

## EVALUATION DE LA QUALITE DES HUITRES CREUSES *CRASSOSTREA GIGAS* AU COURS DU STOCKAGE REFRIGERE : SUIVI DE LA VIABILITE CELLULAIRE

**AROUSSIA HASSEN, BECHIR BOUSAID & SALOUA SADOK**

Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologie Marines, INSTM La Goulette Port de pêche la Goulette 2060Tunis  
TUNISIE

Email : [hassen.aoussia@gmail.com](mailto:hassen.aoussia@gmail.com), [salwa.sadok@instm.rnrt.tn](mailto:salwa.sadok@instm.rnrt.tn)

### ABSTRACT

Oysters *Crassostrea gigas* marketing represents a major challenge for oyster farmers. The conservation of oyster quality is a major problem because these products should be sold fresh and must be alive. A solution to this problem is presented in this study that offers storage of oysters in a wet tissue at 4 ° C. The performance of this method was monitored by the analysis of cell viability during storage. The results showed that the viability of oysters was maintained after chilling in a wet tissue at 4 ° C up to 20 days. This simple and not expensive method allowed the extension of oysters shelf life for better marketing flexibility.

### RESUME

La commercialisation des huîtres creuses *Crassostrea gigas* représente un enjeu majeur pour les ostréiculteurs. La conservation de la qualité des huîtres est un problème majeur car ces produits vendus à l'état frais, doivent rester vivants. Une solution pour résoudre cette problématique est présentée dans cette étude qui propose le stockage des huîtres dans un tissu humide à 4°C. Le suivi de la performance de cette méthode a été réalisé par l'analyse de la viabilité cellulaire au cours du stockage des huîtres à l'état vivant. Les résultats ont montré que le maintien de la viabilité des huîtres après réfrigération dans un tissu humide à 4°C peut atteindre 20 jours. Cette méthode simple et non coûteuse a permis le maintien de la viabilité des huîtres pour une période permettant leur commercialisation dans les meilleures conditions.

### INTRODUCTION

Dans les habitudes pratiques culinaires européennes, l'huître doit se consommer « vivante » et « fraîche ». Elle ne doit pas être consommée si : elle est ouverte/entrouverte, si elle dégage une mauvaise odeur ou si elle renferme une sorte de « chambre » détectée au moment de décrochage de son muscle pour la consommer. Mais, la commercialisation de l'huître dans cet état vivant et frais nécessite une exposition à l'air plus ou moins longue qui peut affecter sa qualité et sa survie.

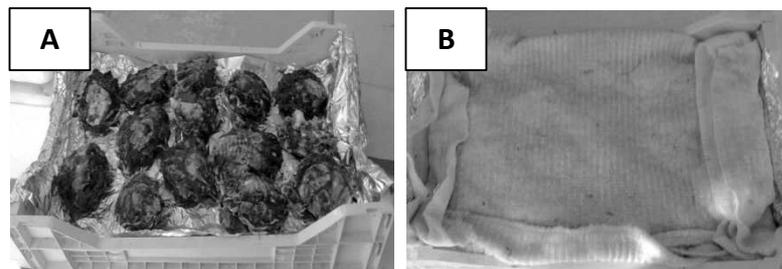
Selon Slabyj (1980), la durée de vie en coquille des bivalves se définit comme étant le temps requis pour atteindre 10 % de mortalité. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer cette durée de vie tels que la température, l'humidité ainsi que la technique d'entreposage (Slabyj et Hinkle, 1976; Aye et MacKinnon, 1992; Eertman et De Zwaan., 1994; Guderley *et al.*, 1994; Weldon, 1999). Toutefois, des conditions extrêmes environnementales peuvent engendrer des changements métaboliques importants qui peuvent

affecter la qualité et la survie des bivalves lors des expositions prolongées (Myrand et Richard, 1987). D'où le choix de stockage réfrigéré qui s'appuie sur la capacité des huîtres à résister à l'émersion tout en conservant leur intégrité vitale. Ce type de stockage est pratiqué en tant qu'une solution simple et abordable pour le stockage temporaire et à court terme des huîtres avant la commercialisation. L'objectif de ce travail est d'évaluer la qualité des huîtres par le suivi des analyses de la viabilité cellulaire au cours du stockage réfrigéré.

### MATERIELS ET METHODES

#### 1. Echantillonnage

Le site d'échantillonnage est localisé dans la lagune de Bizerte qui est située au nord de la Tunisie. Les échantillons d'huîtres sont prélevés (N=120) pour les trois essais, stockés dans une chambre froide à 4°C±1 selon deux types de stockage : le premier lot est stocké à l'air directement à sec (Fig.1.A) et le deuxième lot est stocké couvert par un tissu humide (Fig. 1.B).



**Figure 1:** Lots d'huître creuse stocké sans tissu et à sec (A) couvert par un tissu humide (B)

## 2. Analyse cellulaire

### a. Comptage cellulaire : Test de Bleu de Trypan

#### Principe

La mise en évidence de la mortalité cellulaire a été choisie comme indice de qualité des huîtres stockées. Pour assurer le suivi, un test de bleu de Trypan a été adopté. Ce colorant d'exclusion pénètre dans toutes les cellules mais seules les cellules mortes le retiennent et se colorent en bleu, les cellules vivantes apparaissent brillantes. Le dénombrement a été réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez.

Un échantillon de 0,1g de branchie d'huître prélevé dans chaque tube à centrifugation puis on ajoute 3ml de PBS pour obtenir une dispersion claire sur la cellule de Malassez.

#### Protocole

**Etape 1 :** Nettoyer la cellule de Malassez et la lamelle planée avec de l'alcool puis les sécher. Placer la lamelle planée sur la cellule de Malassez de façon à recouvrir la chambre de cellule.

**Etape 2 :** Placer 50 µL de la suspension cellulaire dans un tube épindorf

**Etape 3 :** Ajouter 50 µL de bleu trypan.

**Etape 4 :** Mélanger délicatement et laisser reposer pendant 2 min. Ne pas laisser plus de 5 min car les cellules viables vont commencer à incorporer le colorant.

**Etape 5 :** Prélever une petite quantité de suspension cellulaire.

**Etape 6 :** Remplir par capillarité la chambre de cellule en touchant délicatement le bord de la lamelle planée avec l'extrémité de cellule. Attention au remplissage des chambres qui ne doivent être ni trop ni pas assez remplies.

**Etape 7 :** Dénombrer séparément toutes les cellules nucléées viables (claire, non bleues) et toutes les cellules nucléées bleues.

**Etape 8 :** Calculer le pourcentage de viabilité : nombre total de cellules claires (NCC)/nombre total

de cellules claires (NCC) + nombre total de cellules colorées en bleu (NCB)

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{NCC}}{\text{NCC} + \text{NCB}}$$

**Etape 9 :** Pour la mise en culture, utiliser le nombre de cellules viables par ml pour déterminer la dilution à effectuer.

Le nombre de cellules viables par ml est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de cellule.ml}^{-1} = 2 \times \text{nombre de cellule calculé} \times 100 \times 1000$$

### b. Test de viabilité cellulaire MTT (MOSSMAN, 1983)

#### Principe

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule).

#### Protocole

**Etape 1 :** Le dénombrement cellulaire est réalisé avec le test de Bleu de Trypan ;

**Etape 2 :** Distribution de 500000 cellules /puits dans 100µl d'eau de mer filtrée ou le PBS (tampon phosphate salin) additionnée de 0,05% de MTT ;

**Etape 3 :** Incubation de 12h à 15°C

**Etape 4 :** Centrifugation à 1500tr/min pendant 10 min puis l'élimination du surnageant

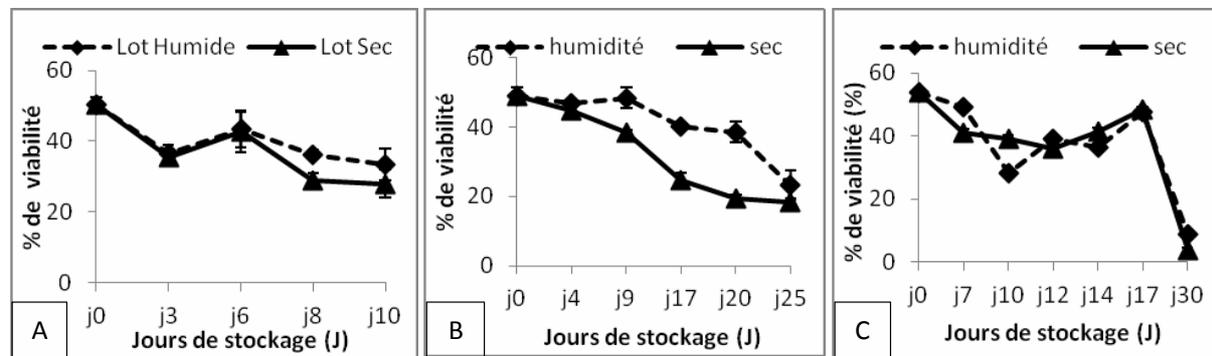
**Etape 5 :** Addition de la diméthylsulfoxyde DMSO (100µl/puits)

**Etape 6 :** Agitation de la microplaque pendant 15min  
**Etape 7 :** Lecture de la densité optique à 570nm à l'aide de lecture de microplaque Elisa.  
**Etape 8 :** Traçage de courbe

**1. Comptage cellulaire : teste de bleu de trypan**

Afin de répondre à la question de l'état de viabilité cellulaire du tissu de la chair des huîtres au cours de stockage à froid un comptage cellulaire de viabilité cellulaire a été suivi au cours de stockage.

**RESULTAT ET DISSCUSION**



**Figure 2:** Variation de viabilité cellulaire au court de stockage de l'échantillon de l'essai 1 (A), de l'essai 2 (B) et essai 3 (C) d'après le test de comptage cellulaire (sec = lot stocké directement à sec ; humide = lot stocké dans un tissu humide; n=6 dans chaque cas)

La figure 2 présente la variation en viabilité cellulaire en fonction des jours de stockage de 3 essais obtenu d'après le test de comptage cellulaire à l'aide de Bleu de Trypan.

L'analyse des résultats montre une diminution de viabilité tout au long de stockage d'une période allant de 10 à 30 jours. Passant de 50,36 ±2% à 33,29 ±4% pour le lot stocké dans un tissu humide, et de 50,36 ±2, à 27,96 ±3% pour le lot stocké à l'air sec de l'essai 1(Fig.2.A), de 54 ±2 à 8,7 ±0,3% pour le lot stocké dans un tissu humide, et de 54±1,9 à 3,6 ±0,32% pour le lot stocké à l'air sec de l'essai 2(Fig.2.B) et de 49,1 ±2,3% à 23,38 ±4,2% pour le lot stocké dans un tissu humide, et de 49,1 ±2,3 à 18,44±0,6% pour le lot stocké à l'air sec de l'essai 3(Fig.2.C). Après avoir appliqué le test de comptage cellulaire, nous concluons que la viabilité cellulaire dépend essentiellement du temps de stockage.

On a remarqué aussi que, la diminution en % de viabilité est plus importante tout au long de stockage pour les huîtres stockées à l'air sec que celle pour les huîtres stockées dans un tissu humide. Donc, la méthode de stockage des huîtres dans un tissu humide est plus performante en ce qui concerne le maintien de viabilité des huîtres.

Afin de confirmer ce qu'on a trouvé comme résultats après le test de Bleu de trypan, un suivi de la viabilité est appliqué avec le test de la réduction en MTT.

**2. Test de viabilité cellulaire MTT**

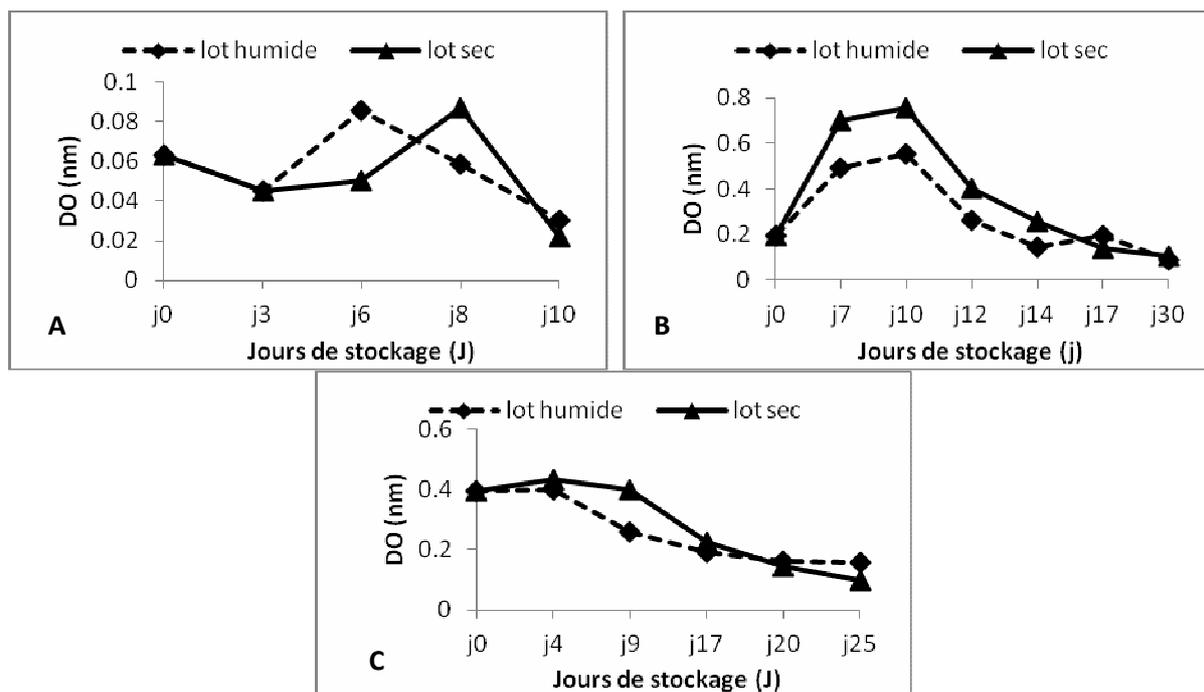
La figure 3 illustre la réponse des cellules branchiales dissociées au test de la réduction en MTT

en fonction de jours de stockage, après incubation.

L'analyse des résultats obtenues tout au long de stockage d'une période allant de 10 à 30 jours, montre qu'au bout du 9<sup>ème</sup> jour, la viabilité devient maximale au cours de stockage avec des valeurs en densité optique les plus élevées par rapport au suivi de chaque échantillon pour le lot stocké à l'air sec est de 0,087nm pour l'essai 1(Fig.3.A), 0,754nm pour l'essai 2 (Fig.3.B) et de 0,401nm pour l'essai 3 (Fig.3.C), et pour le lot stocké dans un tissu humide : 0,086nm pour l'essai 1, 0,553nm pour l'essai 2 et de 0,401nm au bout de 6 jours de stockage. Puis une diminution est observée au niveau de deux lots à la fin de stockage de 0,03nm pour le lot stocké dans un tissu humide et de 0,022nm pour lot stocké à sec pour l'essai 1s, de 0,088nm pour le lot stocké dans un tissu humide et de 0,107nm pour lot stocké à sec pour l'essai 2 et de 0,159nm pour le lot stocké dans un tissu humide et de 0,098 nm pour le lot stocké à sec pour l'essai 3.

L'analyse des résultats obtenues confirme que

- La viabilité cellulaire dépend de jours de stockage ;
- Le test de la réduction en MTT est plus précis que le comptage cellulaire au cours de la variation des teneurs de viabilité expliqué par les erreurs de comptage et la variation rapide de viabilité des cellules branchiales après la dissection ;
- Le lot stocké dans un tissu humide représente une viabilité importante que celle du lot stocké à l'air sec



**Figure 3 :** Variation de la réponse des cellules branchiales dissociées au test de la réduction en MTT de l'essai 1 (A), de l'essai 2 (B) et essai 3 (C) au cours de stockage

(sec = lot stocké directement à sec ; humide = lot stocké dans un tissu humide; n=6 dans chaque cas ; DO= densité optique)

## CONCLUSION

Cette étude a été élaborée dans le cadre d'un projet de labellisation des huîtres creuses de la lagune de Bizerte ayant pour objectif de mettre au point une nouvelle méthode de stockage qui contribue aussi bien à l'instauration d'un étiquetage de l'huître creuse de Bizerte mais également ayant le souci d'offrir au consommateur une garantie de conservation de haute qualité des huîtres en préservant leur intégrité vitale. Après avoir comparé les différents résultats obtenus de chaque lot de stockage, nous pouvons conclure que le stockage des huîtres creuses dans un tissu humide est un bon conservateur qui peut être exploité par les conchyliculteurs afin de ralentir le processus d'altération des huîtres durant l'entreposage réfrigéré.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3\_08 co-financé par l'UE.

## BIBLIOGRAPHIE

AYE L.J. & MACKINNON D. (1992) - Mussel storage, holding and transport study, technical report 206, P.E.I. Department of Fisheries and Aquaculture, 36p.  
 EERTMAN R.H.M. & DE ZWAAN A.B. (1994) - Survival of the fittest: resistance of mussels to aerial exposure. *Biomonitoring of coastal*

*waters and estuaries*, Chapter 12. Edited by Kees J.M. Kramer, Florida, 269-284.

GUDERLEY G., DEMERS A. and COUTURE P. (1994) - Acclimatization of blue mussel (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) to intertidal conditions: effects on mortality and gaping during air exposure. *J. Shellfish Res.*, vol. 13, 379-385.  
 MOSMANN T. (1983) - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 55-65.  
 MYRAND B. & RICHARD J. (1987) - La moule bleue. Conseil des productions animales du Québec. Gouvernement du Québec, 31.  
 SLABYJ B. & HINKLE C. (1976) - Holding and storage of blue mussels in shell. *Research in the life sciences*, University of Maine at Orono, Life Sciences and agriculture experiment station, vol. 23, 4-13.  
 SLABYJ B.M. (1980) - Storage and processing of mussels. In: *Mussel culture and harvest: a north american perspective*, Lutz R.A. (ed.). Elsevier, New York. *Developments in aquaculture and fisheries sciences*, vol7, 247-262;  
 WELDON J.W. (1999) - Abiotic and biotic factors affecting the survival and shelf life of the blue mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). Master of Science Thesis from the University of New Brunswick, 123 p;