

ETUDE HISTOENZYMOLOGIQUE DE LA DIGESTION
CHEZ *RUDITAPES PHILIPPINARUM*

Anne HILY

Faculté des Sciences - BREST 29200

RESUME

L'étude du transit alimentaire et l'évolution des tubules de la glande digestive, après une prise de nourriture, mettent en évidence une continuité des processus de digestion chez les juvéniles de *R. philippinarum*.

L'étude histoenzymologique du tractus digestif précise l'importance des activités enzymatiques intracellulaires dans l'épithélium stomacal, la glande digestive et les cellules intestinales. Les cellules digestives, grâce aux enzymes associés au système vacuolaire, assurent une grande part de la digestion.

ABSTRACT

Examinations of alimentary tract and digestive tubules after feeding give evidence of continuous digestive process in juveniles of *Ruditapes philippinarum*.

Histoenzymologic study of digestive tract suggests important intracellular enzymatic activities in stomacal epithelium, digestive gland and intestinal cells.

Main part of intracellular digestion occurred in digestive cells by lysosyme associated with vacuolar system.

MOTS CLES : Bivalve, digestion, enzymes digestives

KEY WORDS : Bivalve, digestion, digestive enzymes.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de YONGE (1926) qui a énoncé une première interprétation de la digestion chez les mollusques bivalves, de nombreuses études ont été réalisées. Elles apportent des résultats variables liés à l'environnement et aux conditions de nutrition différentes des espèces étudiées. De nouvelles théories ont été élaborées par OWEN (1966), PURCHON (1971), MORTON (1973) qui mettent en évidence des caractères communs de la digestion chez les bivalves notamment le rôle des différentes régions du tube digestif. D'autres paramètres semblent toutefois moins uniformes comme l'importance relative des processus de dégradation extra et intracellulaire, ainsi que le mode continu ou rythmique de la digestion.

Dans cette étude, chez des juvéniles de *Ruditapes philippinarum*, le transit alimentaire et le fonctionnement de la glande digestive sont précisés ainsi que la localisation de quelques enzymes digestives.

MATERIEL ET METHODES

Le naissain de *Ruditapes philippinarum* est fourni par l'écloserie de la SATMAR.

L'étude du transit alimentaire est réalisée sur des palourdes mis à jeun pendant 72 h. L'apport de nourriture est assuré sous la forme d'une suspension algale de *Rinaliela primolecta* à la concentration de 10^5 cell/ml pendant 1 heure. Les animaux sont ensuite remis en eau filtrée renouvelée régulièrement pour éviter l'intervention des pseudofeces et feces expulsés.

Différentes techniques d'histologie ont été utilisées.

- Technique de cryomicrotomie

Des coupes à congélation sont effectuées au cryomicrotome elles sont utilisées selon deux protocoles.

. après montage, les coupes sont observées pour l'étude du transit alimentaire. La présence et l'abondance du matériel présent dans les différentes parties du tractus digestif est noté à intervalle régulier après l'ingestion de nourriture. . diverses activités enzymatiques sont recherchées sur les coupes à congélation par des techniques d'empreintes pour l'amylase, les protéases non spécifiques et par des techniques de précipitation décrites dans le tableau 1 pour les autres enzymes recherchées.

- Technique de Microscopie électronique.

Les échantillons sont fixés pendant 2 heures dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate à 0,2M à pH = 7,3 d'osmolarité ajustée à 1 400 mosm par du NaCl. Une post-fixation dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 1 % dure une heure. Après un lavage soigneux les échantillons sont deshydratés puis inclus dans le mélange de spurr.

RESULTATS

1. Anatomie du tube digestif

L'étude de coupes histologiques sériées, a permis de reconstituer l'anatomie du tractus digestif chez les juvéniles de *Ruditapes philippinarum* et d'en donner une représentation schématique (Figure 1). Le tube digestif est constitué d'un oesophage tubulaire légèrement incurvé. Il traverse la glande digestive et débouche dans l'estomac. L'épithélium stomacal est bordé dorsalement par le bouclier gastrique. L'estomac se prolonge par une formation allongée, le sac du stylet entourant la tige cristalline (Planche 1, Figure 1).

Le sac du stylet est bordé latéralement par un renflement : la gouttière intestinale se prolongeant par l'intestin qui développe quatre circonvolutions. La glande digestive forme une masse globuleuse entourant l'oesophage et la région antérieure de l'estomac. Elle consiste en un très grand nombre de tubules constituant les extrémités d'un réseau de conduits ramifiés.

2. Transit alimentaire

Les observations de matériel dans les différentes parties du tube digestif sont notées dans le Tableau 2.

Dès l'apport de nourriture, les animaux ingèrent des cellules algales, ce comportement aboutit au remplissage du tube digestif au bout de 30' à 1 heure. Les premières heures suivant l'ingestion voient l'élimination de l'excès de bol alimentaire, une grande quantité d'algues intactes sont visibles dans les anses intestinales, elles traversent le tube digestif sans être altérées. Cette phase intense d'élimination dure pendant 4 à 5 heures et se prolonge de manière plus modérée jusqu'à 8 heures après l'ingestion.

Les cellules algales restent peu de temps dans la lumière stomacale, elles sont rapidement visibles contre la paroi.

L'entrée de cellules algales est notée au bout d'une heure dans la glande digestive où les conduits et les tubules digestifs se remplissent.

Une seconde phase débute vers 10 h. Elle correspond à l'élimination intense de résidus de la digestion. Du matériel brunâtre est expulsé dans les conduits de la glande. Il est évacué par la gouttière intestinale et les anses intestinales successives. Les quantités de matériel expulsé sont importantes jusqu'à 15 h puis le phénomène s'atténue mais il n'est pas achevé au bout de 24 heures.

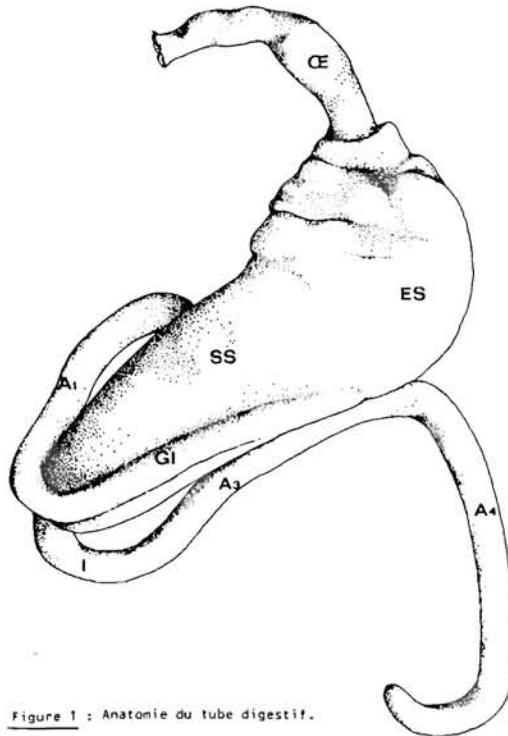


Figure 1 : Anatomie du tube digestif.

OE : oesophage - SS : sac du stylet

ES : estomac - I : intestin

GI : gouttière
intestinale

A₁
A₂ } anses intestinales
A₃

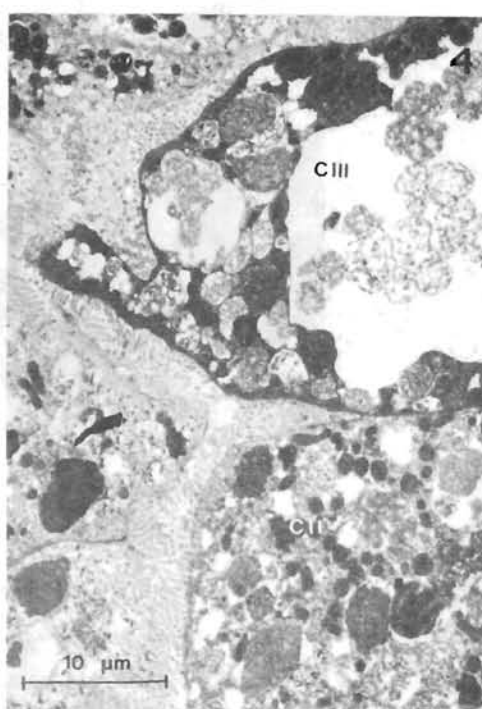
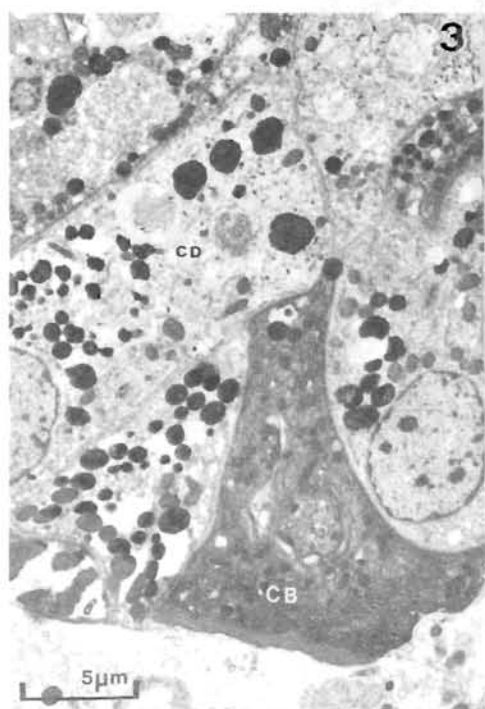
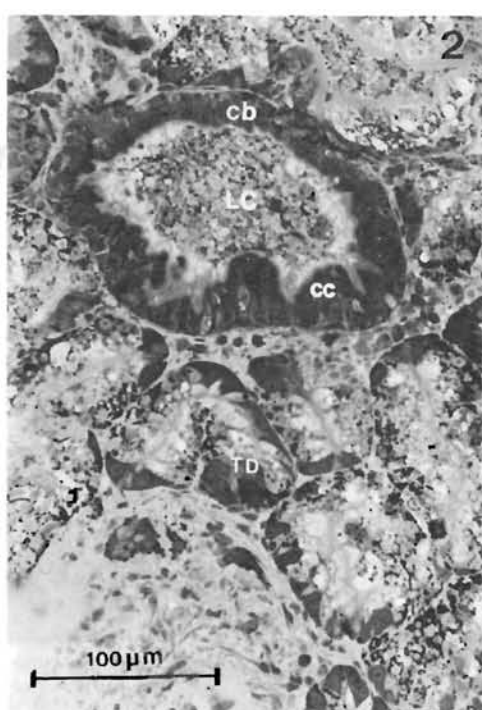
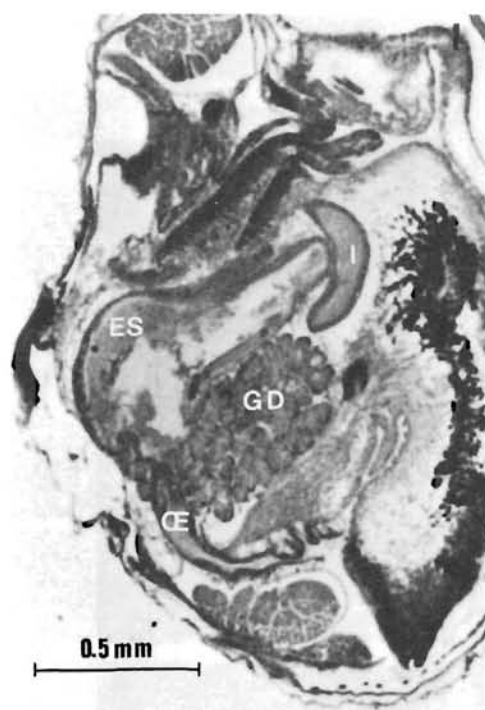
PLANCHE 1 :

Figure 1 - Coupe sagittale d'un juvénile de *Ruditapes philippinarum*.

Figure 2 - Coupe semi fine de la glande digestive.
Tubule digestif (TD) ; cellule ciliée (CC) ; cellule à
bordure en brosse (CB) ; lumière du conduit (LC).

Figure 3 - Tubule digestif (TD) ; cellule basophile (CB) ; cellule
digestive au stade I (CI).

Figure 4 - Région apicale de cellules digestives au stade II et III
(C II, C III).



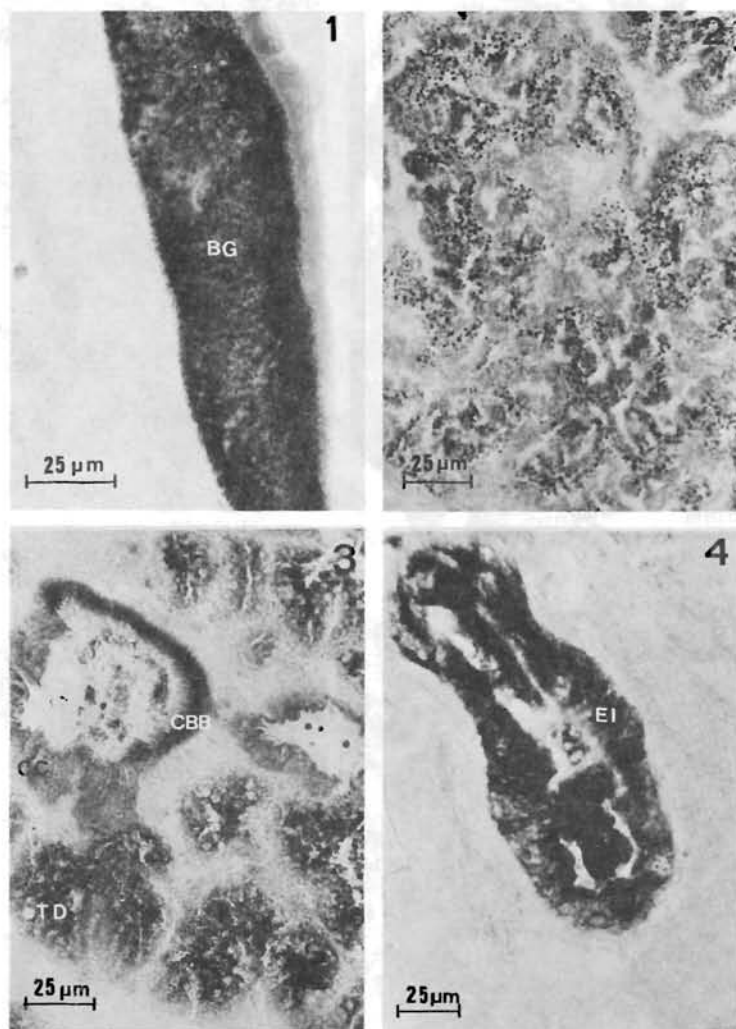


PLANCHE 2 :

Figure 1 - Activité chymotrypsique dans le bouclier gastrique(BG)

Figure 2 - α D glucosidase dans la glande digestive.

Figure 3 - Coupe de la glande digestive.

La phosphatase est visible dans les cellules à bordure en brosse des conduits.

Figure 4 - Activités estérasiqes dans l'épithélium intestinal et dans les résidus de digestion 12 h après l'alimentation.

3. Evolution de la glande digestive au cours de la digestion

La glande digestive représente un site important de la digestion chez les bivalves. Sa structure a été étudiée de façon plus précise. Elle est constituée d'un réseau de conduits dont l'épithélium est formé de cellules à bordure en brosse et de cellules ciliées (Planche 1, Figure 2). Les conduits s'ouvrent sur des tubules composés de plusieurs catégories cellulaires (Planche 1, Figure 3) : Des cellules pyramidales présentant les caractéristiques d'une cellule sécrétrice ; appareil de Golgi et ergastoplasme très développé. Des cellules digestives remarquables par leur système vacuolaire très développé. Le matériel exogène entre par pinocytose. Il est soumis à l'action d'enzymes hydrolytiques dans des vacuoles de type hétérolysosomes. Cette digestion intravacuolaire entraîne la formation de déchets concentrés dans des vacuoles très pigmentées : les corps résiduels.

L'étude ultrastructurale met en évidence dans un tubule digestif des cellules digestives à des stades d'évolution différents. Elles sont plus ou moins chargées en corps résiduels, les cellules proches du fond des cryptes en contiennent très peu tandis que les cellules centrales en sont abondamment pourvues. Ces variations ont conduit à une classification arbitraire des cellules digestives en trois stades :

I peu de corps résiduels

II abondance de corps résiduels (Planche 1, Figure 4)

III la région apicale de la cellule est transformée en une macrovacuole qui sera expulsée (Planche 1, Figure 4).

Le dénombrement des cellules digestives aux différents stades montre une évolution de la glande digestive pendant la digestion (Tableau 3). Pendant les dix premières heures, les cellules au stade I sont le lieu de digestion intracellulaire, elles se chargent en corps résiduels et se transforment en stade II. La proportion de cellules au stade III reste faible, elle reste inférieure à 25 %. Une diminution sensible est notée entre 12 et 15 heures.

4. Etude histoenzymologique

Des activités enzymatiques liées à la digestion ont été recherchées dans différentes régions du tube digestif chez des animaux nourris régulièrement. Les résultats sont notés dans le tableau 4.

Des observations complémentaires ont été réalisées dans un lot composé d'animaux ayant subi un jeûne de 3 jours avant d'être nourris à nouveau pendant une heure. L'apparition des activités enzymatiques a été étudiée pendant 24 heures.

- . Des activités enzymatiques extracellulaires ont été observées, notamment des lipases et de faibles quantités de protéases. Ces dernières sont visibles au bout de 15 h après l'ingestion de nourriture dans les conduits de la glande digestive, le sac du stylet et l'intestin. La plus forte activité est représentée par l'Amylase localisée dans l'estomac, le sac du stylet et la glande digestive (conduits et tubules) dès le début de la digestion.
- . Les autres enzymes recherchées présentent une localisation intracellulaire ou en liaison avec les bordures en brosse.

ENZYME	SUBSTRAT	SEL DE TETRAZOLIUM	AUTEUR
Chymotrypsine	Propionate de Naphtol AS	Fast Garnet GBG	Lagunoff (1967)
Trypsine	N ^α benzoyl arginine β naphthylamide hydrochloride	Fast Garnet GBG	Glenner et Cohen (1960)
Aminopeptidase I	L Leucyl 4 methoxy 2 naphthylamide	Fast blue B	Moore (1980)
Phosphatase acide	α naphthyl phosphate de sodium	Fast Garnet GBG	Grogg et Pearse (1952)
Phosphatase alcaline	α naphthyl phosphate de sodium	Fast Blue B	Gomori (1951)
Esterases non spécifiques	Acétate α naphthyl	Fast blue B	Burstone (1956)
α D glucosidase	6 bromo. 2 naphthyl α D gluco pyranoside	Fast blue B	Rutenburg et al. (1959)
N acetyl β glucosaminidase	Naphtol AS BI gluco-saminidase	Fast red violet	Moore (1976)
β glucuronidase	Naphtol AS BI gluco-ronide	Fast red violet	Moore (1976)

Tableau 1 : Techniques de précipitation pour la recherche d'activités enzymatiques.

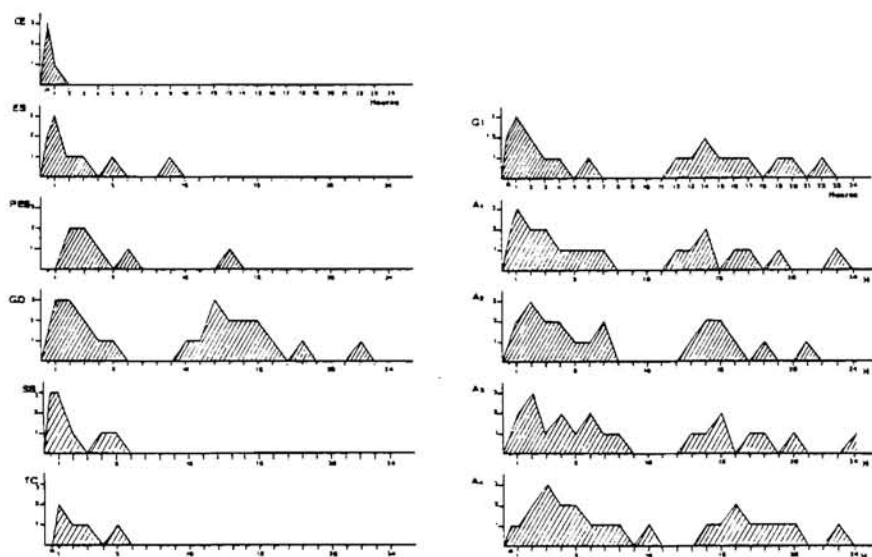


TABLEAU 2 - Localisation de matériel dans les différentes régions du tube digestif pendant 24 heures après l'alimentation. Le niveau de remplissage est noté selon une échelle de 0 à 3 (absent ou non vu, faible, moyen, beaucoup).

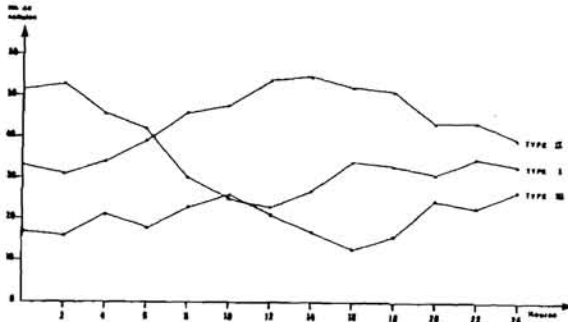


TABLEAU 3 - Evolution des cellules digestives aux trois stades pendant 24 heures après une prise de nourriture.

		Amylase	α D glucosidase	β glucurodinase	N acetyl β glucosaminidase	phosphatase acide	phosphatase alcaline	Esterases	Lipases	Protéases	Chymotrypsine	Amino-peptidase
ESTOMAC	Lumière estomac	•							•	•		
	Epithelium stomacal		•		•		•				•	•
	Epithelium bouclier gastrique	•	•	•	•	•	•	•			•	•
SAC DU STYLET	Epithelium sac du stylet						•				•	
	Typhlosole				•			•				
	Tige cristal-line	•							•	•		
INTESTIN	Gouttière intestinale			•	•	•	•	•			•	•
	Intestin			•	•	•	•	•			•	•
	Lumière intestin	•						•		•		•
GLANDE DIGESTIVE	Lumière conduit	•						•	•	•		
	cellule ciliée		•	•	•	•		•			•	•
	cellule à bordure en brosse		•	•	•	•	•	•	•		•	•
	cellule basophile							•			•	
	cellule digestive	•	•	•	•	•		•			•	•

Tableau 4 - Activités enzymatiques dans le tube digestif de *Ruditapes philippinarum*.

■ Enzymes protéolytiques

Chymotrypsine.

Les activités chymotrypsiques réduites par le jeûne augmentent dès l'entrée de la nourriture au niveau de l'épithélium stomacal, du bouclier gastrique (Planche 2, Fig. 1) et des conduits de la glande.

Au bout de 3 heures la gouttière intestinale et l'intestin sont le siège d'une forte réaction ainsi que les cellules des tubules digestifs.

Amino-peptidase I

Les activités amino-peptidasiques apparaissent vers 3 à 4 h. Elles sont visibles dans les cellules du bouclier gastrique, l'épithélium des conduits de la glande digestive et l'épithélium intestinal où l'essentiel des réactions est associé avec les bordures en brosse et des granules cytoplasmiques.

Dans les cellules digestives, l'activité se situe dans les vacuoles digestives.

■ Enzymes glycolytiques

α D glucosidase

Cette enzyme scinde les unités de maltose provenant de la dégradation des polysaccharides après l'action de l'amylase. L'activité est visible dans les cellules digestives au bout de 4 à 5 h (Planche 2, Fig. 2).

n Acetyl glucosaminidase

L'activité apparaît vers 4 heures. Cette enzyme est localisée dans l'épithélium du bouclier gastrique et dans les tubules digestifs où elle est associée aux vacuoles digestives.

■ Phosphatases

Phosphatase acide

L'alimentation entraîne une augmentation générale des réactions en particulier dans les conduits de la glande digestive où la région apicale des cellules à bordure en brosse montre une forte activité (Planche 2, Fig. 3). La réaction s'intensifie de la même façon dans la bordure apicale du typhlossole majeur.

Dans les cellules digestives et l'épithélium du bouclier gastrique, la réaction s'étend à l'ensemble de la cellule, vers 6 heures elle est visible à la fois dans le cytoplasme et dans les vacuoles. A partir de 12 h lors de la phase importante d'expulsion des corps résiduels, on constate une activité phosphatase dans les résidus de digestion libérés dans les conduits.

Phosphatase alcaline

La distribution de la phosphatase alcaline est limitée aux bordures en brosse des épithéliums de l'estomac, du bouclier gastrique, des conduits de la glande digestive et de la gouttière intestinale. L'activité n'évolue pas au cours de la digestion

- Estérases

Les activités estérasiques augmentent rapidement dès l'apport de nourriture. Elles sont notées dans l'ensemble du tractus digestif. Les résidus de digestion montrent également une forte activité estérasique (Planche 2, Fig. 4).

DISCUSSION

Les résultats des expériences permettent de cerner les activités suivant une prise de nourriture dans le tube digestif de *Ruditapes philippinarum*.

Les processus de digestion n'intéressent qu'une faible partie du volume ingéré car une grande quantité d'algues traverse le tube digestif sans être altérées.

La glande digestive joue un rôle très important, notamment dans la digestion intracellulaire. Des variations morphologiques des tubules digestifs ont été observées chez de nombreuses espèces comme *Mytilus edulis* (Owen, 1972), *Pecten maximus* (Mathers, 1976), *Chlamys varia* (Mathers et al., 1979). Elles indiquent une rythmicité de la digestion liée à l'apport de nourriture. Chez *Ruditapes philippinarum* des variations de la glande digestive sont mises en évidence en étudiant la structure des cellules digestives. En effet, les tubules digestifs sont composés de cellules à des stades d'évolution différents. Une telle hétérogénéité a été observée par Palmer (1979) chez *Arctica islandica* où il décrit une organisation identique avec des cellules en voie de dégénérescence au centre du tubule. Les trois stades cellulaires sont visibles à tout moment, mais leurs proportions évoluent au cours de la digestion. L'augmentation des cellules au stade II jusqu'à 12 heures traduit une intensité accrue de la digestion intracellulaire.

La quantité de cellules au stade III reste toujours faible ; l'émission des macrovacuoles est progressive et ne concerne qu'un faible nombre de cellules évitant la destruction complète du tubule.

L'augmentation du nombre de cellules au stade III entre 18 h et 24 h, alors que des résidus de digestion continuent d'être évacués, suggère un autre mode d'expulsion des corps résiduels qui sont émis de façon continue.

L'étude histoenzymologique confirme l'importance de la digestion intracellulaire chez *Ruditapes philippinarum*. L'amylase présente dès le début de la digestion assure une première attaque des polysaccharides contenus dans les algues ingérées.

La digestion est ensuite réalisée de façon intracellulaire, la dégradation des glucides se poursuivant dans la glande digestive dans les cellules à bordure en brosse des conduits et dans les cellules digestives par l'action d'enzymes comme l' α D glucosidase.

La présence de la N acetyl glucosaminidase, de phosphatase acide et de l'aminopeptidase I identifiées comme des hydrolases lysosomales, Moore (1976), dans les vacuoles des cellules digestives est en accord avec l'importance du système lysosomal dans ces cellules.

Leur existence dans les granules des cellules du bouclier gastrique et intestinal indique un rôle de ces épithéliums dans la digestion.

La phosphatase alcaline localisée dans les bordures en brosse témoigne de processus d'absorption au niveau du bouclier gastrique, des conduits de la glande digestive ainsi que la gouttière intestinale.

CONCLUSION

La digestion comporte différentes phases chez *Ruditapes philippinarum* :

- Une phase extracellulaire. Pendant cette période, les algues ingérées subissent l'action d'enzymes comme l'amylase et des lipases dans la lumière de l'estomac, du sac du stylet et les conduits de la glande digestive.

- Une phase intracellulaire intervenant par les processus suivants :

. Absorption et phagocytose au niveau de la glande digestive, de la paroi stomacale et probablement de l'épithélium intestinal.

. Digestion intracellulaire par les hydrolases lysosomales associées au système vacuolaire.

Les activités de digestion intracellulaire et d'évacuation des résidus de la digestion sont concomitantes dans l'ensemble de la glande digestive. Elles mettent en évidence une continuité de la digestion chez les juvéniles de *Ruditapes philippinarum*, avec des phases d'activités plus intenses liées à l'apport de nourriture.

GLENNER & COHEN, 1960 - Histochemical demonstration of a species-specific trypsin like enzyme in mast cells.
Nature, 185 : 846-847.

LAGUNOFF D., 1967 - Histochemistry of proteolytic enzymes.
Meth. Achiev. exp. Path., 2 : 55-77.

MATHERS N., 1976 - The effects of tidal currents on the rhythm of feeding and digestion in *Pecten maximus*.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 24 : 271-283.

MATHERS N & al, 1979 - Monophasic and diphasic digestive cycles in *Venerupis decussata* and *Chlamys varia*.
J. Moll. Stud., 45 : 68-81.

MOORE M.N., 1976 - Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress.
Cell. Tiss. Res., 175 : 279-287.

MOORE M.N., KOEHN R.K. & BAYNE B.L., 1980 - Leucine Aminopeptidase (Aminopeptidase I), N-Acetyl- β hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis*, in response to salinity changes.
J. Exp. Zool., 214 : 239-249.

OWEN G., 1972 - Lysosomes, peroxisomes and bivalves.
Sci. Prog. Oxf., 60 : 299-318.

PALMER R., 1979 - A histological and histochemical study of digestion in the bivalve *Arotica islandica*.
Biol. Bull., 156 : 115-129.

RUTENBURG A.M., GOLDBERG T.A., RUTENBURG S.H., LANG R.T., 1959 - The histochemical demonstration of α -D glucosidase in mammalian tissues.
J. Histochem. Cytochem., 8 : 268-272.