, le sulfate de cuivre (3 parts) ayant été complexé par de l'acide citrique (2 parts).



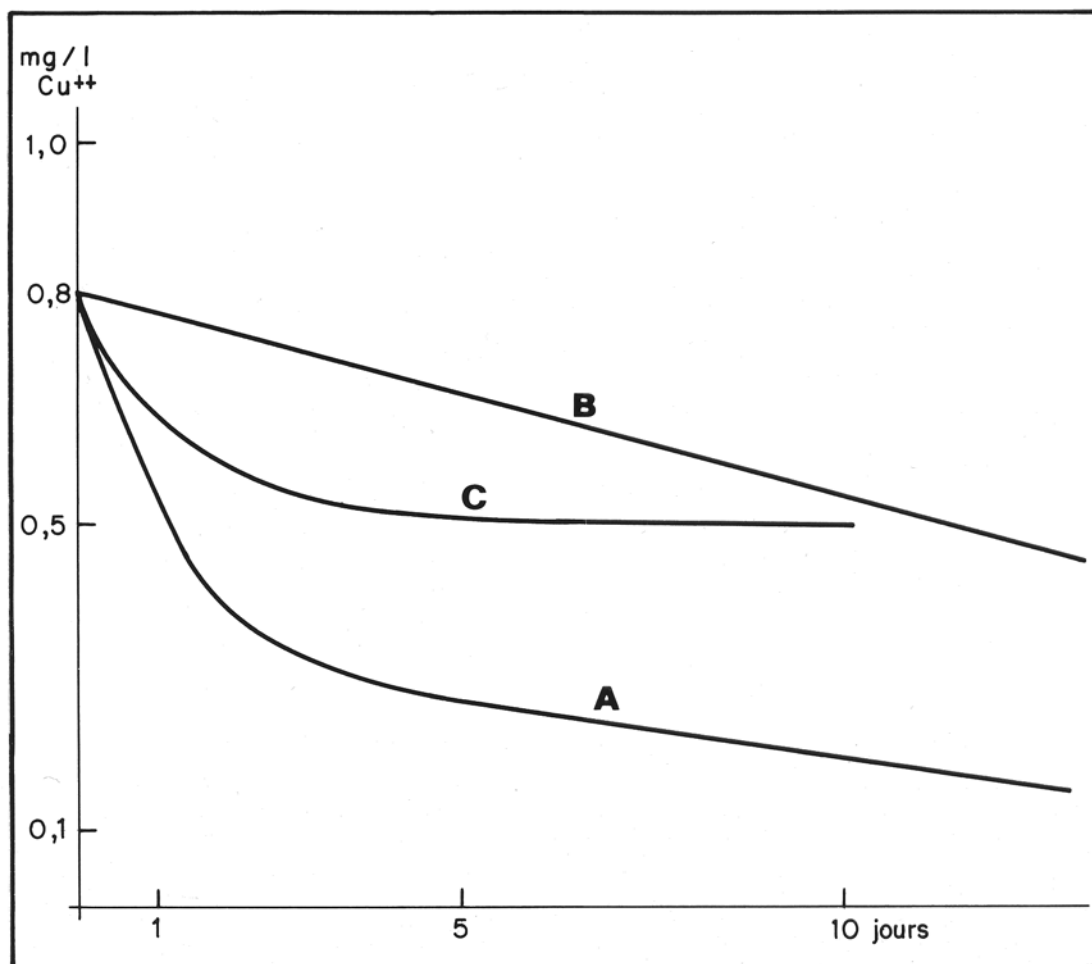


Figure 3 - Décroissance de la concentration en ions cuivriques dans un aquarium contenant 100 litres d'eau de mer après ajout de Tris : (A) dans un bac filtré par 5 kilos de sable coquillier avec 1 gramme de Tris - (B) dans un bac filtré par 2,5 kilos de sable coquillier avec 1 gramme de Tris - (C) dans un bac filtré par 5 kilos de sable coquillier avec 5 grammes de Tris.

## EFFICACITÉ DU TRAITEMENT

Afin de tester l'efficacité du traitement, il fallait disposer de poissons parasités de manière homogène, et les séparer en deux groupes, l'un traité, l'autre servant de témoin. Pour les obtenir, des branchies de poissons porteurs d'*Oodinium* ou de *Cryptocaryon* ont été ajoutées dans des aquariums de 150 litre aérés mais non filtrés où étaient acclimatés des groupes de dix Castagnoles. La température avait été élevée à 25° ou à 31° C afin d'accélérer le cycle des parasites. Des Castagnoles étaient régulièrement sacrifiées et leurs branchies observées à la loupe binoculaire puis au microscope pour avoir une idée du degré de contamination des poissons. Le nombre initial de dix Castagnoles par lot était trop faible pour obtenir des résultats statistiquement significatifs ; néanmoins un certain nombre de poissons semblent avoir été

débarassés de leurs parasites par un séjour dans une eau contenant des ions cuivriques à la concentration de 0,2 mg/litre.

Il est par contre très net que toutes les Castagnoles décédées ou sacrifiées après avoir séjourné plus de trois jours dans un aquarium ayant contenu des branchies porteuses de *Cryptocaryon* ou d'*Oodinium* étaient parasitées alors que les poissons vivants dans des bacs traités (0,2 mg/litre de cuivre) ne l'ont jamais été malgré de nombreux ajouts de branchies contaminées. Cette concentration de 0,2 mg/litre, légèrement supérieure à celle préconisée habituellement empêche donc l'infestation de poissons sains mais nous n'avons pas pu prouver son efficacité thérapeutique sur des animaux déjà parasités.

## MÉCANISMES DE DÉFENSE DES POISSONS VIS-A-VIS DU CUIVRE

Dans les conditions normales d'expérimentation, la dose léthale du cuivre est de 0,8 mg/litre pour les Castagnoles mais s'il y a d'abord eu une pré-exposition d'une semaine dans une eau contenant 0,4 mg/litre, elles supportent sans dommages apparents une concentration de 1,2 mg/litre. En eau douce, **Dixon et Sprague**, (1981 b) ont obtenu des résultats similaires avec la truite arc-en-ciel (*Saimo gairdneri*). Cette apparente adaptation des poissons au cuivre nécessite des mécanismes de détoxification qui peuvent être de différentes natures:

### 1. Stimulation de la production de mucus

En présence de métaux lourds, les poissons augmentent très rapidement leur production de mucus qui a une très grande affinité pour les ions métalliques. Au cours des tests léthaux, les Castagnoles avaient tendance à se rassembler, à l'exception de quelques individus qui mourraient toujours avant les animaux groupés. Il est possible que la grande quantité de mucus sécrété par l'ensemble des poissons ait diminué localement la concentration des ions cuivriques. Des effets de groupe modifiant le seuil de toxicité de différents polluants ont été constatés chez les poissons (**Bauchot**, 1967) et des mécanismes psychophysiologiques encore mal connus pourraient intervenir.

### 2. Synthèse de protéines hépatiques fixant les ions métalliques

Chez de nombreux animaux, l'exposition à des métaux lourds induit la synthèse de métallothionéines qui sont des protéines de faible poids moléculaire (6000-7000) ayant une grande affinité pour les ions métalliques auxquels elles se combinent, diminuant ainsi leur toxicité, comme le fait un chélateur (**Bouquegneau et Noel-Lambot**, 1978; **Kâgi et Nordberg**, 1979). L'apparition de métallothionéines après intoxication par le cadmium ou le mercure a été montrée chez

certaines poissons comme l'anguille (**Noël-Lambot et al.**, 1978) mais dans le cas du cuivre il semble qu'il y ait synthèse d'une autre protéine spécifique jouant le même rôle. En effet, chez les truites arc-en-ciel exposées au cuivre, il y a augmentation de la concentration des protéines hépatiques mais celles-ci ont un poids moléculaire et une composition en acides aminés différents des métallothionéines (**Dixon et Sprague**, 1981 a).

### 3. Bioprécipitation des ions métalliques

Chez les poissons marins, l'existence de corpuscules intestinaux de nature carbonatée, pouvant fixer des ions métalliques a été récemment montrée (**Noel-Lambot**, 1981). En cas d'intoxication par le cadmium, le zinc ou le cuivre, on retrouve de grandes quantités de ces métaux dans les corpuscules, ce qui abaisse leur concentration dans le liquide intestinal et diminue leur absorption par la muqueuse. L'activité phosphatasique acide est intense au niveau de l'intestin et des caecums pyloriques, en relation avec l'abondance des lysosomes chez la rascasse (**Escoubet et Vicente**, 1979). Il est possible qu'il y ait précipitation des métaux sous forme de phosphates au niveau des lysosomes comme chez le rat (Galle, 1981), les microcalculs étant soit éliminés directement dans le milieu extérieur, soit rassemblés dans une vacuole et s'agglomérant pour former des sphérocristaux semblables à ceux que l'on trouve chez de nombreux invertébrés, notamment marins (**Hignette**, 1978).

## CONCLUSIONS

Les traitements antiprotozoaires à base de métaux lourds et notamment d'ions cuivriques nécessitent l'emploi d'une concentration susceptible de tuer les formes libres des parasites sans causer de dommages aux poissons. La posologie doit être maintenue constante pendant une durée supérieure à celle du cycle des protozoaires qui varie suivant la température.

Le traitement dans un aquarium nu permet de maintenir facilement la concentration thérapeutique choisie (0,15 mg/litre pour l'ion cuivrique) mais l'absence de filtration nuit rapidement à la qualité de l'eau et le manque de décors et de cachettes possibles a des répercussions possibles sur le comportement psychophysiologique des poissons traités.

Dans un aquarium fonctionnant normalement, pour retarder la disparition du cuivre, il est utile d'ajouter un complexant à groupement aminé comme le Tris mais il faudra surveiller fréquemment la concentration en ions cuivriques, ce qui est relativement aisé par de simples mesures colorimétriques.

En cas de surdosage, visible à l'accélération de la respiration des poissons,

l'ajout de chélateurs puissants comme l'EDTA permet de diminuer très rapidement la toxicité de l'eau. On peut arriver au même résultat, mais plus lentement, en augmentant la masse filtrante ou en utilisant du charbon actif.

Les poissons possèdent différents mécanismes de détoxification des métaux lourds et sont susceptibles d'une certaine adaptation que l'on peut entretenir par de légers traitements périodiques ou par la mise en place à demeure de plaques de cuivre dans les aquariums ne contenant pas d'invertébrés.

L'idéal étant de n'avoir pas besoin d'utiliser de traitement, une quarantaine rigoureuse est absolument indispensable pour les poissons d'importation dont les qualités sanitaires laissent généralement à désirer.

## Bibliographie

**Bauchot M. L. et Bauchot R.**, 1967 - *La vie des poissons. Coll. Les livres de nature - Ed. Stock*, 155p.

**Blasiola G. C.**, 1978 - Coral reef disease, *O. ocellatum*. *Marine Aquarist* 8, 7:53-58.

**Bouquegneau J.-B.H. et Noel-Lambot F.**, 1978 - Les Méthallothionéines: structure, fonction et incidence dans les milieux marins pollués par les métaux lourds, *in: Actualités de biochimie marine* 2: 219-232, GABIM-CNRS.

**Chapman G. A. et Me Crady J. K.**, 1977 - Copper toxicity: a question of form, *in: Récent advances in fish toxicology*, Ed. R. A. TUBB, 132-151. Corvallis, U.S. Environmental Protection Agency.

**Dempster R. P.**, 1955 - The use of copper sulfate as a cure for fish diseases caused by parasitic Dinoflagellates of the genus *Oodinium* *Zoologica* 40, 3: 133-138.

**Dempster R. P. et Shipman W. H.**, 1969 - The use of copper sulfate as a medicament for aquarium fishes and as an algaecide in marine

mammal water Systems. *Occasional papers n° 71 Californie Academy of Sciences* 6 p.

**Dixon D. G. et Sprague J. B.**, 1981 a - Copper bioaccumulation and hepatoprotein synthesis during acclimation to copper by juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 1, 1; 69-81.

**Diston D.G. et Bprague J. B.**, 1981 b - Acclimation to copper by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - a modifying factor in toxicity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 8: 880-888.

**Escoubet P. et Vicente N.**, 1979 - Etude de l'activité phosphatasique dans l'intestin de la rascasse (*Scorpaena porcus* L.) en microscopie photonique et microscopie électronique. *Vie marine* 1: 18-23.

**Fries J. et Getrost H.**, 1977 - Organic reagents for trace analysis. Ed: *Merck Darmstadt*, 453 p.

**Galle P.**, 1981 - Mécanisme d'élimination rénale de deux éléments du groupe III A de la classification périodique : l'aluminium et

l'indium C. R. Acad. Se. Paris, (3) 292, 1: 91-96.

**Herwig N.**, 1978 - Treatment of *Cryptocaryon* - Saltwater Ich. *Trop. Fish Hobb.* 26, 6; 55-62.

**Herwig N.**, 1980 - Disease prevention and control, the cyanide problem *Freshwat. Mar. Aquar.* 3. 4: 14-15, 73-79 et 5: 12-15, 85-88.

**Hignette M.**, 1978 - Accumulation de métaux dans les concrétions minérales des reins des Mollusques Lamellibranches, in: *Actualités de biochimie marine* 2: 195-206, GABIM-CNRS.

**Jackson G.A. et Morgan J. J.**, 1978 - Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limn. Oceanogr.* 23, 2: 268-282.

**Kagi J. H. et Nordberg M.**, 1979 - Metallothionein. *Experientia Supplementum* 34, Birkhäuser Verlag, 378 p.

**Keith R. E.**, 1981 - Loss of therapeutic copper in closed marine Systems *Aquaculture*, 24, 3-4: 355-362.

**Miklosz J. G.**, 1972 - Copper. *Marine Aquarist* 3, 3: 19-27.

**Morin L. G.**, 1980 - Disease prevention and control, basic chemistry of copper in the marine aquarium. *Freshwat. Mar. Aquar* 3, 12: 20-22, 83-88.

**Nigrelli R. F. et Ruggieri G. D.**, 1966 - Enzootics in the New York Aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (= *Ichthyophthirius marinus* Sikama, 1961), a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fishes. *Zoologica* 51, 3: 97-101.

**Noel-Lambot F., Gerday Ch. et Disteche A.**, 1978 - Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the ell *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* 61 C: 177-187.

**Noel-Lambot F.**, 1981 - Presence in the intestinal lumen of marine fish of corpuscles with a high cadmium-, zinc- and copper-binding capacity: a possible mechanism of

heavy metal tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4, 2: 175-181.

**Paperna I.**, 1980 - *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931)(Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *J. Fish Diseases.* 3, 5: 363-372.

**Prosi F.**, 1981 - Heavy metals in aquatic organisms in: *Förstner et Wittmann éd.: Metal pollution in the aquatic environment 2<sup>e</sup> éd.;* 271-323. Springer Verlag.

**Stiff M. J.**, 1971 - Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentration similar to those found in natural water. *Wat. Res* 5: 171-176.

**Sunda W. et Guillard R. L.**, 1976 - The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton *J. Mar. Res.* 34, 4: 511-529.

**Sunda W. et Lewis J. A.**, 1978 - Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.* 23, 5: 870-876.

**Takeshita G. Y.**, 1975 - Copper and its use. *Marine Aquarist* 6, 8:5-13.

**Terver D.**, 1980 - *Manuel d'aquariologie. Réalisations éditoriales pédagogiques*, 303 p.

**Tuck B. et Osborn E. M.**, 1960 - The colorimetric micro-détermination of copper in water: a survey of available methods. *Analyst* 85: 105- 110.

**Violetta G.**, 1980 - Disease prévention and control, a review of two epizootic marine protozoans: *Oodinium ocellatum* and *Cryptocaryon irritans*. *Freshwat. Mar Aquar.* 3, 6: 52-53, 70-72.