

Altérations de la glande digestive et conséquences nutritionnelles chez la palourde *Ruditapes philippinarum* contaminée par une bactérie du genre *Vibrio*

Stéphanie Plana et Marcel Le Pennec

Laboratoire de Biologie marine, Faculté des Sciences, 29287 Brest Cedex, France.

Reçu le 9 avril 1991, accepté le 1^{er} octobre 1991.

Alterations in the digestive diverticula and nutritional consequences in the clam *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio*.

Plana S., M. Le Pennec. *Aquat. Living Resour.*, 1991, 4, 255-264.

Abstract

Since 1987, the "brown ring" disease caused by a *Vibrio* pathogenic bacterium, called P1, has been affecting the cultivated Japanese clam, *Ruditapes philippinarum*, of French Atlantic coasts. Laboratory experiments of contaminated animals show that 92% of the starved clams and only 60% of the fed clams are diseased. The mortality attributable to the *Vibrio* is decreased by 40% in the fed animals. The nutrition should be a protection against the bacterial action. A comparative study of digestive diverticula in healthy and infested animals brings more information on the digestive stages of the tubules. Study of the ratios of the tubular lumen area to the whole section of the digestive tubules permits determination of a standard graduation of the digestive stages. The proportions of the tubular stages vary according to the animal's condition. In an infested animal, the ratio of the degenerative stages trebles while the absorptive stage disappears. The starved or infected animals show similar digestive stages while in the controls, the proportions of the absorptive stage increase and stages 3 and 4 decrease in the presence of food. The digestive cycle is altered and the digestive diverticula passes into a state of degeneration. The establishment of this technique could allow automatic visualization of the state of the digestive diverticula in natural or reared clams.

Keywords : *Ruditapes philippinarum*, pathogenic *Vibrio*, digestive tubules.

Résumé

Depuis 1987, la maladie de l'« anneau brun » provoquée par une bactérie pathogène du genre *Vibrio*, dite P1, atteint les élevages de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* des côtes atlantiques françaises. Les expériences réalisées en laboratoire montrent que chez des palourdes contaminées expérimentalement avec P1, 92 % des individus laissés à jeun sont atteints tandis que seuls 60 % des individus nourris développent la maladie. La mortalité imputable à la bactérie est diminuée de 40 % chez des individus nourris. La nutrition semble constituer un moyen de lutte contre l'action de la bactérie. Une étude comparative de la glande digestive d'animaux sains et contaminés apporte des éléments sur les stades digestifs des tubules. L'étude des rapports de la lumière tubulaire sur la section entière des tubules permet de déterminer une échelle standard des stades digestifs. Les proportions des stades varient suivant l'état de l'animal. Chez un individu atteint, le taux des tubules au stade de dégénérescence triple au détriment des stades d'absorption qui n'apparaissent plus. Les palourdes infectées ne montrent aucune différence significative qu'elles soient nourries ou à jeun contrairement aux individus témoins où le stade d'absorption voit sa proportion augmentée et les stades 3 et 4 diminués en présence de nourriture. Le cycle de digestion est perturbé et la glande digestive entre dans un état général de dégénérescence. La mise au point de cette technique devrait permettre de visualiser automatiquement l'état de la glande digestive d'individus du milieu naturel ou d'élevage.

Mots-clés : *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio* pathogène, tubules digestifs.

INTRODUCTION

En 1987, une mortalité estivale anormale due à une bactérie pathogène du genre *Vibrio* est apparue dans les élevages des côtes atlantiques françaises de *Ruditapes philippinarum* (Paillard et Maes, 1990). Cette mortalité peut atteindre des pourcentages élevés, jusqu'à 100 % en certains endroits du littoral, comme dans la région des abers bretons où la vénériculture est devenue depuis quasi inexistante. Les palourdes infectées par le *Vibrio* présentent un dépôt organique brun caractéristique sur la face interne des valves (Paillard et al., 1989) d'où le nom de maladie de l'« anneau brun » qui lui est donné. La mortalité ayant lieu à une période nutritionnelle optimale pour l'animal (milieu de printemps, été), il nous semblait intéressant d'étudier les perturbations relatives à ce *Vibrio* sur la glande digestive et notamment les éventuelles modifications de la digestion et de l'ingestion intracellulaires. Les recherches ont été menées en comparant des glandes digestives de palourdes saines et de palourdes rendues malades expérimentalement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions d'élevage

Des juvéniles sains de *Ruditapes philippinarum*, de 15 mm de long, sont répartis en huit lots de 200 individus (tabl. 1). La maladie de l'« anneau brun » est transmise expérimentalement par injection d'une suspension de 10^7 cellules de *Vibrio* P1 par individu (concentration observée chez les individus atteints sur parcs d'élevage) selon la technique décrite par Paillard et Maes (1990). L'« eau renouvelée » passe dans un filtre biologique tandis que l'eau stagnante n'est changée que tous les trois jours dans les bacs d'élevage. Les paramètres de l'eau sont contrôlés dans chaque bac (salinité 37 ‰, température 15-16°C, nitrites < 0,1 mg/l) et maintenus aux mêmes valeurs. Les individus nourris reçoivent une ration de $40 \cdot 10^6$ cell./l de *Dunaliella primolecta* tous les deux jours. Une vingtaine d'individus sont prélevés sur l'ensemble des lots pour étudier l'évolution de la maladie pendant le premier mois d'élevage. Après un mois, une trentaine d'individus sont prélevés pour l'étude histologique au même moment dans tous les bacs 12 h après la prise de nourriture. Deux mois après la contamination, tous les animaux encore vivants sont ouverts afin de comptabiliser les cas de lésions. La mortalité est aussi étudiée pendant ce laps de temps.

Étude de la glande digestive

Étude histologique et analyse de la glande digestive

Les individus prélevés dans chaque lot sont fixés dans du liquide de Bouin, sans leur coquille. Les échantillons sont déshydratés dans une série d'alcools de degré croissant, puis du xylène et inclus en paraffine (Paraplast). Les blocs obtenus sont coupés à 5 µm d'épaisseur et colorés au trichrome de Masson (Gabe, 1968). L'étude des coupes est réalisée à l'aide d'un microscope photonique (Olympus) couplé à une caméra (Cohu) et à un analyseur d'images (Compaq 386; carte d'acquisition d'image Matrox; logiciel Visilog).

Les tubules digestifs sont classés arbitrairement en quatre stades selon la définition donnée par Platt (1971) et Langton (1975). Pour chaque stade spécifique, les surfaces de la lumière et de la section entière des tubules sont mesurées permettant de calculer le rapport surface de lumière/surface de tubule pour une centaine de tubules pris sur plusieurs sections de la glande digestive. Après une transformation arc-sinus des données, la normalité des distributions et l'homogénéité des variances sont testées puis une analyse de variance selon Fisher-Snedecor permet une comparaison des moyennes des rapports de surfaces pour chaque stade. Les proportions de chaque stade sont comptabilisées dans chaque groupe, puis testées (chi-deux) pour obtenir leurs taux moyens par groupe. Ainsi, les proportions des différents stades et leurs rapports de surface sont établis en fonction de l'état de l'animal pour l'ensemble de la glande digestive étudiée. Des tests statistiques supplémentaires entre lots permettent de montrer l'influence de la maladie et des conditions nutritionnelles sur la glande digestive en comparant les moyennes testées entre elles.

Coupes semi-fines

Des fragments de glandes digestives sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % en tampon cacodylate (pH 7,4; 0,1 M) dont l'osmolarité est maintenue à 1 100 mOsm. Après post-fixation au tétroxyde d'osmium à 1 % et déshydratation, les morceaux de tissus sont inclus dans la résine de Spurr (1969). Les coupes semi-fines obtenues à l'ultramicrotome (Reichert, OMU 3) sont colorées au bleu de toluidine.

RÉSULTATS

Stades évolutifs de la maladie de l'« anneau brun »

Après injection du *Vibrio* P1 chez les juvéniles sains (fig. 1 a), un suivi d'une vingtaine d'individus vivants nous permet d'observer les symptômes de la maladie : quelques « points » bruns apparaissent à l'intérieur des valves à partir du 7^e jour, ils se densifient pour former des « traces » (au 15^e jour) qui se développent à leur tour en un « anneau » montrant des couches

Tableau 1. — Conditions d'élevage des juvéniles pendant deux mois. L'eau stagnante est changée tous les trois jours, l'eau renouvelée passe sur un filtre biologique. Salinité, température et nitrites sont contrôlés quotidiennement dans chaque bac.

Rearing conditions of juveniles during two months of experiment. Stagnant water is changed every three days; the renewed water is passed through a biological filter. Salinity, temperature and nitrites are checked daily in each tank.

			Nombre d'individus	
			Témoins	Contaminés
Conditions d'élevage	A jeun	Eau stagnante (J)	200	200
		Eau renouvelée (R)	200	200
	Nourris	Eau stagnante (N)	200	200
		Eau renouvelée (NR)	200	200

brunâtres successives à partir du 21^e jour (fig. 1 b). Cependant, on constate que certains individus ne présentent aucune lésion caractéristique de la maladie de l'anneau brun.

Les stades d'évolution de la maladie ainsi que la mortalité observée au cours des deux mois d'élevage sont résumés dans le tableau 2.

A la fin de l'expérience, les individus contaminés expérimentalement sont classés en trois catégories : des individus indemnes, d'autres montrant des lésions,

mais encore en vie et des individus gravement atteints morts pendant l'élevage.

La mortalité est maximale (20,5 %) pour les individus maintenus à jeun et en eau stagnante (J) et faible lorsque les conditions d'élevage s'améliorent (renouvellement de l'eau (R) = 11,5 %, nutrition (N) = 6 %, nutrition cumulée à un renouvellement d'eau (NR) = 3 %). Dès le 30^e jour, apparaissent les premières mortalités d'individus dont les coquilles possèdent un

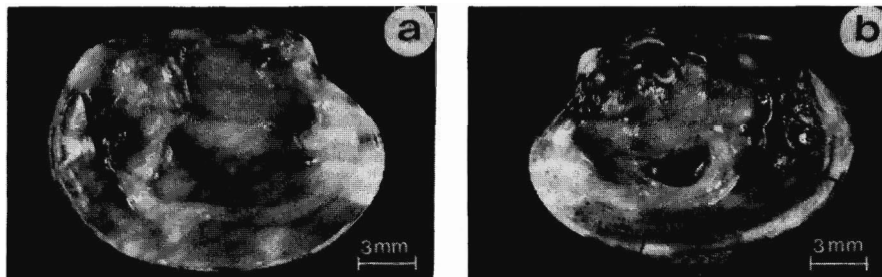


Figure 1. — *Ruditapes philippinarum*. (a) Animal sain observé dans sa valve gauche. (b) Animal malade vu dans sa valve droite. On observe les couches brunâtres de l'anneau brun (→).

(a) Healthy animal on its left valve. (b) Diseased animal on its right valve. Note the brownish layer of the brown ring (→)

Tableau 2. — Mortalité, lésions et stades de maladie dans les lots d'individus infestés.

Mortality, symptoms and phases of the disease in infested clams.

Conditions d'élevage		Mortalité			Évolution de la maladie				Effectif total
		Nombre d'individus	%	Morts ayant des lésions	Individus indemnes	Individus avec points	Individus avec traces	Individus avec anneaux	
A jeun	Eau stagnante (J)	41	20.5	41	5	5	41	108	200
	Eau renouvelée (R)	23	11.5	19	31	22	32	92	200
Nourris	Eau stagnante (N)	12	6	8	41	27	44	76	200
	Eau renouvelée (NR)	6	3	4	71	37	35	51	200

« anneau » (lot J=41 individus). Les résultats montrent que dans des conditions optimales d'élevage, ce phénomène devient rare (lot NR=4 ind.).

Parmi les individus placés dans les conditions les plus défavorables (J), seuls 2,5 % restent indemnes (aucune lésion), tandis que 36 % des palourdes nourries en eau renouvelée sont indemnes. 20 % des individus laissés à jeun en eau renouvelée ou nourris mais en eau stagnante restent sains.

Pour les individus présentant des lésions, on retrouve la même différence entre les individus maintenus dans les meilleures conditions (NR) où seuls 25 % développent un « anneau brun » et les plus défavorisés (J) où parmi les 93 % de palourdes malades, 60 % montrent un anneau. Les individus nourris en eau stagnante ou à jeun en eau renouvelée sont 40 à 48 % à développer un « anneau brun ».

Étude de la glande digestive

Anatomie

La glande digestive de *Ruditapes philippinarum* qui couvre la surface ventrale externe de l'estomac est constituée de conduits principaux débouchant dans l'estomac, puis qui se divisent en conduits secondaires au sein de la glande. Ces derniers se terminent par des tubules ou diverticules digestifs aveugles. L'épithélium tubulaire (fig. 2a) comprend le plus souvent de hautes cellules digestives claires très vacuolisées et des cellules sécrétrices sombres pyramidales situées dans des cryptes denses aux extrémités des tubules (fig. 2c). Des modifications morphologiques entre les tubules digestifs sont visibles chez *R. philippinarum*, elles correspondent à un asynchronisme des phases d'absorption de nourriture ou de digestion intracellulaire. Une classification de ces tubules en quatre stades peut être effectuée. Au stade 1, en période de routine (repos), les cellules épithéliales sont régulières et la lumière centrale vide est visible (fig. 2a, b). Au stade 2, en phase d'absorption, la lumière est inexistante et de nombreuses vacuoles claires sont observées en position apicale dans les cellules digestives. Les cellules sécrétrices sont plus volumineuses (fig. 2c). Le stade 3 est représentatif d'une phase de fragmentation caractérisée par une limite irrégulière des cellules épithéliales avec des cellules lysées expulsées dans la lumière tubulaire (fig. 2d, e). Le stade 4 correspond à une période de reformation, les cellules épithéliales très basses entourent une lumière maximale contenant des sphérules de fragmentation (fig. 2f).

Obtention d'une mesure standard des stades digestifs

Pour chaque groupe, la normalité des distributions des rapports de surfaces lumière/tubule par stade est testée. L'homogénéité des variances des données transformées arc-sinus est calculée à l'aide des tests de Bartlett et de Cochran. Les moyennes sur une centaine de tubules, réunies dans le tableau 3, sont traitées par une analyse de variance à un critère de

classification. Les stades sont significativement différents entre eux au sein de chaque groupe au seuil de 5 %. Par contre pour un stade donné, tous les ratios moyens sont homogènes entre eux quel que soit l'état nutritionnel et de santé de l'individu, les différences observées ne peuvent être attribuées qu'à une erreur d'échantillonnage au seuil de 5 %. Ainsi, on peut obtenir pour chaque stade une mesure standard représentant l'aire de la lumière par rapport à la surface totale du tubule (fig. 3). Le rapport du stade 1 est de 15 % (test F : 2,633; dl : 7;820), celui du stade 2 est de 3 % (test F : 0,921; dl : 7;357); il réaugmente à 25 % pour le stade 3 (test F : 0,649; dl : 7;264) et 31 % pour le stade 4 (test F : 0,0722; dl : 7;245) où la lumière est maximale.

Comptabilisation des stades des tubules digestifs

Le tableau 4 et les histogrammes (fig. 4) résument les taux moyens des divers stades par lot. Après traitement statistique (chi-deux) des proportions, les distributions sont normales et une comparaison par groupe est possible. L'effet de la nutrition est évalué en comparant les proportions moyennes des différents stades tubulaires entre individus nourris et à jeun au sein de chaque groupe.

Chez les témoins, on observe une forte hétérogénéité entre palourdes nourries (fig. 4e) et à jeun (fig. 4a) (χ^2 : 28,053, dl : 3). Les taux des tubules au stade 1 restent constants (60 %). Par contre, à la suite du jeûne, les tubules en phase d'absorption (2) diminuent de 35 à 23 % tandis que l'ensemble des stades 3 et 4 doublent passant de 7 à 15 %.

Chez les palourdes contaminées expérimentalement, aucune différence significative n'est observée entre individus à jeun et nourris si on les compare au même stade de maladie (Indemnes : fig. 4b, f; Traces : c, g; Anneaux : d et h). Les différences sont dues à une erreur d'échantillonnage ($\chi^2 < 8$, dl : 3). Chez des individus indemnes, les tubules au stade 1 représentent 58 % des tubules tandis que le stade 2 a une proportion de 15 %. L'ensemble des stades 3 et 4 atteint 27 % des tubules. Pour des palourdes présentant des lésions visibles de la maladie, les stades 1 représentent 40 % des tubules, les stades 2 15 % tandis que l'ensemble des stades 3 et 4 s'élèvent à 45 %.

L'injection du *Vibrio* P1 à des palourdes qu'elles soient nourries ou maintenues à jeun entraîne des modifications semblables au niveau de la glande digestive. Les tests de comparaison entre groupes différents montrent une forte hétérogénéité ($\chi^2 > 9$, dl : 3) sauf dans le cas des individus indemnes qui se rapprochent de tous les groupes.

Pour des individus à jeun, les tubules de stade 1 diminuent de 60 % chez des témoins (fig. 4a) à 47 % chez des palourdes présentant des traces (fig. 4c) ou 36 % pour des individus avec un anneau (fig. 4d). Les stades 2 passent d'un taux de 23 à 19-17 % tandis que les stades de dégénérescence atteignent 33 à 46 %.

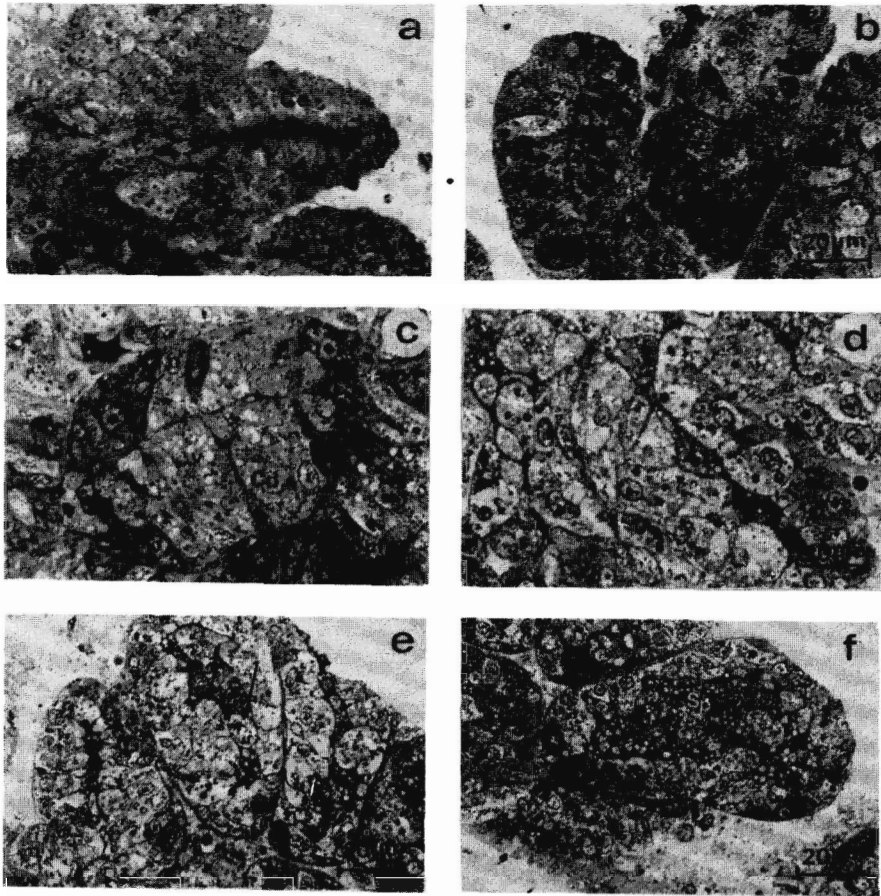


Figure 2. — Tubules digestifs en coupes semi-fines. (a) Tubule digestif au stade 1. Lu : lumière vide, Ce : cellules épithéliales, C : conduits secondaires. (b) Tubules digestifs passant du stade 1 au stade 2; la lumière (Lu) est très étroite mais toujours vide. (c) Tubule digestif au stade 2; les cellules digestives (Cd) sont très hautes et comprennent de nombreuses vacuoles (v); les cellules sécrétrices (Cs) augmentent de volume; la lumière est absente, n : noyau. (d) Tubule digestif passant du stade 2 au stade 3; la lumière (Lu) augmente et se remplit, sa limite est irrégulière. (e) Tubule digestif au stade 3; des cellules lysées se détachent de l'épithélium (→) et sont expulsées dans la lumière. (f) Tubule digestif au stade 4; les cellules épithéliales sont très basses, la lumière comprend des sphérules de fragmentation (Sp).

Semi thin-section of the digestive tubules. (a) Digestive tubule of stage 1; Lu: empty lumen, Ce: epithelial cells, C: secondary ducts. (b) Digestive tubule between stages 1 and 2; the lumen (Lu) is very narrow but still empty. (c) Digestive tubule of stage 2; the digestive cells (Cd) are very high and contain numerous vacuoles (v). The secretory cells (Cs) increased in volume; the lumen is absent, n: nucleus. (d) Digestive tubule between stages 2 and 3; the lumen (Lu) increases and is filled up, its boundary is irregular. (e) Digestive tubule of stage 3; the lysed cells are separated from the epithelium (→) and propelled into the lumen. (f) Digestive tubules of stage 4; the epithelial cells are very low, the lumen contains degenerative spheres (Sp).

Les tubules de stade 1 de palourdes nourries ont une chute de 20 % de leur proportion entre témoins (fig. 4e) et individus ayant des symptômes visibles de la maladie (fig. 4g et h). Parallèlement, les tubules de stade 2 passent de 35 à 14 % tandis que l'ensemble des stades 3 et 4 augmente pour atteindre 47 % chez des individus au stade final de la maladie.

DISCUSSION

L'influence de la nutrition et du renouvellement d'eau sur l'évolution de la maladie de l'« anneau

brun » est quantifiée en calculant les mortalités et les stades évolutifs de la maladie. Ces effets sont mesurés sur la glande digestive.

L'action conjointe de la nutrition et du renouvellement de l'eau permet à 36 % des palourdes contaminées expérimentalement de rester indemnes de toute trace de maladie et seulement 3 % meurent. Ces résultats montrent que la nutrition constitue un moyen de lutte contre la maladie tandis qu'un simple filtrage de l'eau améliore légèrement les conditions d'élevage. Cela se ressent par une baisse notable de la mortalité

Tableau 3. — Étude des rapports de la surface de la lumière sur la section entière du tubule pour les 4 stades dans les différents lots. Obtention des rapports pour un animal standard. (Moyenne et écart-type sont donnés par lot et par stade digestif.)

Study of the ratios of the lumen area to the whole section of tubule for the 4 stages in different groups. Ratios of a standard animal. (Mean and standard deviation are given for each group and digestive stage.)

Stades digestifs des tubules		Lots d'individus								Obtention d'un animal standard
		Individus à jeun				Individus nourris				
		Témoins	contaminés			Témoins	contaminés			
			Sans lésion	Avec traces	Avec anneaux		Sans lésion	Avec traces	Avec anneaux	
Stade 1	Moyenne	0.130	0.112	0.116	0.165	0.156	0.139	0.151	0.144	0.148
	Écart-type	0.004	0.006	0.004	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.002
Stade 2	Moyenne	0.036	0.034	0.032	0.040	0.030	0.033	0.035	0.030	0.033
	Écart-type	0.003	0.003	0.002	0.013	0.002	0.004	0.004	0.003	0.002
Stade 3	Moyenne	0.252	0.240	0.249	0.250	0.241	0.253	0.242	0.254	0.250
	Écart-type	0.006	0.006	0.004	0.006	0.009	0.004	0.007	0.006	0.002
Stade 4	Moyenne	0.307	0.298	0.319	0.333	0.296	0.319	0.285	0.311	0.317
	Écart-type	0.009	0.011	0.007	0.009	0.009	0.008	0.007	0.005	0.003

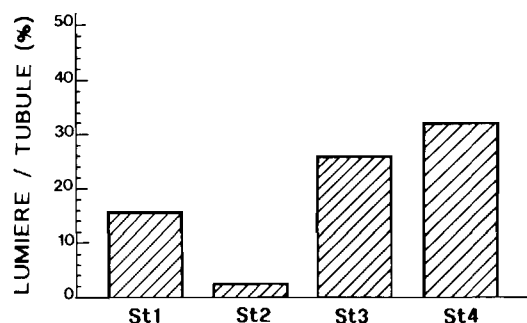


Figure 3. — Rapports (%) de la surface de la lumière sur la section entière de tubules aux 4 stades (St) de digestion pour un animal standard.

Ratios (%) of the lumen area to the whole section of tubules at the 4 digestive stages (St) of a standard animal.

chez les individus nourris (6 %) par rapport aux individus en eau renouvelée (11,5 %). En conditions expérimentales, les rations élevées de nourriture permettent à l'animal d'accumuler des réserves suffisantes pour lutter contre la contamination. Il ne s'affaiblit pas et n'utilise pas ses réserves pour son métabolisme comme dans le milieu naturel. Les mortalités estivales qui atteignent 5 à 100 % des individus sur les sites touchés en 1987 (Paillard *et al.*, 1989) pourraient être expliquées par le fait que les individus sur parcs, affaiblis par plusieurs mois d'insuffisance nutritionnelle pendant l'hiver, sont vulnérables aux attaques environnementales de différentes natures (pollutions d'origines diverses, microorganismes pathogènes...). Des mortalités ont été observées dans les élevages de larves de mollusques attaquées par des vibrioses; pour Nottage *et al.* (1989), deux toxines principales se développent dans les cas de nécroses bactériennes larvaires : une protéinase qui dégrade les tissus conjonctifs et une

toxine ciliostatique entraînant l'arrêt des activités de nage et de nutrition dès le début de la nécrose. Ces organismes pathogènes pourraient s'attaquer aux fonctions de nutrition des individus ce qui entraînerait une baisse de leur métabolisme puis leur mort.

La digestion chez les Bivalves est souvent divisée en deux processus : digestion extracellulaire dans l'estomac et digestion intracellulaire dans la glande digestive. L'anatomie de la glande digestive de *R. philippinarum* est semblable à celle des autres Bivalves (Owen, 1955, 1974; Morton B. S., 1976; Sumikawa et Ishimatsu, 1984). La glande digestive joue un rôle d'absorption, d'assimilation et de stockage des métabolites (Yonge, 1926; Purchon, 1971; Morton B. S., 1983). Les modifications morphologiques des tubules digestifs reflètent les phases de digestion intracellulaire (McQuiston, 1969; Mathers, 1976; Mathers *et al.*, 1979; Morton B. S., 1970a; Langton, 1972; Morton B. S., 1983; Henry, 1987). Ces différences permettent de les classer en quatre stades arbitraires que l'on retrouve chez de nombreux Bivalves : *Lasaea rubra* (Morton J. E., 1956), *Cardium edule* (Morton B. S., 1970a; Owen, 1970), *Macoma baltica* (Morton B. S., 1970b), *Ostrea edulis* (Langton et Gabbott, 1974; Wilson et La Touche, 1978), *Mytilus edulis* (Langton, 1975, 1977), *Mercenaria mercenaria* (Robinson et Langton, 1980), *Ruditapes philippinarum* (Hily-Donval, 1984).

Les résultats en analyse d'image des rapports de surface pour chaque catégorie tubulaire montrent que l'état nutritionnel ou de santé de l'individu modifie les proportions des stades tubulaires tandis que les surfaces respectives de l'épithélium et de la lumière, pour un stade donné, ne varient pas entre témoins et contaminés. Les mesures obtenues constituent une échelle standard que l'on pourrait utiliser pour quantifier automatiquement les stades digestifs de glandes digestives et déterminer l'éventuelle dégénérescence des individus étudiés. Cette technique est complémentaire des méthodes antérieurement utilisées telles que

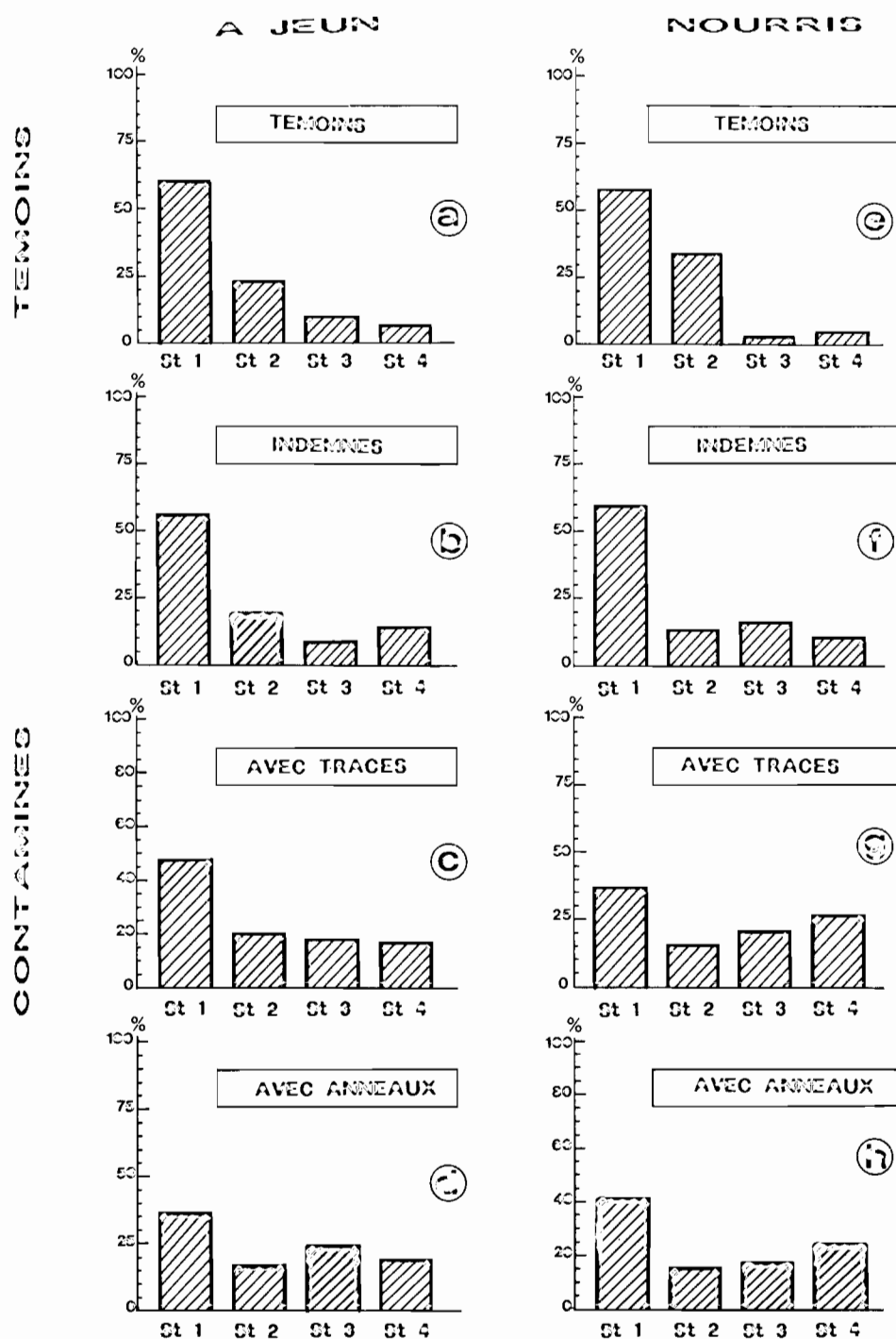


Figure 4. — Histogrammes des fréquences des stades digestifs (St) des tubules dans chaque lot.

Proportions of digestive tubule stages (St) in each tank.

le calcul et l'étude comparative des hauteurs de l'épithélium tubulaire par rapport à celles du tubule entier trouvées dans divers travaux (Robinson *et al.*, 1981;

Robinson, 1983; Carles, 1984; Hily-Donval, 1984; Henry, 1987; Vegà *et al.*, 1989; Marigomez *et al.*, 1990).

Tableau 4. — Étude des proportions des stades digestifs des tubules dans les différents lots.*Study of the proportions of the digestive tubule stages in different groups.*

Stades digestifs des tubules	Lots d'individus							
	Témoins		Contaminés expérimentalement					
	à jeun	nourris	Sans lésion : indemnes		Avec lésions : traces		Avec lésions : anneaux	
			à jeun	nourris	à jeun	nourris	à jeun	nourris
Stade 1	60.39	57.2	56.7	59.5	47.1	37.1	36	39.5
Stade 2	23.14	35	17.4	13.4	19.4	15.5	17.3	13
Stade 3	9.8	2.4	10.5	16.2	17.3	20.6	26.1	20.8
Stade 4	6.7	5.2	15.4	10.8	16.2	26.8	20.5	26.6

Le calcul des proportions des différents stades chez des individus nourris et à jeun apporte des informations sur l'influence de la maladie sur les phases d'absorption et de digestion intracellulaires.

Chez un individu témoin, un cycle se constitue où des tubules au repos (stade 1) passent au stade 2, dit d'absorption, lorsque la nourriture est apportée dans le tubule. Le stade 2 évolue en stade 3 lorsque la nourriture a été digérée et que l'excrétion débute. Puis, le stade 3 passe au stade 4 quand le tubule est en voie de dégénérescence, les débris cellulaires étant visibles dans la lumière. Ensuite, le tubule se reforme et le cycle peut alors recommencer. La nutrition provoque une augmentation du stade dit d'absorption (2) et une chute des stades de dégénérescence (3 et 4). Cela correspond aux résultats de divers auteurs, notamment Thompson *et al.* (1974) pour *Mytilus edulis*, Hily-Donval (1984) pour *Ruditapes philippinarum*, Henry (1987) pour *Ruditapes decussatus*, qui n'observent les stades 3 et 4 qu'occasionnellement tandis que les stades 1 et 2 représentent plus de 90 % des tubules. Le jeûne provoque une augmentation des stades 3 et 4 qui atteignent 16 % des tubules. Henry (1987) observe le même phénomène chez *R. decussatus* où ils représentent 40 % de l'ensemble des tubules.

Chez les individus infectés expérimentalement, aucune différence significative n'est observée entre nourris et à jeun comme chez les témoins. Dès que les symptômes apparaissent, les tubules de stade 1 diminuent en nombre ainsi que ceux au stade 2. Au stade final de la maladie, la proportion des tubules de stades 3 et 4 est de 47 %. Lowe *et al.* (1981) obtiennent les mêmes résultats chez des moules maintenues dans une eau contaminée avec de l'huile. Ils constatent une augmentation notable des tubules de stade 4. Trip *et al.* (1984) observent une diminution de l'épithélium tubulaire chez *Mercenaria mercenaria* en contact avec des polluants organiques. L'accumulation d'hydrocarbures dans la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* (Carles, 1984) et de cadmium chez *Ruditapes decussatus* (Henry, 1987) provoque également une augmentation des stades de dégénérescence.

Le cycle normal de digestion est perturbé. L'augmentation des stades 3 et 4 montre que les tubules ne peuvent plus se reconstituer et que la glande digestive entre en état de dégénérescence. La nourriture ne provoque plus la formation des stades d'absorption (2). Vegà *et al.* (1989), à l'issu de leurs travaux sur des contaminations au cadmium, estiment que les variations morphologiques des tubules constituent un indicateur du degré de stress subi par l'individu. Couch (1984) observe une forte concordance entre la dégénération de l'épithélium digestif de *Crasostrea virginica* et la présence d'irritants environnementaux. Pour Marigomez *et al.* (1990), ces tubules ayant l'apparence du stade 4 sont en fait des tubules atrophiés, ce qui conduit la glande digestive à une dégénérescence définitive.

Il est intéressant de noter que les individus contaminés indemnes de toute lésion ne diffèrent pas des groupes témoins ou marqués par la maladie qu'ils soient nourris ou à jeun. Il se pourrait qu'ils se situent dans un groupe intermédiaire entre témoins et malades dans lequel des palourdes porteuses saines seraient mêlées à des palourdes malades. Des études complémentaires nous permettraient de préciser ce résultat.

Il semble que si la nutrition permet aux animaux de résister à la maladie, comme nous l'avons montré précédemment, chez des individus nourris régulièrement et maintenus dans de bonnes conditions d'élevage, elle n'aura par contre aucun effet si l'individu est fortement contaminé. Sa glande digestive atrophiée, siège de stockage pour les autres organes et de sécrétion enzymatique pour la digestion extracellulaire, ne peut plus jouer son rôle. Cette altération pourrait être un des facteurs de mortalité des individus contaminés.

Cette étude, chez des individus chez lesquels la maladie de l'« anneau brun » a été transmise expérimentalement, apporte des informations sur l'évolution de la maladie. Des palourdes maintenues dans des conditions optimales sont moins atteintes que des individus « stressés », le facteur nutrition constitue un moyen de lutte contre l'agression des *Vibrios* pathogènes.

L'analyse des stades des tubules digestifs chez des individus sains et contaminés montre que la maladie de l'anneau brun entraîne une situation de stress semblable à celle induite par le jeûne ou une contamination par des métaux. La glande digestive des palourdes malades entre en dégénérescence.

Une étude biochimique permettrait de comprendre dans quelle mesure la prise de nourriture et la digestion sont altérées chez des individus contaminés par

cette bactérie et de savoir si des réserves sont toujours constituées. Des travaux en cours semblent montrer que le *Vibrio* P1 est résistant au lysosyme. Cette propriété de la bactérie empêcherait l'activité glycosidase de la glande digestive d'attaquer l'enveloppe du *Vibrio* (Jamieson et Wardlaw, 1989). L'étude ultrastructurale de différents tissus pourrait permettre de localiser les bactéries et d'éventuelles nécroses.

Remerciements

Nous remercions Alain Paimbeni (UBO, Brest) pour l'aide histologique et Alain Le Mercier (UBO, Brest) pour les photographies et le traitement d'images. Nous remercions tout spécialement Anne Donval pour sa précieuse collaboration dans l'analyse de la glande digestive, Monique Henry (CERAM, Marseille) et Jean-Claude Cochard (IFREMER, Brest) pour la lecture critique du manuscrit. La Région Bretagne (programme n° 680, opération n° 6210) a fourni l'aide financière nécessaire à la réalisation des études ainsi qu'une allocation de recherche (contrat n° 89-09-901).

RÉFÉRENCES

- Carles D., 1984. Bioaccumulation des hydrocarbures par *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Étude qualitative et quantitative : relation avec les modifications cytologiques au niveau de la glande digestive. Thèse Dr. 3^e cycle. Univ. Aix-Marseille II, 95 p.
- Couch J., 1984. Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, **14**, 525-526.
- Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Ed. Masson et Cie, 1113 p.
- Henry M., 1987. La glande digestive de la palourde méditerranéenne *Ruditapes decussatus* L. : recherches ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologiques et écotoxicologiques. Thèse Dr. Es-Sciences, Océanologie, Fasc. II, Univ. Aix-Marseille III, 439 p.
- Hily-Donval A., 1984. Étude ultrastructurale et histo-enzymologique de l'appareil digestif chez le juvénile de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Thèse Dr. 3^e cycle. Univ. Brest., I, 115 p.
- Jamieson T., A. C. Wardlaw, 1989. Degradation of bacterial lipopolysaccharides by digestive-gland extracts of marine bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 837-843.
- Langton R. W., 1972. Some aspects of the digestive rhythm in the Oyster *Ostrea edulis* L. M. Sc. Thesis, Univ. Coll. of North Wales, Bangor.
- Langton R. W., 1975. Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, **55**, 221-229.
- Langton R. W., 1977. Digestive rhythms in the Mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **41**, 53-58.
- Langton R. W., P. A. Gabbott, 1974. The tidal rhythm of extracellular digestion and the response to feeding in *Ostrea edulis* L. *Mar. Biol.*, **24**, 181-195.
- Lowe D. M., M. N. Moore, K. R. Clarke, 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.*, **1**, 213-226.
- Marigomez J. A., V. Saez, M. P. Cajaraville, E. Angulo, 1990. A planimetric study of the mean epithelial thickness (MET) of the molluscan digestive gland over the tidal cycle and under environmental stress conditions. *Helgol. Meeresunters.*, **44**, 81-94.
- Mathers N. F., 1976. The effects of tidal currents on the rhythm of feeding and digestion in *Pecten maximus* L., *J. Exp. Biol. Ecol.*, **24**, 271-283.
- Mathers N. F., T. Smith, N. Collins, 1979. Monophasic and diphasic digestive cycles in *Venerupis decussata* and *Chlamys varia*. *J. Moll. Stud.*, **45**, 68-81.
- McQuiston R. W., 1969. Cyclic activity in the digestive diverticula of *Lasea rubra* (Montagu) (Bivalvia: Eulamellibranchia). *Proc. Malac. Soc. Lond.*, **38**, 483-492.
- Morton B. S., 1970a. The tidal rhythm and rhythm of feeding and digestion in *Cardium edule*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **50**, 499-512.
- Morton B. S., 1970b. A note on the cytological structure and function of the digestive diverticula of *Macoma balthica* correlated with the rhythm of the tide. *Malacol. Rev.*, **3**, 115-119.
- Morton B. S., 1976. The biology, ecology and functional aspects of the organs of feeding and digestion of the South East Asian mangrove bivalve, *Enigmonia aenigmatica* (Mollusca: Anomiaea). *J. Zool. Lond.*, **179**, 437-466.
- Morton B. S., 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. The Mollusca, ed.: Saleuddin A. S. M., and K. M. Wilbur, Vol. 5, Physiology, Part. II, Academy Press, New York, 65-147.
- Morton J. E., 1956. The tidal rhythm and action of the digestive system of the lamellibranch *Lasaea rubra*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **35**, 563-586.
- Nottage A. S., P. D. Sinclair, T. H. Birkbeck, 1989. Role of low-molecular-weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve mollusks. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 180-186.
- Owen G., 1955. Observations on the stomach and digestive diverticula of the Lamellibranchia. I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia. *Q. J. Microsc. Sci.*, **96**, 517-537.

- Owen G., 1970. The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. *Phyl. Trans. R. Soc. London*, B, **253**, 245-260.
- Owen G., 1974. Feeding and digestion in the Bivalvia. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, **5**, 1-35.
- Pal S. G., 1971. The fine structure of the digestive tubules of *Mya arenaria* L. I. Basophil cell. *Proc. Malac. Soc. London*, **39**, 303-309.
- Paillard C., Percelay L., Le Pennec M., Picard D., 1989. Origine pathogène de l'« anneau brun » chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **309**, Série III, 235-241.
- Paillard C., Maes Ph., 1990. Étiologie de la maladie de l'« anneau brun » chez *Tapes philippinarum* : Pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **310**, Série III, 15-20.
- Platt A. M., 1971. Studies on the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L., Ph. D. Thesis, Queen's University, Belfast.
- Purchon R. D., 1971. Digestion in filter feeding Bivalves—a new concept. *Proc. Malacol. Soc. London*, **35**, 251-271.
- Robinson W. E., 1983. Assessment of Bivalve intracellular digestion based on direct measurements. *J. Moll. Stud.*, **49**, 1-8.
- Robinson W. E., R. W. Langton, 1980. Digestion in a subtidal population of *Mercenaria mercenaria* (Bivalvia). *Mar. Biol.*, **53**, 173-179.
- Robinson W. E., M. R. Pennington, R. W. Langton, 1981. Variability of tubule types within the digestive glands of *Mercenaria mercenaria* L., *Ostrea edulis* L. and *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **54**, 265-276.
- Spurr A. R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**, 31.
- Sumikawa S., S. Ishimatsu, 1984. Phasic activity in the digestive diverticula of the lamellibranch *Cyclina sinensis*. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.*, **50**, 1999-2004.
- Thompson R. J., N. A. Ratcliffe, B. L. Bayne, 1974. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **54**, 699-712.
- Tripp M. R., C. R. Fries, M. A. Craven, C. E. Gier, 1984. Histopathology of *Mercenaria mercenaria* as an indicator of pollutant stress. *Mar. environ. Res.*, **14**, 521-524.
- Vegà M. M., J. A. Marigomez, E. Angulo, 1989. Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.*, **103**, 547-553.
- Wilson J. H., R. W. Latouche, 1978. Intracellular digestion in two sublittoral populations of *Ostrea edulis* (Lamellibranchia). *Mar. Biol.*, **47**, 71-77.
- Yonge C. M., 1926. The digestive diverticula in the Lamellibranchia. *Trans. R. Soc. Edinburgh*, **54**, 703-718.