

## RECHERCHE D'UN TEST PERMETTANT DE COMPARER L'ACTIVITÉ RESPIRATOIRE DES HUITRES AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA MALADIE DES BRANCHIES

par Edouard HIS

### **Introduction.**

En dehors des appareillages complexes servant à mesurer les taux de filtration des huîtres et l'intensité de leurs phénomènes respiratoires, il existe des méthodes plus simples qui permettent d'étudier d'une façon relative les variations de ces fonctions essentielles des lamellibranches suivant leur état physiologique et les conditions de milieu. Les colorants vitaux ont souvent été utilisés dans ce but. H.A. COLE et B.T. HEPPER (1954) préconisent l'emploi du rouge neutre pour les études comparées de la filtration chez *Mytilus edulis* parasitée par *Mytilicola intestinalis*; G.D. WAUGH et D. KEY (1957) ont expérimenté la rhodamine B sur *Mercenaria mercenaria* et *Ostrea edulis*.

Cherchant à déterminer quelles pouvaient être les conséquences de l'altération des branchies de *Crassostrea angulata* L. causée par un parasite indéterminé, nous avons pensé que le bleu de méthylène pouvait fournir des indications intéressantes sur l'intensité des phénomènes respiratoires de l'huître portugaise malade.

### **Principe.**

Nos travaux sont inspirés des expériences décrites par A. OBRE, F. CAMPAN et R. CHANTON (1954) dans leur chapitre concernant la respiration tissulaire. Un fragment de *Mytilus sp.* est plongé dans une solution de bleu de méthylène à l'abri de l'air. Au cours des phénomènes de déshydrogénation des métabolites, le colorant, très sensible aux actions réductrices, se comporte en absence d'oxygène libre, en accepteur artificiel de l'hydrogène, donnant ainsi naissance à un leucodérivé. La décoloration de la solution de bleu de méthylène est l'indice de l'activité déshydrogénasique du tissu. Au contact de l'oxygène atmosphérique, le leucodérivé redonne naissance à la forme colorée, l'oxygène devenant à son tour l'accepteur d'hydrogène. Les mêmes phénomènes se produisent si l'on remplace un fragment de tissu par un lamellibranche vivant. Le processus est entamé dès que le mollusque entr'ouvre ses valves et que commence la circulation de l'eau dans la cavité palléale; il est d'autant plus important pour un individu d'un poids donné que la respiration est plus intense grâce au débit de pompage, à la rapidité des courants ciliaires et à la surface branchiale.

### **Conditions expérimentales.**

Nous avons remplacé le fragment de tissu de moule par une huître vivante, que nous avons placée dans un litre de solution de bleu de méthylène dans l'eau de mer, recouverte d'une couche isolante d'huile. A la concentration de 2 mg/l l'activité physiologique des *Crassostrea angulata* semblait peu perturbée et au bout de 7 heures les différences de décoloration étaient suffisantes pour permettre de distinguer les différences de comportement des sujets testés.

Nous avons choisi des huîtres de deux ans pesant 25 à 30 g, que nous avons soumises aux expériences de façon uniforme afin de réduire au maximum les causes d'erreur dues à des différences de manipulation. Prélevées toujours sur le même parc d'élevage, elles étaient laissées à la température du laboratoire (17 à 20°) pendant 24 heures avant d'être immergées dans une eau de mer de salinité voisine de celle du lieu de ramassage et portée à la température ambiante. Dans ces conditions, conformément aux indications de P.S. GALTSOFF (1946), la filtration devait se produire le plus rapidement possible et de façon identique pour tous les individus.

Les expériences ont été arrêtées avant la période de maturité sexuelle.

La décoloration était mesurée par la méthode de déviation au photocolorimètre. Nous avons tracé une courbe d'étalonnage qui donne la concentration en bleu de méthylène de la solution, en fonction de l'intensité de coloration; elle nous permet d'exprimer en milligrammes les quantités de leucodérivé formé.

150 *Crassostrea angulata* ont été soumises à ce test, puis ouvertes après sept heures d'expérience; nous notons alors le degré d'évolution de la maladie des branchies en fonction de la classification établie dans les différents laboratoires de l'Institut des Pêches et rapportée par L. MARTEIL (1968) :

stade 1: présence d'une indentation ou d'un contour nettement festonné sur l'un des feuillets,

stade 2 : altérations profondes et nombreuses sur un ou plusieurs feuillets, en réduisant notablement la surface,

stade 3 : disparition quasi-totale des branchies, réduites à des lambeaux déchiquetés.

Par ailleurs nous avons suivi l'apparition du leucodérivé au cours du temps pendant 9 heures sur 60 individus supplémentaires.

Enfin nous avons pesé chaque huître entière, puis sa chair après séchage à l'étuve à 60° jusqu'à poids constant.

### Résultats.

#### 1°) Décoloration du bleu de méthylène en fonction du degré d'évolution de la maladie des branchies.

Les quantités en milligrammes de bleu de méthylène transformées en son leucodérivé ont varié dans des proportions importantes selon les individus. Nous avons groupé ces valeurs sur les quatre diagrammes de la figure 1 après avoir classé les 150 sujets examinés selon le degré d'évolution de la maladie.

Les hasards du prélèvement ont conduit à la répartition suivante : 45 huîtres saines ne présentant pas d'altération visible à l'œil nu des feuillets branchiaux soit 30 %; 57 au stade 1 soit 38 %; 28 au stade 2 soit 19 %; 20 au stade 3 de la maladie soit 13 % du lot.

Pour les huîtres saines (diagramme A), les valeurs de transformation du bleu de méthylène en son leucodérivé sont comprises entre 1,78 et 0,57. La moyenne est de 1,39, elle représente une réduction de 70 % du colorant vital employé.

Pour les huîtres au stade 1 (diagramme B), les limites sont 1,29 et 0,87 avec un seul dépassement au-dessus de 1,27. La moyenne 1,18 indique un taux de réduction de 59 %.

La zone commune aux diagrammes A et B intéresse seulement 4 cas sur 102 (4 %).

Pour les *Crassostrea angulata* au stade 2 (diagramme C) les limites sont 1,07 et 0,24 et la moyenne 0,78 c'est-à-dire 39 % des 2 milligrammes de bleu de méthylène initiaux. Le chevauchement des diagrammes B et C couvre les valeurs comprises entre 0,87 et 1,07 mg et intéresse 24 cas sur 85 (28 %), 14 au stade 1 et 10 au stade 2.

Enfin pour les huîtres au stade 3 (diagramme D) les quantités extrêmes de 0,66 et 0,02 mg encadrent un résultat moyen de 0,26 soit seulement 13 % du colorant en solution. La partie commune des diagrammes C et D est comprise entre 0,31 et 0,24 si l'on exclut la valeur extrême de 0,66 atteinte une seule fois. Dans cette zone se situent 9 cas sur 48 (18 %) : 2 au stade 2 et 7 au stade 3.

Ce test ne permet donc pas de façon absolue la séparation des stades établis pour suivre l'évolution de la maladie des branchies. Toutefois la classification adoptée, basée sur des critères morpho-

logiques, est elle-même subjective; ceci permet d'expliquer les quelques anomalies rencontrées avec les inévitables différences de comportement des huîtres mises en expérience malgré les précautions prises. Cependant les moyennes de décoloration obtenues pour chaque stade sont nettement distinctes. On constate une diminution très sensible des phénomènes de déshydrogénation des sujets sains aux plus fortement atteints. Les premiers ont décoloré 1,39 mg de bleu de méthylène. Si l'on

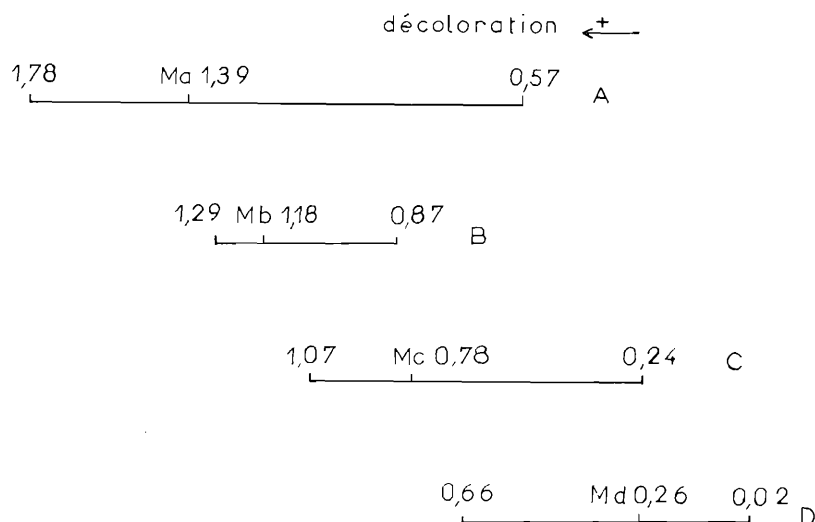


FIG. 1. — Diagramme indiquant les quantités moyennes et extrêmes de bleu de méthylène décoloré en 7 heures, exprimées en mg de colorant réduit. A : huîtres saines, Ma : moyenne de leucodérivé obtenu pour les huîtres saines. B : huîtres au stade 1; C : huîtres au stade 2; D : huîtres au stade 3; Mb, Mc, Md : moyennes correspondantes.

considère pour la catégorie de *Crassostrea angulata* choisie que cette quantité représente 100 % du pouvoir de décoloration, il est alors possible pour les différents stades de calculer la perte du pouvoir de décoloration : stade 1 : 17 %, stade 2 : 44 %, stade 3 : 89 %.

## 2°) Vitesse de décoloration.

Nous avons suivi pendant 9 heures l'apparition du leucodérivé en fonction du temps et selon le degré d'évolution de la maladie des branchies. Pour cela nous prélevions d'heure en heure 20 cm<sup>3</sup> de la solution en eau de mer à travers la couche d'huile. La lecture était faite immédiatement de façon à empêcher au maximum la réoxydation du colorant réduit, au contact de l'oxygène atmosphérique. Il fallait aussi éviter de modifier le fonctionnement physiologique des mollusques, ceux-ci refermant brusquement leurs valves à la moindre perturbation. Pour ces raisons ces expériences ont été faites sur 60 *Crassostrea angulata* supplémentaires et les résultats obtenus au bout de 7 heures n'ont pas été pris en considération pour l'étude précédente.

Nous avons noté 17 huîtres saines, 20 au stade 1, 15 au stade 2 et 8 au stade 3 de la maladie des branchies.

Malgré le nombre plus restreint d'individus les valeurs atteintes pour la même durée sont comparables à celles qui ont déjà été établies.

Nous avons calculé les vitesses moyennes horaires de décoloration après avoir classé les huîtres en fonction de leur degré d'atteinte par la maladie : elles sont respectivement de 16.10<sup>-2</sup> mg/h pour les sujets sains; 13.10<sup>-2</sup> pour les sujets au stade 1; 9.10<sup>-2</sup> au stade 2; 4.10<sup>-2</sup> au stade 3.

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer les courbes de décoloration dans le temps (fig. 2) : dès la première heure elles sont bien distinctes; les changements de pente observés sur chaque courbe mettent en évidence les variations de la vitesse de réduction du bleu de méthylène pendant la durée des expériences.

La moitié du leucodérivé apparu en 9 heures est obtenue en deux heures dans les expériences conduites avec les sujets sains (courbe A). Un léger fléchissement de la courbe se produit après 3 heures, il traduit un ralentissement du phénomène.

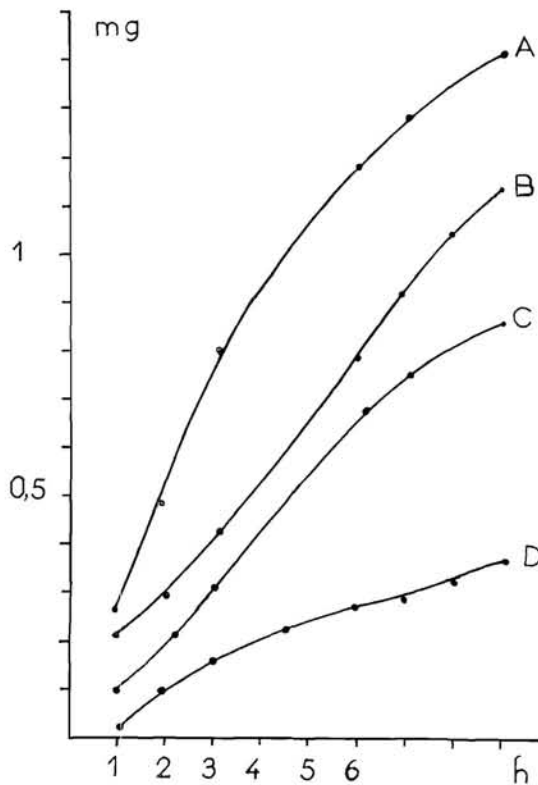


FIG. 2. — Courbes de décoloration par réduction du bleu de méthylène en fonction du temps pour *Crassostrea angulata*. A : huîtres saines; B : huîtres au stade 1; C : huîtres au stade 2; D : huîtres au stade 3.

Les huîtres au stade 1 se caractérisent par une vitesse de décoloration sensiblement constante. Dans ce cas plus de 4 heures sont nécessaires pour que 50 % de la quantité du bleu de méthylène réduite en 9 heures soient transformés (courbe B).

Pour les *Crassostrea angulata* au stade 2, les choses se passent différemment (courbe C) : pendant la première heure 0,07 mg seulement de leucodérivé sont apparus contre 0,22 précédemment; puis les vitesses de décoloration sont du même ordre de grandeur aux stades 1 et 2 pendant les 6 premières heures ainsi que l'indiquent les pentes voisines des courbes B et C. On note enfin un ralentissement très net du phénomène chez les sujets au stade 2.

Au stade 3 de la maladie des branchies la faible pente de la courbe D indique bien la lenteur d'apparition du leucodérivé surtout après 3 heures d'expérience.

Nous avons calculé dans une première série d'observations les taux de perte du pouvoir de décoloration manifestés par les huîtres au fur et à mesure de l'évolution de la maladie des branchies.

Nous pouvons, à partir des données de cette deuxième série d'expériences, calculer la diminution de la vitesse horaire de décoloration des huîtres malades par rapport aux saines. Elle est respectivement de : 19 % pour les sujets au stade 1, 44 % pour ceux du stade 2 et 75 % pour ceux du stade 3.

### 3°) Variations pondérales en fonction du degré d'évolution de la maladie.

Les huîtres utilisées au cours de ces expériences étaient âgées de deux ans environ; prélevées sur le même parc, leur poids vif était du même ordre de grandeur, indépendamment de l'état physiologique du mollusque (en moyenne 26 à 29 g).

Il devient alors intéressant de comparer les poids secs de la chair, en fonction du degré d'évolution de la maladie. En effet un mauvais état physiologique se traduit d'abord par une perte des substances de réserve (ici lipides et glycogène) :

	Saines	Stade 1	Stade 2	Stade 3
Poids vifs moyens (en g) .....	29,6	28,1	26,6	25,7
Poids secs moyens de la chair (en g) .....	0,73	0,66	0,49	0,25
% de perte en poids sec de la chair .....		9	32	66

Les résultats obtenus permettent de constater que l'évolution de la maladie des branchies s'accompagne d'une perte sensible du poids sec de la chair atteignant en moyenne 9 % au stade 1, 32 % au stade 2 et 66 % au stade 3. On remarque que ces derniers chiffres sont inférieurs à ceux obtenus lors de l'étude de la perte du pouvoir de décoloration.

### Conclusions.

Le rôle des branchies et tout particulièrement des cils branchiaux dans l'établissement des courants respiratoires qui assurent tout au moins en partie l'ématose du sang chez l'huître, est bien connu.

La maladie des branchies, réduisant d'une part l'importance de l'appareil ciliaire et d'autre part les surfaces d'échange entre eau des courants respiratoires et sang, a donc une influence néfaste tant sur la simple mécanique respiratoire que sur l'intensité des échanges gazeux chez les mollusques atteints.

Seules des mesures absolues de consommation d'oxygène et d'intensité respiratoire pourraient permettre d'évaluer les différences existant entre *Crassostrea angulata* saines et malades.

Le test du bleu de méthylène, d'une application facile, permet cependant d'indiquer rapidement le sens général des modifications produites et d'obtenir les relations existant entre l'activité déshydrogénase et par suite la respiration tissulaire et le degré de dégradation du mollusque.

On constate ainsi, parallèlement à une perte progressive en poids sec de la chair, une réduction beaucoup plus sensible des vitesses et des intensités des phénomènes respiratoires, avec l'évolution de la maladie des branchies.

On peut se demander si les pourcentages beaucoup plus élevés de perte du pouvoir de décoloration, comparés aux pourcentages de perte en poids sec, ne sont pas le signe de perturbations au niveau du métabolisme cellulaire de l'huître.

### AUTEURS CONSULTÉS

- COLE (H.A.) et HEPPER (B.T.), 1954. — The use of neutral red solution for the comparative study of filtration rates of lamellibranchs. — *J. Cons.*, **20**, n° 2 : 197-203.
- GALTSOFF (P.S.), 1946. — Reaction of oysters to chlorination. — *U.S. Fish and Wild. Serv. Res. Rep.*, **11** : 1-2.
- MARTEIL (L.) 1968. — La maladie des branchies. — *Cons. int. Explor. Mer, Com. Crustacés, Coquillages et Benthos*, C.M., 1968/K : 5.
- OBRE (A.), CAMPAN (F.) et CHANTON (R.), 1954. — Biologie cellulaire. — G. DOIN et Cie Edit.
- WAUGH (G.D.) et KEY (D.), 1967. — Experiments with rhodamine B and European flat oyster (*Ostrea edulis* L.). — *J. Cons.*, **31**, n° 2 : 272-278.
-