

Cercetări marine	I.R.C.M.	Nr.16	227 - 234	1983
------------------	----------	-------	-----------	------

LES EFFETS SPÉCIFIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE DE L'EXTRAIT DE *Brachionus plicatilis*

I.Neacșu¹, V.Crăciun¹, Margareta Crăciun¹ et Teodora Onciu²

Institut Roumain de Recherches Marines - Constanța

ABSTRACT:

The paper deals with the results of the experimental researches concerning the effect of total extract of Brachionus plicatilis on the membrane potential and on some pathogenical microorganisms.

Certaines invertébrés de petite taille ainsi que le Rotifère Brachionus plicatilis (O.F.MULLER, 1786) servent comme nourriture pour les organismes de grand intérêt économique qui font l'objet des cultures intensives.

Mais, dans les cultures de Brachionus on a observé que le développement des espèces qui y pénètrent est inhibé (4). On a tenté d'établir si Brachionus plicatilis contient des principes qui pourraient avoir des effets négatifs sur ceux qui s'en nourrissent, ou bien une action inhibitrice sur les microorganismes pathogènes. C'est pourquoi on a étudié l'effet de l'extrait de Brachionus plicatilis et du milieu extérieur sur le potentiel de membrane - un sensible indicateur de l'état physiologique de la cellule (3), bien que sur les microorganismes pathogènes résistant aux antibiotiques.

MATERIEL ET METHODES

Brachionus plicatilis obtenu en culture pure a été concentré par filtration en eau distillée. Après la décongélation, 4 g de rotifères ont été séparés du milieu liquide, puis mojarés. On a procédé ensuite à l'extraction des principes hydrosolubles en eau distillée à laquelle on a ajouté les sels nécessaires pour la solution physiologique Ringer pour grenouille (6) (100 ml), au pH de 7,2 (R.N.). L'extrait total obtenu ainsi a été filtré et en fin utilisé dans une série d'expérimentations afin de déterminer le potentiel de membrane. C'est pour établir si Brachionus plicatilis élimine des principes actifs au niveau de la membrane, qu'on a utilisé dans une seconde série d'expérimentations l'eau distillée en laquelle on a conservé les rotifères. On lui a ajouté les sels nécessaires pour la solution Ringer à pH de 7,2.

On a déterminé le potentiel de membrane sur les fibres musculaires striées de Sartorius de grenouille (Rana ridibunda), à l'aide de la méthode des microélectrodes intracellulaires en verre. Chaque expérimentation a été réalisée à la température du milieu ambiant (22°C), sur 5 muscles Sartorius provenant de différents animaux. On a déterminé au commencement le potentiel normal de repos (PNR) de chaque muscle. L'action des principes actifs de Brachionus sur le potentiel de repos a été suivie pendant une heure par des déterminations de 10 en 10 minutes, bien qu'après le lavage, des préparations avec du Ringer normal afin d'observer la persistance des effets constatés. Toutes les valeurs qu'on discute sont des valeurs moyennes obtenues sur 15-20 déterminations pour chaque moment, sur des différentes fibres musculaires. Le calcul statistique a été réalisé à l'aide de la méthode Student.

Les ions de Na^+ , K^+ et Ca^{++} du milieu extérieur, ainsi que ceux de l'extrait total de Brachionus ont été déterminés par la méthode flamméphotométrique (les résultats exprimés en mg/100 ml).

C'est sur des microorganismes aérobés ou bien anaérobés, grampositifs ou grammégatifs (7, 11) résistants aux antibiotiques qu'on a suivi l'action antimicrobienne de l'extrait total de Brachionus ainsi que de son milieu extérieur. On s'est servi des suivantes souches de microorganismes: Staphylococcus aureus S.A.

217, Serratia marcescens 119-C.T.-12, Escherichia coli ATCC-10536, Klebsiella pneumoniae IP-53153, Candida albicans^{x)}. Celles-ci ont été ensemencées par des techniques spécifiques sur des boîtes Pétri, sur lesquelles on a mis des flacons cylindriques en métal, chacun contenant 0,2 ml de l'extrait total ou de milieu extérieur en concentration de 5;2,5 et 1,25 g/100 ml. C'est par le mesurage du diamètre de la zone d'inhibition en développement des micro-organismes qu'on a apprécié l'activité antimicrobienne.

RESULTATS

1. Les effets sur le potentiel de membrane

L'effet de l'extrait total de Brachionus 4 g% a été déterminé sur des fibres musculaires dont le potentiel normal de repos (PNR) était de 91,16 mV (es = $\pm$ 0,55 mV). En les plongeant en solution Ringer contenant de l'extrait total de Brachionus 4% on a constaté tout de suite un abaissement du potentiel de repos qui s'accroît progressivement pendant une heure (Fig.1A). Le potentiel de repos a eu en moyenne 85,89 mV, correspondant à une dépolarisation de la membrane de 5,27 mV. Après le lavage des préparations à solution Ringer normale (RN) dépourvue d'extrait de Brachionus, on pouvait constater une réduction échelonnée de la dépolarisation, ainsi qu'après une heure, le potentiel de repos a atteint des valeurs confondables avec celles de début.

L'action du milieu extérieur - celui qui contenait les rotifères - a été suivie sur des fibres musculaires ayant un potentiel normal de repos (PNR) de 92,23 mV (es = $\pm$ 0,46 mV). En les traitant avec solution Ringer qui contient du milieu externe de Brachionus (Fig.1B) on peut constater toujours une dépolarisation moyenne de la membrane de 5,39 mV. En mettant petit à petit les préparations en solution Ringer normale, on a constaté que la dépolarisation se réduit graduellement, mais les valeurs initiales sont atteintes plus tard, après 60 minutes, pouvant constater encore une dépolarisation de 0,70 mV.

^{x)} Les expérimentations sur les microorganismes ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie de la Faculté de Biologie de Iași, par Dr. Octavia AILIESEI et Elena PRICOP auxquelles nous remercions encore une fois par cette voie.

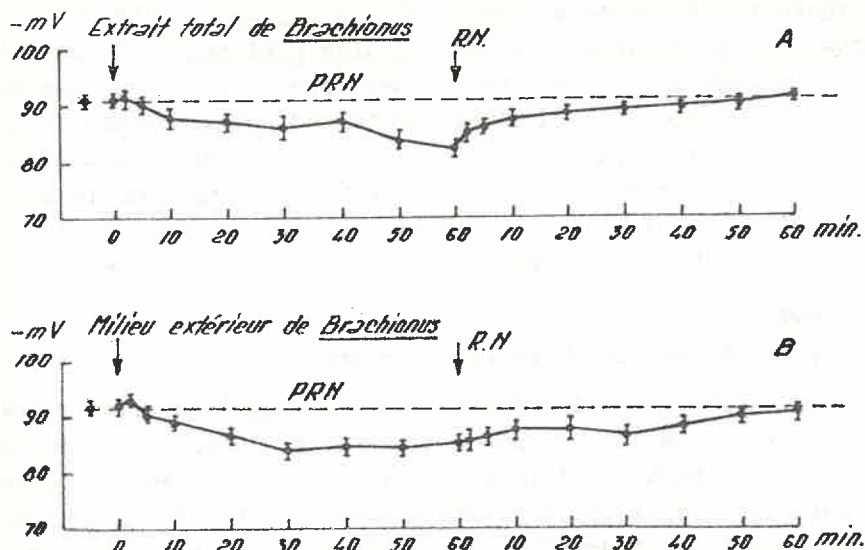


Fig.1 - L'effet de l'extrait total de *Brachionus* et de son milieu extérieur sur le potentiel de membrane

Pour établir si le phénomène est dû à des principes actifs produits par *Brachionus* ou bien à un excédent des ions libérés par la trituration des organismes ou par leur maintien dans le milieu dans lequel ils y étaient transportés, on a déterminé à l'aide de la méthode flamme-photométrique la concentration de Na^+ , K^+ et Ca^{++} dans la solution Ringer préparée avec l'extrait total de *Brachionus* ou avec son milieu extérieur par rapport à la concentration des ions dans la solution Ringer normale. Il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne les concentrations des ions dans les trois solutions (Tableau 1).

Cependant, le rapport $\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$ tellement nécessaire pour le maintien du potentiel de repos à des valeurs normales n'est pas modifié (2, 8).

Tableau 1

La teneur en ions de Na^+ , K^+ et Ca^{++} dans la solution Ringer à l'extrait total de Brachionus ou son milieu extérieur par rapport à celle de la solution Ringer normale

Echantillon	Na^+ (mg %)	K^+ (mg %)	Ca^{++} (mg %)	$\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$
Solution Ringer à l'extrait total de <u>Brachionus</u>	247,00	12,50	7,40	1,69
Solution Ringer au milieu extérieur de <u>Brachionus</u>	249,00	12,50	8,00	1,56
Solution Ringer normale	261,00	11,80	7,40	1,61

2. Les effets antimicrobiens

En ce qui concerne l'action antimicrobienne de l'extrait total de Brachionus et de son milieu extérieur, celle-ci est limitée à la cessation du développement de Serratia marcescens, plurirésistante aux antibiotiques. La zone d'inhibition était de 18 mm en diamètre pour le milieu extérieur et de 20 mm pour l'extrait total en concentration de 2,5 g/100 ml et de 1,25 mg/100 ml. Pour celle de 5 g/100 ml on n'a pas constaté une activité antimicrobienne évidente.

L'action de l'extrait total de Brachionus ou bien de son milieu extérieur sur Staphylococcus, Klebsiella, Escherichia et Candida est nulle.

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

La valeur du potentiel de membrane est déterminée en général par la structure et les propriétés de la membrane cellulaire, ainsi que par les gradients ioniques transmembranaires (en principal Na^+ et K^+) et par la perméabilité relative de ces ions par la membrane (5, 9). Le déplacement des ions dans le sens de leurs gradients de concentration, ce qui constitue la perméabilité passive de la membrane, dépend du degré d'entrelacement des structures supramoléculaires de la membrane. La différence de concentration des ions du compartiment intracellulaire et de celui extracellulaire est maintenue grâce à un transport actif des ions, contre leur gradient de concentration, par l'activité de la pompe

"électrogène" de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (1, 5) avec une dépense d'énergie résultée de la décomposition de l'ATP à l'aide de l'ATP-ase dépendante de Na^+ et K^+ (10).

On peut constater de nos expérimentations que le milieu extérieur de Brachionus, ainsi que l'extrait total, déterminent une dépolarisation de la membrane réversible si on remet les préparations dans la solution Ringer normale. Ceci dénote que dans l'extrait total de Brachionus, ainsi que dans son milieu extérieur existe un principe actif hydrosoluble qui diminue le degré d'entrelacement des structures supramoléculaires de la membrane, ayant bien pour conséquence l'augmentation de la perméabilité passive de la membrane, l'abaissement des gradients ioniques de concentration par la membrane, ainsi que la dépolarisation de celle-ci. Mais un pareil effet peut résulter aussi de la diminution du transport actif des ions, par l'inhibition de l'activité de l'ATP-ase dépendante de Na^+ et K^+ (1, 5, 10). La dépolarisation de la membrane implique aussi une modification de la propriété changeante des ions de la couche extérieure de la membrane et une baisse du seuil de la sensibilité de celle-ci à l'action de certains agents extérieurs (2, 8). C'est possible que les principes actifs du Brachionus aient une action modificatrice aussi sur le transport passif ainsi que sur celui actif des ions, ou qu'ils aient une interaction directe avec les ions de K^+ et de Ca^{++} au niveau de la membrane, ainsi que l'action dépolarisante de K^+ soit favorisée (2, 8).

Puisqu'il ne se produisent pas de modifications significatives des concentrations des ions dans la solution Ringer par l'addition de l'extrait de Brachionus c'est certainement que la dépolarisation est déterminée par une substance produite par l'organisme.

Vu que l'effet est à grande peine réversible après l'éloignement de la substance, c'est explicable par le lien assez fort de celle-ci à la structure de la membrane.

C'est par les expérimentations sur les microorganismes qu'on peut constater que l'action antimicrobienne de l'extrait total de Brachionus est sélective, parce que seulement le développement de la culture de Serratia marcescens est inhibée. Mais, toutefois, c'est possible que le principe actif du Brachionus

puisse inhiber bien d'autres organismes pathogènes qui ne font pas l'objet du présent travail. Des prochaines recherches supplémentaires seront nécessaires pour préciser la nature des phénomènes.

On a observé que Brachionus plicatilis inhibe le développement des autres invertébrés de petite taille qui pénètrent dans les bassins où il vit, effet dû probablement à l'élimination de certaines substances dans le milieu extérieur.

Il semble, d'après nos recherches, que celles-ci ont des effets spécifiques sur la membrane cellulaire. Tout de même, Brachionus est bien toléré comme nourriture pour les jeunes des poissons. On peut supposer que la substance active à action spécifique est inactivée par les enzymes digestifs des poissons, ou bien que celle-ci a une action d'équilibration de la microflore intestinale. Toutefois, l'effet dépolarisant peut avoir comme conséquence une augmentation de la perméabilité de la paroi intestinale et favorisant aussi l'absorption intestinale.

On peut conclure également que ce principe actif contenu par Brachionus peut être éliminé dans le milieu extérieur et qu'il n'est pas inactivé par la congélation.

BIBLIOGRAPHIE:

1. ADRIAN R.H., SLAYMAN C.L., 1966 - Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium and rubidium in frog muscle. J. Physiol. London, 184: 970.
2. AGRIGOROEI St., NEACSU I., CRACIUN V., AGRIGOROEI G., 1981 - Forms and conditions of achievement of the membrane response at various values of the external $K^+ : Ca^{2+}$ ratio. Rev. Roum. Biol. - Biol. Anim., 26, 2: 165.
3. BEIGELMAN P.M., SHU M.J., 1972 - Adipose resting membrane potential: in vitro responses to Cl^- and K^+ ; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141: 618.
4. DE LA CRUZ A., MILLARES N., 1974 - Metodo de cultivo masivo de Brachionus plicatilis (Rotifera) a escala experimental. Serie 8, Invest. Mar. Ciencias, 11.
5. DE WEEER P., 1975 - Aspects of the recovery processes in nerve, Physiology, Series one, 3, Neurophysiology, ed. by C.C. Hunt, Butterworths London, Univ. Park Press Baltimore.

6. ETZENSPERGER J., 1970 - Effets des anesthésiques locaux sur le potentiel d'action et la secousse de la fibre musculaire squelettique de grenouille. J.Physiol., Paris, 62, 4: 315.
7. IVANOF A., CIUPE M., SASCA C., VANCEA D., 1982 - Microbiologie. Ed.Did.și Ped., București.
8. NEACSU I., CRACIUN V., AGRIGOROAEI St., CRACIUN M., 1978 - The influence of external pH on the cell membrane phase transitions induced by K^+/Ca^{2+} ratio modifications. Anal.St.Univ."Al.I.Cuza" Iași, sect.II,Biol., 24: 127.
9. SCHOFFENIELS E., 1967 - Cellular aspects of membrane permeability. Pergamon Press, Oxford,London,Edinburg, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig.
10. SKOU J.C., 1971 - The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys.Acta, 23: 394.
11. ZARNEA G., 1970 - Microbiologie generală, Ed. Did. și Ped., București.