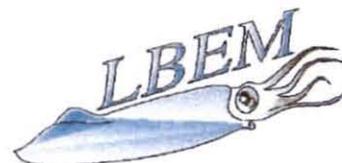




IFREMER, Laboratoire de
Génétique et Pathologie

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE



Laboratoire de Biologie et
Environnement Marins

GAGNAIRE Béatrice
DEA Océanologie Biologique et Environnement Marin
Option Environnement Marin et Biogéochimie
Université Pierre et Marie Curie - Paris VI

66216
NOSOGAG. E
OLR1356.



ÉTUDE DE L'IMPACT DE MICROPOLLUANTS SUR LES CAPACITÉS IMMUNITAIRES DE L'HUÎTRE CREUSE, *CRASSOSTREA* *GIGAS*, *IN VIVO ET IN VITRO*



Juillet 2001

Maître de stage :
Hélène THOMAS-GUYON
LBEM-avenue Michel Crépeau
17000 La Rochelle
Tél : 05-46-50-02-97

Responsable Ifremer :
Tristan RENAULT
LGP-BP 133
17390 La Tremblade
Tél : 05-46-36-98-41

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01356

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Pierre Miramand, directeur du Laboratoire de Biologie et Environnement Marin (LBEM, Université de La Rochelle) et André Gérard, directeur du Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade (LGP, IFREMER, La Tremblade) d'avoir mis en œuvre les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier avec gratitude Paul Nival, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI, pour m'avoir conseillée pour le choix du stage, répondu à mes questions, et pour m'avoir permis d'effectuer ce stage.

Je remercie chaleureusement Hélène Thomas-Guyon, Maître de Conférences à l'Université de La Rochelle, pour son aide, sa compréhension, sa constante bonne humeur, sa participation active au travail présenté ici, et la grande implication dans mon avenir dont elle a fait preuve tout au long de ce stage.

Mes remerciements s'adressent bien sûr également à Tristan Renault, chercheur au LGP de l'IFREMER de La Tremblade, pour sa formidable participation, son soutien permanent, son inépuisable stock d'idées, sa pertinence scientifique, et sa correction efficace de ce rapport. Merci d'être venue m'encourager au Congrès malgré la distance !

Un grand merci pour toutes les personnes des deux laboratoires, stagiaires ou chercheurs, pour la bonne humeur qui règne dans ces laboratoires et qui rend le travail beaucoup plus agréable ! Merci donc, pour l'Ifremer, à Maeva (merci pour les sorties à Echillais !), Karine (merci pour la visite guidée de l'île d'Oléron !), Sabrina, Yohan (merci pour m'avoir aidé à ouvrir les huîtres...), Lionel, Isabelle, Bruno, Corinne..., et pour la fac, merci à Herman (Herman Herman ou Herman Mounaf ? personne ne saura jamais !!) Axelle, Matthieu, Gaëlle, Fannette, Carole (merci pour cette balade à Poitiers !), Frédéric, Christine (la radio dans ton bureau m'a bien aidée pendant que je préparais toutes mes plaques !!), Claire, Gilles (merci pour les blagues sur les blondes...), Denis, Florence, Paco, Nathalie, Thierry, Véronique, et pardon à ceux que j'oublie !

Enfin, je remercie tout particulièrement mes parents et mon frère pour leur soutien et leurs encouragements permanents qui m'ont accompagnés tout au long de mes études, et également mes amis, qu'ils soient de Lyon, de Paris, de Roanne ou d'ailleurs, pour leur présence par mail ou par téléphone !

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
II.1. Système immunitaire des mollusques bivalves	3
II.1.1 <u>Système circulatoire et cellules de défense</u>	3
II.1.2 <u>Mécanismes de défense.....</u>	3
II.1.3 <u>Autres fonctions des hémocytes</u>	5
II.1.4 <u>Le système phénoloxydase.....</u>	5
II.2. Micropolluants : phytosanitaires et métaux lourds.....	6
II.2.1 <u>Les pesticides : l'atrazine.....</u>	6
II.2.2 <u>Le mercure</u>	6
II.2.3 <u>Autres métaux lourds.....</u>	7
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	8
III.1. Animaux.....	8
III.2. Prélèvement des hémocytes	8
III.3. Protocole d'exposition aux xénobiotiques	8
III.3.1 <u>Test <i>in vitro</i>.....</u>	8
III.3.2 <u>Tests <i>in vivo</i></u>	9
III.4. Analyse en cytométrie de flux.....	9
III.4.1 <u>Principe.....</u>	9
III.4.2 <u>Activités cellulaires testées</u>	11
III.5. Détection d'activité phénoloxydase	12
III.5.1 <u>Préparation des échantillons.....</u>	12
III.5.2 <u>Recherche d'une activité de type phénoloxydase spontanée et stimulée en spectrophotométrie... </u>	13
III.5.3 <u>Etude d'une activité de type phénoloxydase spontanée sur cellules cytocentrifugées</u>	13
III.6. Dosage de protéines totales	14
III.7. Analyse statistique	14
IV. RÉSULTATS.....	15
IV.1. Etude de l'impact de polluants en cytométrie de flux	15
IV.1.1 <u>Tests <i>in vitro</i>.....</u>	15
IV.1.2 <u>Tests <i>in vivo</i></u>	18

IV.2.	Etude d'une activité de type phénoloxydase	18
IV.2.1	Activité chez les animaux avant traitement	18
IV.2.2	Activité chez les animaux traités à l'atrazine	18
IV.2.3	Activité des hémocytes exposés au mercure <i>in vitro</i>	22
V.	DISCUSSION.....	23
V.1	Etude de l'impact de polluants en cytométrie de flux	23
V.1.1	Atrazine.....	23
V.1.2	Métaux lourds.....	24
V.2	Etude du système phénoloxydase.....	26
V.2.1	Activité chez les animaux avant traitement	26
V.2.2	Activité chez les animaux traités à l'atrazine	28
V.2.3	Activité des hémocytes exposés au mercure <i>in vitro</i>	28
VI.	CONCLUSION.....	29
	BIBLIOGRAPHIE.....	30

I. INTRODUCTION

L'aquaculture fournit en France plus de 80 % des coquillages produits, mais son développement peut être limité par des mortalités parfois massives, en particulier dues à des parasites, bactéries et virus. Les fortes densités d'individus peuvent favoriser la propagation de ces agents pathogènes, de la même manière que les milieux contaminés par des xénobiotiques dans lesquels les organismes peuvent se montrer plus sensibles au développement de maladies. Face à ces dernières qui sont une limite à la rentabilité des élevages, l'étude du système immunitaire et la compréhension des capacités de défense de ces organismes sont les clés indispensables au bon développement de la conchyliculture. Chez les invertébrés, dans l'état actuel des connaissances, les mécanismes de défense sont définis comme innés.

Les mollusques bivalves sont considérés comme des organismes sentinelles dans le suivi des pollutions aquatiques. Ces organismes sont benthiques et souvent sédentaires : ce mode de vie les expose à toutes les modifications physico-chimiques de l'environnement (température, salinité, contaminants chimiques, etc) sans possibilité de fuite. Leur mode de nutrition de type suspensivore pour la majorité les conduit à accumuler dans leurs tissus des polluants à des facteurs de concentration souvent de l'ordre de 10^3 à 10^6 . Cette capacité à concentrer les micropolluants a été utilisée par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) dans le cadre du Réseau National d'Observation de la qualité de l'eau (RNO) pour suivre les niveaux de contamination du littoral français en métaux lourds.

L'évaluation du risque environnemental est une obligation réglementaire (Directive Européenne 91/414) pour toute nouvelle substance active phytopharmaceutique (dossier toxicologique). Dans la pratique réglementaire, le risque environnemental se détermine selon une approche classique combinant les composantes essentielles du risque, le danger et l'exposition. L'exposition se caractérise par le calcul de concentrations environnementales prévisibles dans l'environnement (PEC), le danger par l'établissement de données d'écotoxicité, déterminées à partir d'essais sur différentes espèces animales et végétales. Le risque est caractérisé sous forme d'un rapport toxicité / exposition, comparé ensuite à une valeur seuil. Cependant, les limites de l'approche réglementaire sont connues, la principale étant la variété des situations environnementales (Rivière, 2001).

L'utilisation des mollusques bivalves en tant qu'indicateurs biologiques repose entre autre sur leurs caractéristiques biologiques et écologiques (mode de nutrition, sédentarité, large distribution à travers le monde, etc) particulièrement intéressantes en suivi des écosystèmes soumis à des contaminations. Au sein des réponses étudiées, celles du système d'immunitaire sont intéressantes puisque cette fonction intervient dans la résistance aux maladies et apparaît potentiellement comme une des plus sensible aux effets des contaminants. Les données disponibles à l'heure actuelle montrent l'altération des capacités du système immunitaire chez des mollusques bivalves exposés à des contaminants. Depuis quelques années, l'étude de la modulation du système immunitaire ou immunomodulation chez les mollusques marins est devenue l'une des voies de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets physiologiques de facteurs environnementaux sur les capacités immunitaires (Oubella et Auffret, 1995).

L'effet des polluants sur la sensibilité aux infections est suspecté, mais peu documenté chez les mollusques bivalves, ce qui justifie des études sur l'immunomodulation sous l'effet de différentes conditions environnementales. La quantification précise de ces réponses en fonction du taux de contaminants dans l'eau pourrait permettre d'utiliser les mollusques bivalves comme organismes sentinelles de pollution.

Le présent travail a consisté à étudier l'impact de polluants environnementaux sur le système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg), par des mises en contact d'hémocytes avec des polluants *in vitro*, et *in vivo* avec des adultes. La réponse immunitaire a été évaluée par le suivi de différentes activités enzymatiques et la mortalité des hémocytes ; les outils de mesure choisis ont été d'une part la cytométrie de flux, pour ses nombreuses possibilités d'analyses au niveau cellulaire, et d'autre part la lecture en ELISA, pour quantifier une activité de type phénoloxydase, une enzyme présente chez les mollusques et soupçonnée d'intervenir dans la réponse immunitaire.

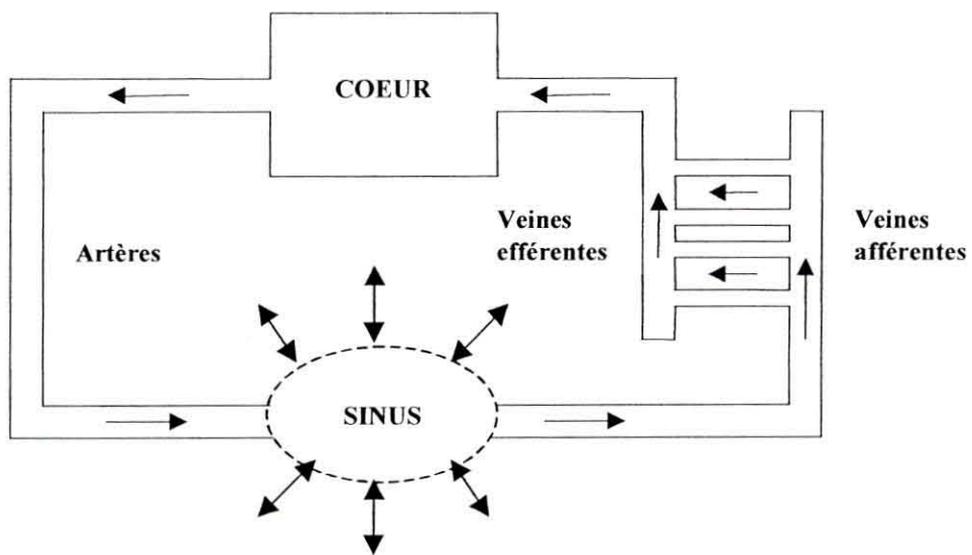


Figure 1 : Diagramme schématique représentant le système circulatoire chez les Mollusques bivalves. (modifié d'après Cheng, 1981)

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.1. Système immunitaire des mollusques bivalves

II.1.1 Système circulatoire et cellules de défense

**Appareil hémolymphatique*

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur et des vaisseaux, où circule l'hémolymphe (Figure 1) (Cheng, 1981). Les hémocytes peuvent être retrouvés à différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et grands sinus des muscles), mais également dans les tissus.

** Les hémocytes*

Les supports de l'immunité cellulaire chez les mollusques bivalves sont les hémocytes. Actuellement, différentes sous-populations hémocytaires ont été identifiées par plusieurs auteurs, mais leur description est souvent partielle et la nomenclature hétérogène; deux principaux types d'hémocytes sont observés chez les mollusques bivalves : les hémocytes granuleux (granulocytes de différents types) et les hémocytes agranuleux (« macrophage-like », hyalinocytes, « monocyte-like ») (Auffret, 1985).

Si les fonctions des différents sous-populations de granulocytes restent hypothétiques, l'observation de types de granules distincts suggère la possibilité de fonctions différentes, comme c'est le cas chez les vertébrés. Les hyalinocytes présentent les caractéristiques morphologiques de cellules peu différenciées. Dans tous les cas, ces cellules sont équipées d'un appareil lysosomal (Auffret, 1985).

II.1.2 Mécanismes de défense

** Défense immunitaire à médiation cellulaire*

- Agrégation hémocytaire : l'agrégation des hémocytes dite spontanée (en absence de pathogène) a lieu lors de l'apparition d'un stress. En général, le contact avec des objets ou l'agitation mécanique peuvent servir de stimulus (Auffret et Oubella, 1997).

- Phagocytose : les hémocytes des mollusques bivalves peuvent phagocyter de nombreux micro-organismes et particules, dont des bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines, etc (Auffret, 1985). Une fois phagocytées, les produits de dégradation peuvent être accumulés dans les vacuoles sous forme de pigments, comme la mélanine. La phagocytose peut être divisée en quatre temps : attraction, adhérence, internalisation et destruction (Cheng et Rodrick, 1975 ; Cheng, 1983). Les trois premières phases reposent sur des capacités de

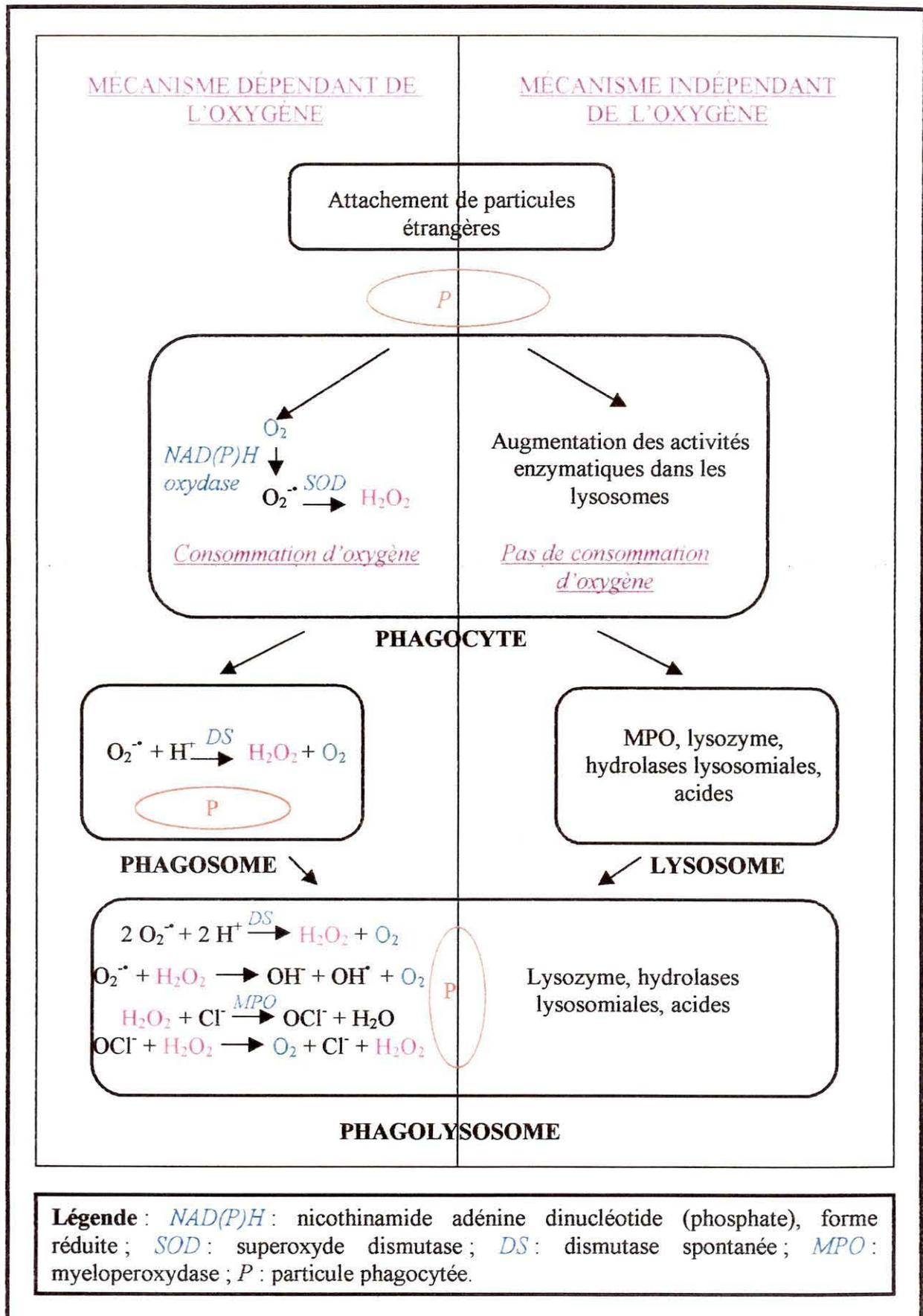


Figure 2 : mécanismes de dégradation des particules phagocytées. Modifié d'après Xue, 1998.

locomotion, transformation et communication hémocyte-cible. La quatrième phase est celle de la destruction ; elle peut faire intervenir deux sortes de phénomènes :

la dégradation par des enzymes lysosomiales : les particules étrangères sont internalisées dans une vacuole de phagocytose (phagosome primaire). Ce dernier fusionne avec des lysosomes qui contiennent des enzymes hydrolytiques, ce qui forme un phagolysosome à l'intérieur duquel les enzymes sont relarguées pour détruire les particules étrangères. Ces enzymes ont été mises en évidence chez différentes espèces de mollusques bivalves, dont *Crassostrea gigas* (Xue et Renault, 2000). Cheng (1983) a montré que la synthèse de ces enzymes lysosomiales augmentait peu après un contact avec des bactéries.

la libération de radicaux toxiques de l'oxygène ou flambée oxydative : les hémocytes des mollusques sont capables de produire des dérivés de l'oxygène très réactifs : radical anion superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), radicaux hydroxyles (OH^\cdot) (Torreilles *et al.*, 1997). L'ensemble de ces réactions est résumé sur la figure 2. Ce système joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne des cellules phagocytaires. Il peut être initié par divers processus physiologiques tels que la phagocytose, les composants de la paroi bactérienne, ou des agents solubles tel que le phorbol myristate acétate (PMA) (Torreilles *et al.*, 1996). Cette réaction semble exister chez différentes espèces de mollusques bivalves ; différentes études l'ont mis en évidence : la moule commune (*Mytilus edulis* Linné) peut synthétiser des métabolites réactifs de l'oxygène (Pipe, 1990) ; la myeloperoxydase a été trouvée chez *Mytilus edulis* (Schlenck *et al.*, 1991) et chez la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck) (Torreilles *et al.*, 1997).

* Composante humorale de la réponse immunitaire

Elle correspond à la production de substances circulantes intervenant dans les réactions de défense (lysozyme, enzymes lysosomiales, peptides antimicrobiens) (Pipe, 1990). Le lysozyme est une enzyme bactériolytique retrouvée dans le sérum comme dans les hémocytes des bivalves, notamment *C. gigas* (Cheng *et al.*, 1975). Les autres enzymes lysosomiales (β -glucuronidase, phosphatase, estérase, peroxydase, aminopeptidase, etc) sont également présentes dans le sérum et dans les hémocytes (Xue et Renault, 2000). Ces enzymes sont contenues dans les lysosomes, présents dans les cellules phagocytaires :

- Les estérases participent à la dégradation intracellulaire des corps étrangers (Auffret, 1985).
- Les aminopeptidases catalysent l'hydrolyse du peptide N-terminal des protéines et dégradent des protéines de surface des parasites (Cheng *et al.*, 1978).
- Les peroxydases interviennent dans la flambée oxydative (Figure 2).

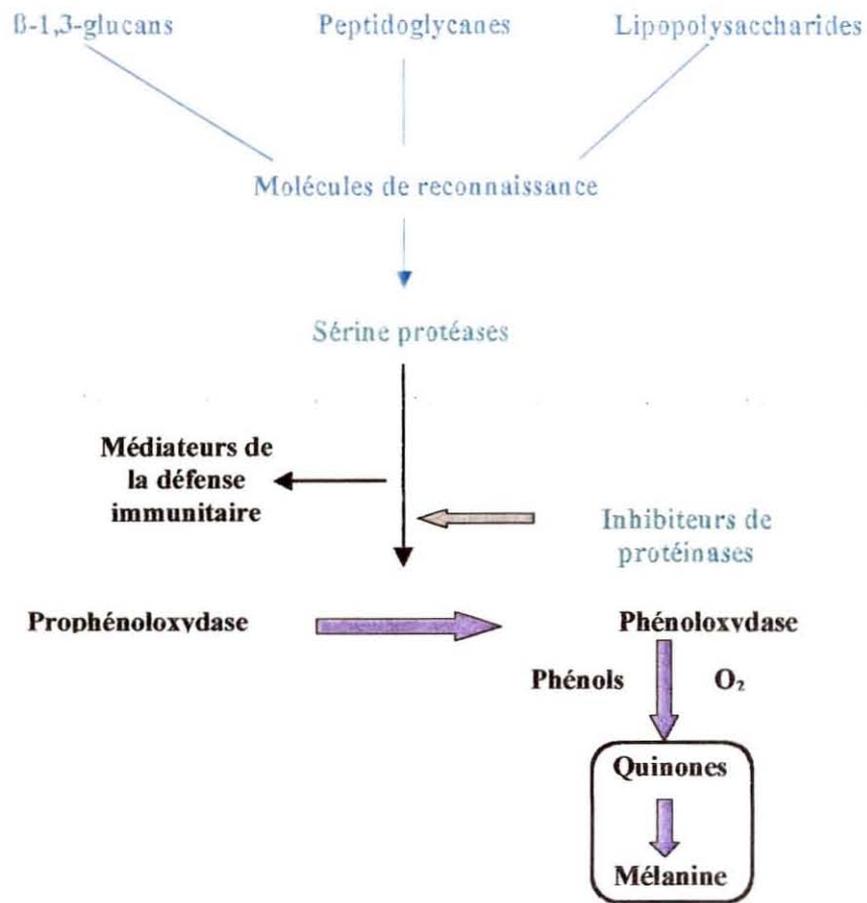


Figure 3 : Activation de la cascade phénoloxydase. Modifié d'après Söderhall et Cerenius, 1998.

II.1.3 Autres fonctions des hémocytes

Les hémocytes des mollusques bivalves jouent un rôle important dans la détoxification des polluants, notamment des métaux lourds. Impliqués dans la réparation des blessures, les hémocytes sont capables de former un clou hémostatique, permettant de limiter les pertes d'hémolymphe et la pénétration de germes (Cheng, 1988). Chez les mollusques bivalves, les mécanismes de défense varient selon les conditions. En général, un effet saisonnier est observé sur la concentration en hémocytes, l'activité des lysoszymes, etc environnementales (Auffret et Oubella, 1994). Ces modifications sont liées à des caractéristiques fondamentales des bivalves : poïkilothermie, pluralité des fonctions hémocytaires, système circulatoire semi-ouvert (Cheng, 1981).

II.1.4 Le système phénoloxydase

La phénoloxydase (PO) est une enzyme cuivre-dépendante (Coles et Pipe, 1994), détectée dans l'hémolymphe (fraction acellulaire et hémocytes) chez plusieurs espèces d'invertébrés. Cette enzyme est capable d'oxyder les monos et di-phénols : elle catalyse la réaction de conversion de la dihydrophénylalanine (L-dopa) et de la dopamine en dopaquinone. Cette molécule peut à son tour être polymérisée en mélanine (Coles et Pipe, 1994 ; Söderhäll et Cerenius, 1998). La mélanisation est impliquée dans la sclérotisation du tégument chez les insectes, la pigmentation des yeux et la synthèse de neurotransmetteurs chez les ascidies (Smith et Söderhäll, 1991). La PO existe pour beaucoup d'espèces dans les cellules sous une forme inactive, la prophénoloxydase (pro-PO). Une stimulation par certaines substances telles que les composants des parois bactériennes (Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Sritunyalucksana *et al.*, 1999) provoque le clivage de la pro-PO par des digestions protéolytiques et donne la PO, molécule active (Smith et Söderhäll, 1991). Les inhibiteurs de sérine protéase répriment quant à eux les processus d'activation (Figure 3).

Ce système enzymatique est principalement observé chez les arthropodes (Söderhäll et Smith, 1983). La PO prend une part active dans les mécanismes de défense par le biais de la catalyse de la réaction d'oxydation intervenant dans les processus de réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation (Söderhäll et Smith, 1983). Il semble que le système pro-PO-PO existe également dans l'hémolymphe des mollusques tels que la mye, la moule commune et la patelle commune (*Mya arenaria* Linné, *Mytilus edulis*, *Patella vulgata* Linné) (Smith et Söderhäll, 1991 ; Coles et Pipe, 1994). Cependant, les connaissances sur le rôle joué par le système de la proPO-PO dans les mécanismes de défense restent parcellaires chez les invertébrés.

II.2. Micropolluants : phytosanitaires et métaux lourds

II.2.1 Les pesticides : l'atrazine

Les pesticides s'accumulent dans les sols et lors des fortes pluies, ils sont entraînés vers l'océan par les estuaires. Les herbicides représentent plus de la moitié du tonnage annuel de pesticides. Ce sont des produits chimiques à fort degré de toxicité (Lioi *et al.*, 1998a). Les triazines représentent l'une des familles d'herbicides les plus utilisées au monde ; elles existent sur le marché depuis quarante ans. Elles comportent essentiellement trois composés : la simazine, la cyanazine et l'atrazine.

L'atrazine ($C_8H_{14}ClN_5$) est le composé le plus utilisé, principalement en Europe et en Amérique du Nord (Munoz *et al.*, 2000). Elle est principalement appliquée sur les cultures de maïs et également au bord des autoroutes et des voies ferrées. C'est un inhibiteur puissant du photosystème II, maillon central de la chaîne de transport des électrons dans la photosynthèse chez tous les organismes autotrophes pour le carbone, et notamment le phytoplancton (Roses *et al.*, 1999). L'atrazine est recensée dans quasiment tous les estuaires du globe. Les concentrations dans les estuaires peuvent varier entre 50 et 7800 $ng.L^{-1}$ (Munsch, 1995). La contamination des écosystèmes par cet herbicide est ubiquiste et qui plus est, pérenne. De fortes concentrations de ce composé causent des effets drastiques sur la photosynthèse, la croissance, le contenu en chlorophylle et la biomasse de la plupart des producteurs primaires aquatiques. La diminution de biomasse peut alors affecter les herbivores (brouteurs de phytoplancton), puis les carnivores, et ainsi toute la chaîne trophique. L'atrazine est liée à d'autres problèmes, tel que celui de la contamination des eaux superficielles et souterraines. La demi-vie de l'atrazine dans les sols est de 7 à 10 jours, ce qui est très bref (Munsch, 1995). Elle est donc entraînée vers les estuaires peu de temps après l'application. Ceci a entraîné la mise en place de nombreux programmes de surveillance. De plus, ce produit a été placé sur la liste des carcinogènes potentiels par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer.

II.2.2 Le mercure

Le mercure est bioamplifié dans le réseau trophique, *i.e.* il est concentré dans les prédateurs à un niveau supérieur à celui où il était dans la proie. Les facteurs de bioconcentration peuvent atteindre 10^7 pour les poissons. La concentration de cet élément dans l'eau est en général de quelques $ng.L^{-1}$ (Cossa et Fichet, 1999). Le principe de pénétration du mercure dans les cellules est identique à celui de tous les cations divalents : la pénétration dépend d'un mécanisme de transport activé par un médiateur chimique et ensuite intervient une succession

de réaction de complexation (Cheng et Sullivan, 1984). L'organe cible de la toxicité du mercure est le système nerveux.

II.2.3 Autres métaux lourds

* *TBT* : c'est un agent biocide présent dans les peintures anti-salissures utilisées pour la coque des bateaux. Son effet est particulièrement net dans les zones portuaires, où les concentrations enregistrées en France peuvent varier entre 10 et 1 500 ng.L⁻¹. Il est bioaccumulé par les organismes marins (bactéries, phytoplancton, crustacés) : les facteurs de bioconcentration (BCF) varient entre 2 000 et 6 000 pour l'huître creuse (Alzieu, 1989). Le TBT se lie aux protéines ou aux membranes phospholipidiques, puis désorganise la structure de la cellule en altérant sa perméabilité. De ce fait, les activités biochimiques associées à la membrane cellulaire sont réduites. Il peut altérer directement les chromosomes, la production de gamètes et la survie des embryons et les larves de bivalves (Tanguy *et al.*, 1999).

* *Plomb* : Ce métal possède de nombreuses utilisations industrielles (électricité, chimie, métallurgie). Les concentrations près des côtes françaises varient entre 8 et 45 ng.L⁻¹ (Cossa *et al.*, 1993). Le plomb est un élément qui ne semble pas être essentiel à la croissance des plantes ni à celle des animaux. Cependant, il est bioconcentré (mais non bioamplifié) par les organismes marins, tels que le phytoplancton, les crustacés, les mollusques, les poissons ou encore les mammifères marins (exclusivement dans le squelette). Les BCF peuvent atteindre 1 000 à 40 000 pour des moules du littoral atlantique français (Cossa *et al.*, 1993). Le plomb agit sur la croissance et la respiration de nombreuses micro et macro-algues (*Nitzschia closterium*, *Asparagopsis armata*). Il produit des effets toxiques par compétition avec les métaux traces essentiels, tels que le manganèse et le cuivre.

* *Cadmium* : les concentrations en cadmium peuvent être assez fortes dans les estuaires, jusqu'à 393 ng.L⁻¹ dans l'estuaire de la Gironde (Chiffolleau *et al.*, 1999). Le cadmium est bioconcentré dans les organismes marins, mais il n'est pas biomagnifié. La bioaccumulation est importante pour les mollusques bivalves. Le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas essentiel pour les organismes vivants. Il provoque des troubles du développement embryonnaire chez les mollusques bivalves et les échinodermes, ainsi que des retards de croissance du phytoplancton (Chiffolleau *et al.*, 1999).

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. Animaux

Les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, ont été fournies par un ostréiculteur de La Tremblade, (Baie de Marennes-Oléron, Charente-Maritime). Tous les animaux analysés étaient originaires de la même exploitation ostréicole de manière à introduire le moins de biais possible, et les huîtres ont été ouvertes immédiatement après leur arrivée au laboratoire. Les individus étaient âgés de deux ans environ, de longueur approximative de la coquille de 8 à 10 cm.

III.2. Prélèvement des hémocytes

Après ouverture précautionneuse des huîtres par section du muscle adducteur, l'hémolymphe a été prélevée directement dans la cavité péricardique par ponction à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9×25 mm. Pour chaque huître, 0,5 à 1 mL d'hémolymphe a été prélevé. Les hémolymphe de 30 individus ont été mélangées de façon à réduire la variabilité interindividuelle et également afin de fournir suffisamment d'hémocytes pour effectuer l'ensemble des tests envisagés. Après prélèvement, les hémocytes ont été conservés dans la glace le temps de réaliser les expériences de façon à éviter l'agrégation hémocytaire.

III.3. Protocole d'exposition aux xénobiotiques

III.3.1 Test *in vitro*

Les tests effectués ont consisté à mettre en contact *in vitro* un polluant déterminé avec les hémocytes. Les analyses ont été réalisées après 4 et 24 heures de contact avec le polluant. Les incubations ont été réalisées à température ambiante à l'obscurité. Les polluants ont été rajoutés sous un volume de 2 µL de par mL d'hémolymphe. Les concentrations mentionnées dans l'ensemble du rapport sont toujours les concentrations finales obtenues après ajout dans l'hémolymphe : les solutions-mères ont été préparées de manière à obtenir ces concentrations finales.

5 polluants ont été testés : l'atrazine, le mercure, le TBT, le cadmium (Cd) et le plomb (Pb).

Les concentrations utilisées pour chaque composé étaient :

- Atrazine : 2-20-200 mg.L⁻¹
- Mercure (Mercure (II) chloride (HgCl₂), R.P. Normapur TM AR, Prolabo (Rhône Poulenc) : 0,5-5-50 mg.L⁻¹
- TBT (tri-n-butyltin acetate, Strem chemicals) : 5-50-500 µg.L⁻¹
- Cadmium (Cd(NO₃)₂ and HNO₃ (N 0,5 M), 1 g.L⁻¹, Fluka) : 0,1-0,25-2 mg.L⁻¹

- Plomb (lead Atomic Absorption. Standard solution, in 1% HNO₃. 1010 µg.mL⁻¹, Sigma) : 0,05-0,1-2 mg.L⁻¹

Les métaux lourds ont été préparés dans l'acide nitrique HNO₃ 0,3 N afin de préserver leur activité. Les dilutions d'atrazine ont été réalisées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Un essai individuel de mise en contact des hémocytes avec le mercure a été réalisé sur dix animaux. Du fait de la faible quantité d'hémolymphe recueillie par individu (environ 400 µL), les seules activités testées ont été la mortalité et la présence d'aminopeptidases. 200 µL ont servi de témoins, et 200 autres µL ont été exposés au mercure à la concentration 50 mg.L⁻¹. Les mesures ont été réalisées après 24 heures d'incubation à l'obscurité à température ambiante.

III.3.2 Tests *in vivo*

Des huîtres âgées d'environ 3 ans et demi ont été mises en contact avec de l'eau enrichie en atrazine. Six lots ont été établis: deux lots témoins (1A et 1B), deux lots soumis à 0,01 mg.L⁻¹ d'atrazine (2A et 2B) et deux lots soumis à 0,1 mg.L⁻¹ (3A et 3B). Les huîtres ont été acclimatées pendant 6 jours en circuit ouvert, puis elles ont reçu le polluant pendant 3 semaines en circuit fermé. Cette expérience a été réalisée deux fois. Des prélèvements d'eau dans chaque bac ont été analysés par le Cemagref de Bordeaux tout au long de l'expérience afin de contrôler la présence d'atrazine. Chaque bac contenait 157 litres d'eau de mer comprenant l'atrazine ; l'eau a été renouvelée tous les jours. Les bacs ainsi que les filtres biologiques ont été vidés puis remplis en eau maintenue à 19,5°C ± 1°C (température de la pièce). Un volume de 157 mL d'atrazine à 10 mg.L⁻¹ et à 100 mg.L⁻¹ dilué dans 5 litres d'eau de mer a été rajouté respectivement dans les lots 2A, 2B et 3A, 3B. Les huîtres ont été nourries quotidiennement avec 8 L d'*Isochrysis galbana* concentré à 6.10⁶ cellules .mL⁻¹ et 3,5 L de *Tetracelmis suecica* concentré à 1,5.10⁶ cellules.mL⁻¹ par bac.

III.4. Analyse en cytométrie de flux

III.4.1 Principe

La cytométrie de flux consiste à étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules (cellules) entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant. Ces informations sont obtenues soit directement (autofluorescence des cellules), soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes (marqueurs cellulaires). Un cytomètre de flux est constitué d'une composante fluidique, d'une composante optique et d'une

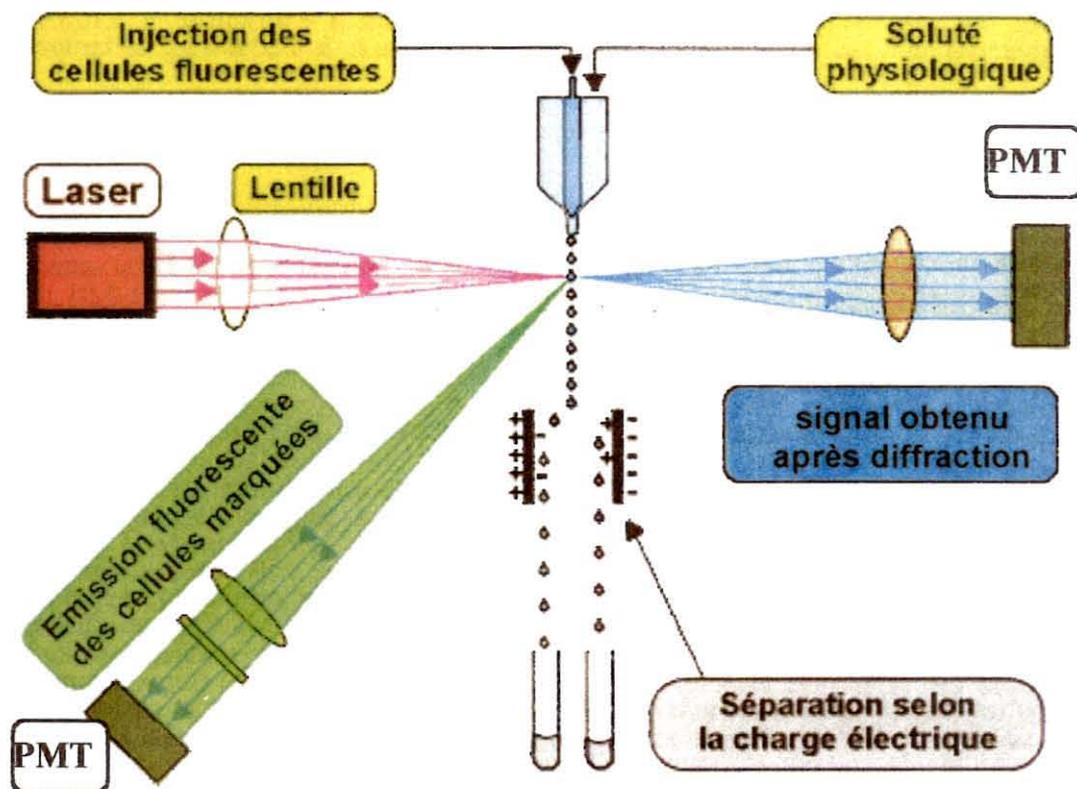


Figure 4 : Principe de la cytométrie de flux ; PMT : Photomultiplicateur.

composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique ; l'appareil utilisé dans cette étude est un EPICS XL 4 (Beckman Coulter).

Les cellules sont alignées dans une gaine, grâce à un flux liquide coaxial (solution saline isotonique), et sont acheminées vers un système optique (Figure 4). Ce système comprend une source lumineuse excitatrice, ainsi qu'un ensemble de miroirs dichroïdes récepteurs, qui permettent d'analyser les rayonnements émis par les cellules. La source lumineuse est constituée d'un laser à ions argon qui produit une lumière monochromatique (488 nm), unidirectionnelle et stable. Des lentilles permettent de focaliser le faisceau laser. Après excitation des cellules par le laser, les signaux émis sont transmis par l'optique de réception vers les détecteurs où ils sont mesurés et quantifiés. Les signaux sont ensuite amplifiés par des photomultiplicateurs et transformés en signaux électriques. Après tri et répartition en fonction de leur voltage, les signaux de même tension sont regroupés dans un même canal. Un canal correspond à 0,01 volt. Le voltage maximal étant de 10,24 volts, 1024 canaux sont disponibles pour l'analyse des évènements.

Une fois le tri réalisé, les données sont analysées et rapportées sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes grâce à l'interface informatique. Toute cellule émet une fluorescence naturelle de faible intensité (autofluorescence), qu'il est possible d'analyser en cytométrie de flux. Une mesure directe (sur les cellules non marquées) peut être effectuée sur rayons diffractés (modification de la direction, sans modification de la longueur d'onde). Les paramètres ainsi mesurés sont la taille (Forward Scatter Height, FSC) et la complexité (Size Scatter Height, SSC) des cellules étudiées. La mesure des rayonnements diffractés à petit angle (inférieur à 10°) permet de déterminer la taille. Plus une cellule est petite, plus la diffraction est faible. La mesure de la lumière diffractée ou réfléchie à grand angle (inférieure à 90°) permet quant à elle d'analyser la complexité des cellules. Dans ce cas, la diffraction est fonction de la richesse des cellules en organites et de leur complexité structurale.

Certaines analyses nécessitent l'utilisation de fluorochromes (marqueurs cellulaires). Elles se basent sur la capacité de ces composés à absorber l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, puis de la réémettre à une longueur d'onde différente après excitation. Le cytomètre EPICS XL 4 (Beckman Coulter) possède quatre lentilles permettant de recueillir quatre longueurs d'ondes différentes : le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à 600 nm (détecteur FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (détecteur FL3), et le rouge uniquement de 640 à 700 nm (détecteur FL4).

III.4.2 Activités cellulaires testées

Pour chaque paramètre cellulaire étudié en cytométrie en flux, le nombre d'événements analysés a été fixé à 5 000. Les résultats ont été exprimés sous forme de cytogramme indiquant la taille (FSC), la complexité (SSC) ainsi que le canal de fluorescence correspondant à l'activité testée. Parmi les activités retenues, la viabilité cellulaire, le cycle cellulaire, la phagocytose ainsi que différentes enzymes lysosomiales ont été évaluées.

* *Viabilité cellulaire* : un volume de 5 µL d'iodure de propidium (IP ; Interchim ; 1,0 mg.L⁻¹) a été ajouté à 200 µL d'hémolymphe. Une incubation de 30 minutes dans la glace a été réalisée avant l'analyse. L'IP est un fluorochrome qui pénètre dans les cellules dont la membrane est lésée et se fixe à l'ADN et à l'ARN en le colorant (signal rouge : FL3). Les cellules marquées sont celles dont la membrane n'est plus intègre. Elles correspondent à des cellules mortes.

* *Cycle cellulaire* : un volume de 200 µL de tampon de lyse (annexe I) et 20 µL d'IP a été ajouté à 200 µL d'hémolymphe. Une incubation de 2 heures a été effectuée dans la glace. Les cellules ont été perméabilisées pour laisser pénétrer l'IP de façon à avoir une information sur la quantité d'ADN contenue dans les cellules. Il a été possible de déterminer le pourcentage de cellules haploïdes (gamètes provenant de la gonade au moment du prélèvement), diploïdes (normales) et tétraploïdes (cellules en division).

* *Enzymes lysosomiales et production de radicaux libres* : l'activité des enzymes estérase, aminopeptidase, cathepsine et phosphatase, et la production de radicaux libres en présence de phorbol myristate acétate (PMA) a été déterminée. La méthode était la même pour toutes les activités enzymatiques testées : un volume de 10 µL du kit « Cell Probe TM Reagents » (Beckman Coulter) correspondant a été ajouté à 200 µL d'hémolymphe. L'incubation a été de 15 minutes à l'obscurité à température ambiante.

Le kit « Cell Probe fluoresceine diacetate (FDA)•Esterase » permet d'ajouter un substrat de l'enzyme estérase, lié à un complexe particulier de façon à ce que l'ensemble soit non fluorescent et puisse pénétrer dans les cellules. Si l'enzyme est présente, elle va dégrader le substrat, ce qui coupera les liaisons avec le complexe associé qui devient fluorescent. Ce dernier n'étant pas liposoluble se trouve emprisonné à l'intérieur de la cellule. On peut donc mesurer par cytométrie en flux l'intensité de fluorescence, qui donne une information sur la quantité d'enzyme présente. Le principe est le même pour les kits « Cell Probe

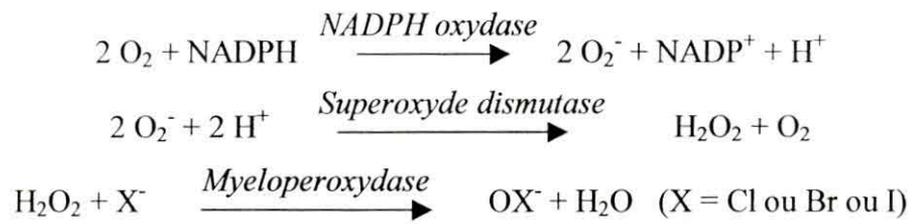


Figure 5 : Réactions intervenant pendant la flambée oxydative.

A•Aminopeptidase M » et « Cell Probe TP•Cathepsin » qui permettent respectivement de mesurer les activités enzymatiques de type aminopeptidase et cathepsine.

Le kit « Cell Probe dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), phorbol myristate acetate (PMA)•Oxidative Burst » est utilisé pour le dosage des peroxydases. Le PMA permet de stimuler l'ensemble des processus qui ont lieu lors de la flambée oxydative, au cours de laquelle la NADPH oxydase et la superoxyde dismutase catalysent les réactions aboutissant à la formation d' H_2O_2 (Figure 5).

La conversion de la DCFH-DA non fluorescente en DCF (dichlorofluoresceine) fluorescente a lieu en plusieurs étapes : la DCFH-DA est d'abord convertie en DCFH par une estérase ; la DCFH est le même composé que la DCF, mais non fluorescent. Ensuite la DCFH est transformée en DCF par la peroxydase et en présence d' H_2O_2 . La mesure de la fluorescence de la DCF est un indicateur de la production de H_2O_2 et donc de la présence de la peroxydase.

* *Phagocytose* : un volume de 10 μ L de billes (fluorospheres® carboxylate-modified yellow-green fluorescent (505/515 nm), 2 % solid, Interchim) de 1 μ m de diamètre a été rajouté à 500 μ L d'hémolymphe. L'incubation a été de 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Lorsque les billes sont phagocytées, les cellules émettent une fluorescence correspondant à l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC) porté par les billes. On ne tient pas compte de la fluorescence correspondant à 1 et 2 billes car elles n'est pas caractéristique de la phagocytose : elles peut correspondre à la présence de billes collées à la surface des cellules. A partir de 3 billes, on considère qu'elles ont été bien intégrées dans un hémocyte par phagocytose.

III.5. Détection d'activité phénoloxydase

III.5.1 Préparation des échantillons

L'activité phénoloxydase dans les échantillons d'hémolymphe et d'oreillettes a été évaluée.

- Les échantillons d'hémolymphe ont été centrifugés une première fois à 260 g pendant 10 minutes à 4°C (Microfuge 12, Beckman), puis congelés, et ensuite ont subi une autre centrifugation à 40 000 g pendant 25 minutes à 4°C (MR22i, Jouan).

- Les oreillettes ont été poolées par 4. Elles ont subi une dissociation à la fois mécanique et chimique, par l'utilisation de l'homogénéiseur de Dounce : 1 mL de solution contenant de la trypsine versène 2 mg/mL diluée avec du tampon phosphaté (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) a été placé dans l'homogénéiseur, puis les oreillettes ont été broyées à l'aide du piston, selon un protocole précis : 3 coups toutes les minutes pendant 3 minutes, puis 1 coup

toutes les minutes pendant 7 minutes. Le broyat a été centrifugé à 2 000 g pendant 15 minutes à 4°C (Microfuge 12, Beckman), ensuite le surnageant a été éliminé et le culot repris dans 1,5 mL de PBS, dans un tube Eppendorf a été centrifugé à 40 000 g pendant 20 minutes à 4°C (MR22i, Jouan).

III.5.2 Recherche d'une activité de type phénoloxydase spontanée et stimulée en spectrophotométrie

La recherche d'une activité de type PO dans l'échantillon (hémocytes ou oreillettes d'huîtres creuses adultes) a été effectuée par mesure de la transformation de la L-Dopa en dopachromes. Cette réaction a été suivie par spectrophotométrie par lecture de densité optique (DO) à 490 nm. Les échantillons ont été distribués dans une microplaque adaptée au lecteur ELISA. Le schéma de distribution des échantillons pour mesurer les activités spontanées et stimulées est présenté en annexe II.

Différents stimulants de l'activité de type PO ont été testés : méthanol (MeOH, Sigma), isopropanol (Propan-2-ol, Sigma), trypsine purifiée TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, Sigma) à 1g.L^{-1} , et phénylthiouréa PTU (1-Phenyl-3-(2-Thiazolyl)-2-Thiourea, Sigma) à 10 mM.

Un essai de détection d'une activité de type PO en présence de mercure et d'atrazine a été réalisé sur des échantillons n'ayant reçu aucun traitement. Le mercure a été utilisé aux concentrations 0,5 et 5 mg.L^{-1} , et l'atrazine à la concentration 200 mg.L^{-1} . Les puits contenaient du tampon cacodylate (CAC) (Annexe I) (60 μL), un stimulant (TPCK, 20 μL), un échantillon (20 μL), de la L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphénylalanine, Sigma) et 1 μL de polluant.

III.5.3 Etude d'une activité de type phénoloxydase spontanée sur cellules cyto-centrifugées

100 μL de cellules fraîchement prélevées ont été déposés sur une lame histologique, et ont subi une centrifugation pendant 1 minute à 20 g à 4°C (Universal 16 R, Hettich). Les cellules ont été ensuite fixées dans du Davidson (Annexe I) pendant 20 minutes à 4°C, puis ont été déshydratées par des bains d'éthanol : deux bains en éthanol à 95% pendant 5 minutes, puis 2 bains de 5 minutes dans de l'éthanol absolu.

Les lames ont été incubées pendant 18 heures à l'obscurité avec 200 μL de L-Dopa ; le même nombre de lames a été incubé en présence de CAC. D'autres lames ont été incubées en présence de diaminobenzidine (Sigma Fast TM, Sigma), substrat qui permet de détecter les

peroxydases, pendant 15 minutes ; les témoins ont été réalisés en présence d'H₂O. La concentration cellulaire a été appréciée par microscopie optique.

III.6. Dosage de protéines totales

La concentration en protéines totales contenues dans les échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford à l'aide d'un kit (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce). Le principe est basé sur l'interaction entre deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA) avec l'ion Cu²⁺ se traduisant par une réaction colorée pourpre, le produit obtenu montrant une forte absorbance à 562 nm qui augmente avec la quantité de protéines. Cette réaction peut être quantifiée par une lecture de la densité optique à 570 nm. La sérum albumine bovine (BSA) en solution à 1 mg/mL est utilisée comme standard. Le schéma de préparation de la plaque est reporté en annexe III. La plaque a été incubée pendant 2 heures à 37°C, puis la lecture a été réalisée. La gamme étalon obtenue avec la BSA a permis de connaître la quantité de protéines totales dans les échantillons, connaissant la DO. L'unité d'activité PO correspond à l'augmentation de la densité optique d'une unité par minute et par mg de protéines.

III.7. Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de proportions. Le fait de pooler les hémolymphes et de réaliser par la suite des prélèvements aléatoires pour constituer les aliquots rendent les échantillons indépendants. Les données étant non normales, le test de Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants a été utilisé. A la suite de ce test, s'il aboutissait au rejet de H₀, le test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) a été utilisé pour démontrer un effet dose.

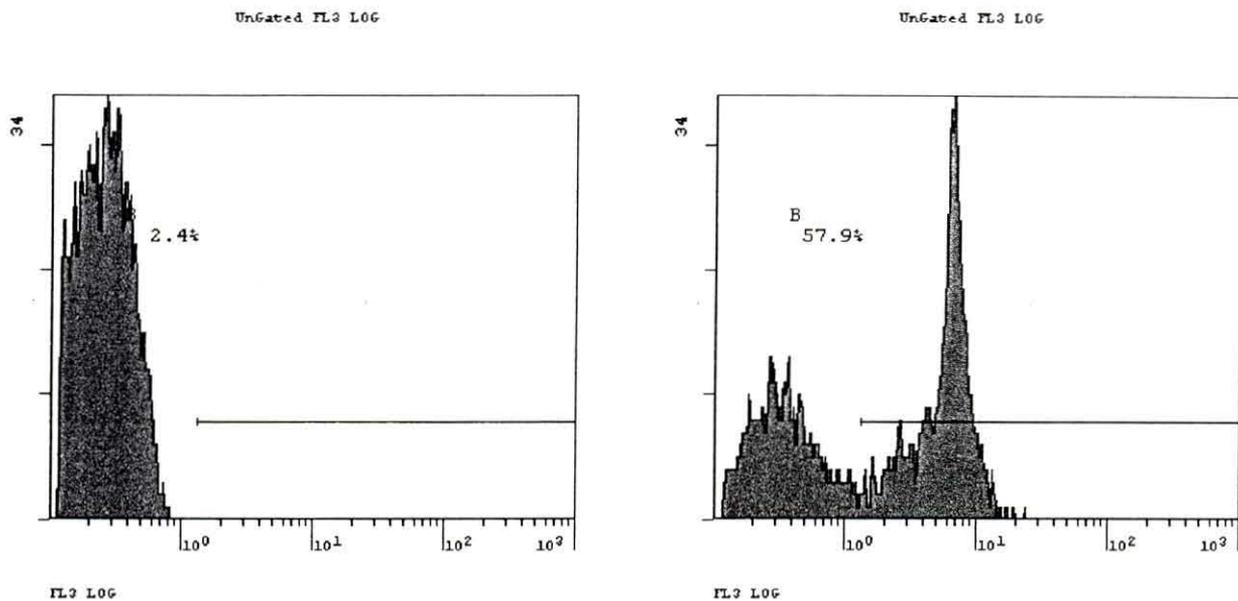


Figure 10 : Profil obtenu pour la mortalité des hémocytes après 24 heures d'incubation. Le graphe de gauche correspond à la mortalité du témoin, le graphe de droite à celle des hémocytes en présence de mercure à 50 mg.L^{-1} . La mortalité est obtenue par marquage avec de l'iodure de propidium, qui donne un signal en FL3 : la lecture du pourcentage de mortalité se fait donc sur l'axe FL3 des cytogrammes.

IV. RÉSULTATS

IV.1. Etude de l'impact de polluants en cytométrie de flux

IV.1.1 Tests *in vitro*

Les essais de mise en contact des hémocytes avec les polluants ont été réalisés sur trois pools différents d'hémocytes.

* *Phytosanitaires : atrazine*

L'ensemble des tests montre qu'il n'y a pas d'effet dose de l'atrazine sur les propriétés immunitaires suivies des huîtres ni à 4 heures, ni à 24 heures aux doses utilisées. Les résultats sont exprimés sous forme de courbe (Figures 6 et 8). Les résultats des analyses statistiques ainsi que les moyennes et écart-types des réplicats sont présentés en annexe IV.

* *Métaux lourds*

- Mercure : les premiers tests effectués ont été réalisés uniquement sur la mortalité des hémocytes après 4 et 24 heures d'incubation sur 3 pools d'hémocytes (Figures 10, 11 et 12). Les courbes ainsi que les tests statistiques (Annexe V) ont permis de mettre en évidence un effet significatif du mercure sur la mortalité : c'est un effet dose-dépendant.

Les tests suivants, répliqués trois fois, ont permis de suivre l'effet du mercure sur la mortalité et certains paramètres immunitaires. Les courbes et l'analyse statistique (Annexe VI) permettent de montrer à nouveau l'effet dose-dépendant du mercure sur la mortalité des cellules aux deux temps analysés (Figures 7 et 9). De plus, le mercure a un effet significatif sur le pourcentage de cellules présentant une activité aminopeptidase (AP) après 24 heures d'incubation. Les pourcentages d'hémocytes présentant une activité AP sont importants à 4 heures d'incubation, quelque soit la concentration de mercure testée. A 24 heures, les hémocytes ne présentent plus aucune activité AP dans le témoin, et le pourcentage d'hémocytes présentant cette activité reste important en présence de mercure : le mercure induit une dose-réponse.

Les résultats des tests individuels de la présence du mercure à la plus forte concentration avec les hémocytes sont présentés en annexe VI. Un double marquage des cellules en mortalité et en activité AP a été réalisé. Les résultats montrent que le mercure induit une mortalité élevée, mais également une diminution du pourcentage d'hémocytes vivants présentant une activité AP.

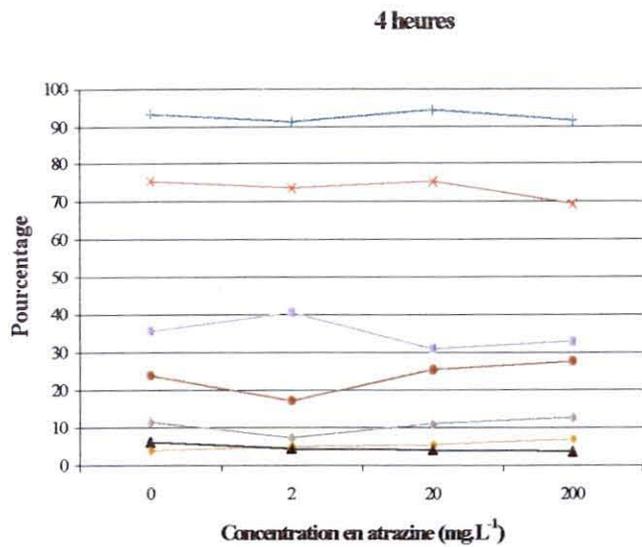


Figure 6 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations d'atrazine *in vitro* (0-2-20-200 mg.L⁻¹) à l'issue de 4 heures d'incubation.

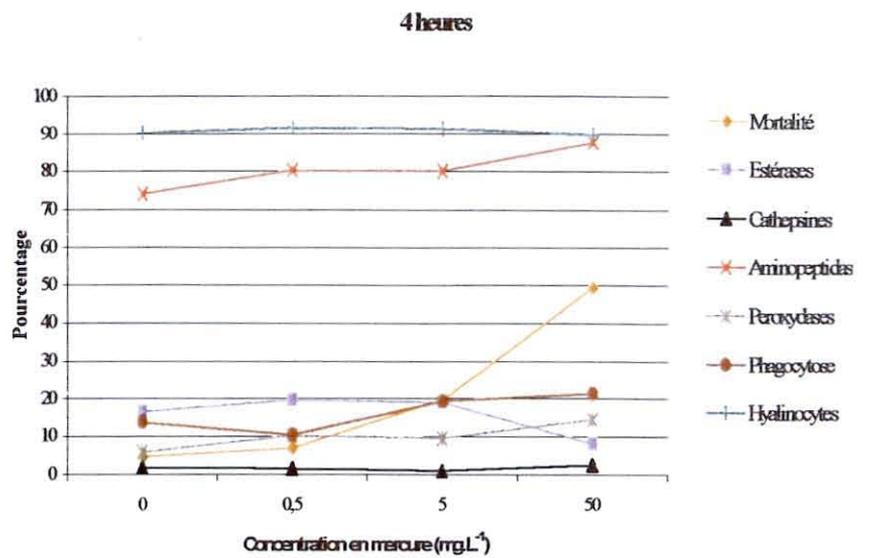


Figure 7 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations mercure *in vitro* (0-0,5-5-50 mg.L⁻¹) à l'issue de 4 heures d'incubation.

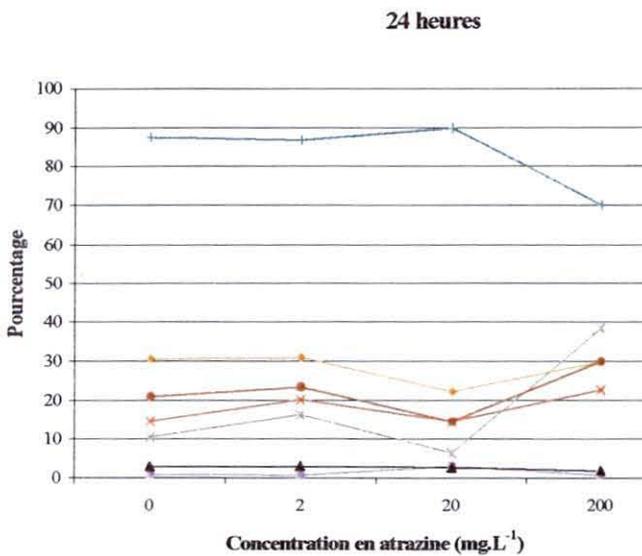


Figure 8 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations d'atrazine *in vitro* (0-2-20-200 mg.L⁻¹) à l'issue de 24 heures d'incubation.

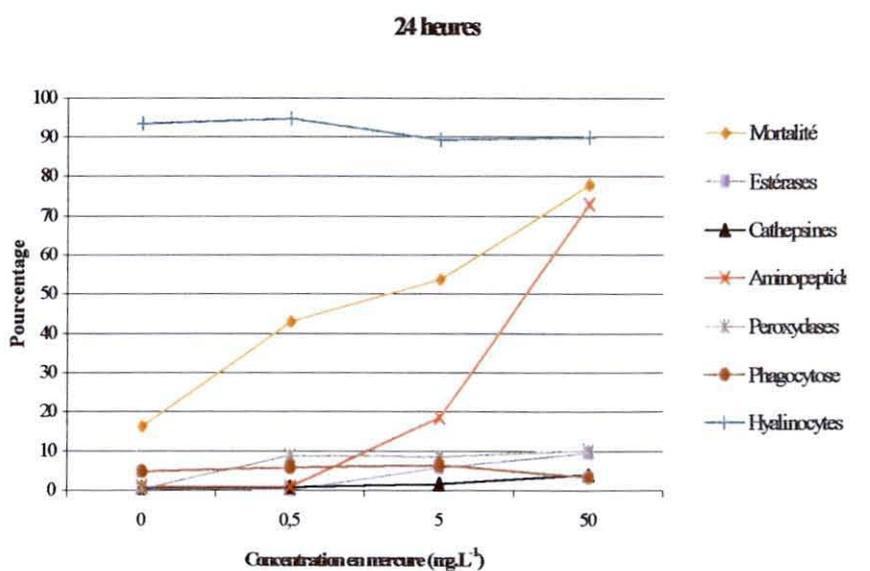


Figure 9 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations mercure *in vitro* (0-0,5-5-50 mg.L⁻¹) à l'issue de 24 heures d'incubation.

IV.1.2 Tests *in vivo*

Les analyses ont été réalisées sur des pools de 4 individus seulement. Les tests statistiques (Annexe VIII) montrent que l'atrazine ne semble avoir aucun effet sur les paramètres hématocytaires testés après un contact durant 3 semaines. Les résultats des tests avec l'atrazine *in vivo* sont présentés en annexe VIII.

IV.2. Etude d'une activité de type phénoloxydase

IV.2.1 Activité chez les animaux avant traitement

L'évolution de la DO des échantillons provenant des animaux avant le début du traitement atrazine est reportée sur les figures 13, 14, 15 et 16. Les résultats concernant la fraction surnageant de l'hémolymphe est présentée en annexe IX, figure IX.1. Les résultats montrent que l'activité la plus importante est trouvée dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe (figure 13). Les autres fractions présentent cependant toutes une activité PO au bout de 21 heures, même si elle est assez faible, par exemple pour le culot d'hémolymphe (figure 14) et le surnageant d'oreillettes (figure 15). La TPCK stimule d'une manière générale fortement l'activité de type PO, bien que dans la fraction hémolymphe acellulaire, elle diminue l'activité. Les activités présentent toutes une cinétique identique avec un maximum d'activité détecté au bout de 21 heures.

Le dosage de protéines totales a été réalisé pour tous les échantillons, puis l'activité DO de chaque échantillon a été ramenée à la concentration de protéines totales de l'échantillon correspondant, et également au temps d'incubation ; les résultats sont présentés en annexe X.

Sur cellules cyto centrifugées (données non montrées), une activité peroxydase est détectable dès 15 minutes d'incubation avec la DAB, substrat de l'enzyme. L'activité de type PO est détectée de manière plus faible, mais tout de même présente sous forme de dépôts. Les cellules observées en microscopie optique en activation spontanée présentent des granules marqués (coloration brune) dans les vacuoles, correspondant aux activités enzymatiques recherchées (PO et peroxydase).

IV.2.2 Activité chez les animaux traités à l'atrazine

** Traitement *in vivo**

Les hémolymphe et oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines ont été analysées. Les résultats en activité spontanée sont reportés pour l'hémolymphe sur les figures 17, 18 et 19, pour les oreillettes sur les figures 20, 21 et 22. Les résultats concernant les autres fractions et les test avec stimulation sont reportés en annexe IX.

Les résultats confirment la présence d'une cinétique de la réponse. Les tests statistiques (annexe IX) ne montrent aucun effet de l'atrazine sur l'évolution de la DO. Les figures 19 et 21 confirment que la TPCK est l'activateur optimal de l'activité de type PO.

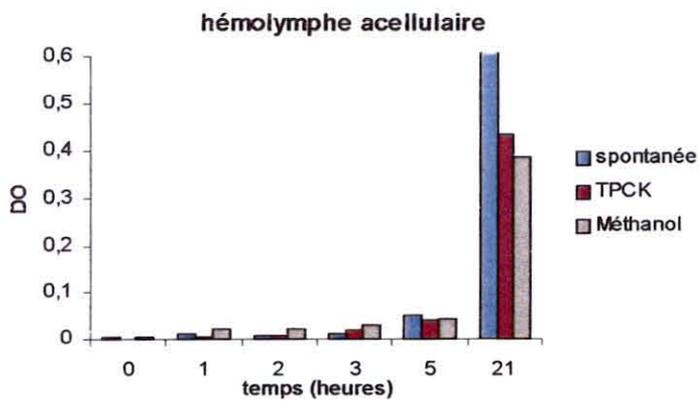


Figure 13 : Evolution de la DO de l'activité spontanée en fonction du temps dans la fraction « hémolymphe acellulaire ».

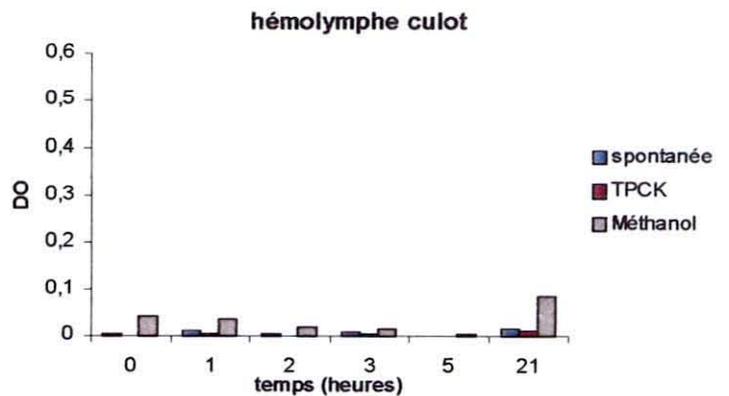


Figure 14 : Evolution de la DO de l'activité spontanée en fonction du temps dans la fraction « hémolymphe culot ».

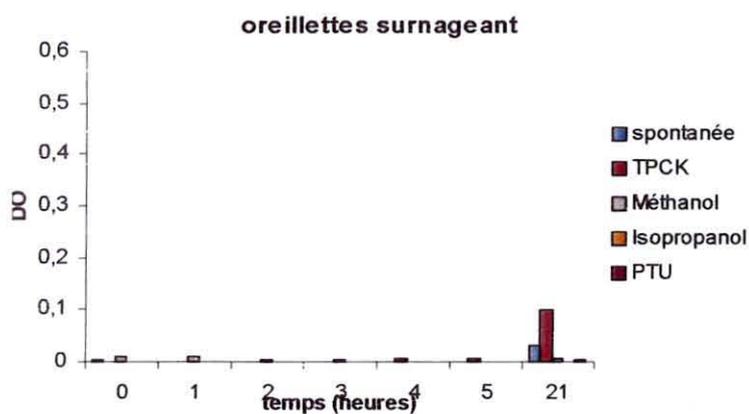


Figure 15 : Evolution de la DO de l'activité spontanée en fonction du temps dans la fraction « oreillettes surnageant ».

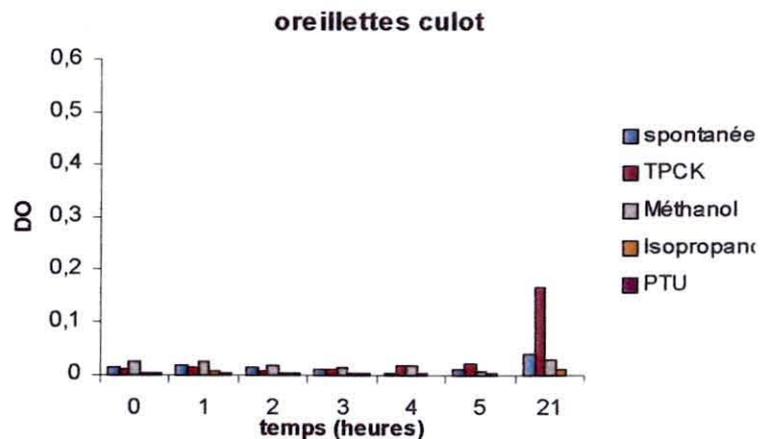


Figure 16 : Evolution de la DO de l'activité spontanée en fonction du temps dans la fraction « oreillettes culot ».

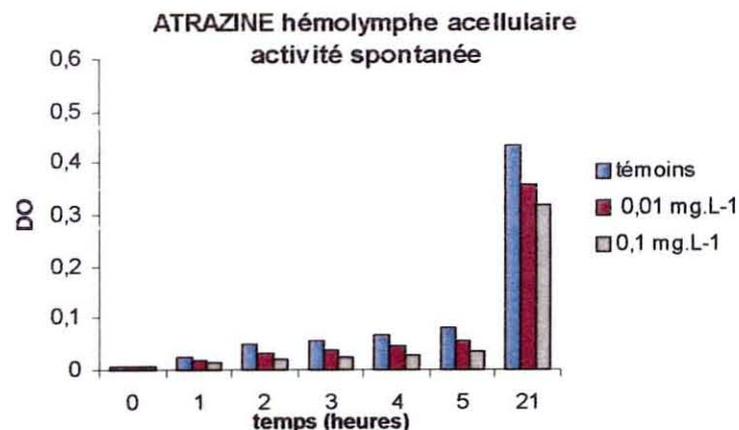


Figure 17 : Evolution de la DO de l'activité de type PO spontanée en fonction du temps dans la fraction « hémolymph acellulaire » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

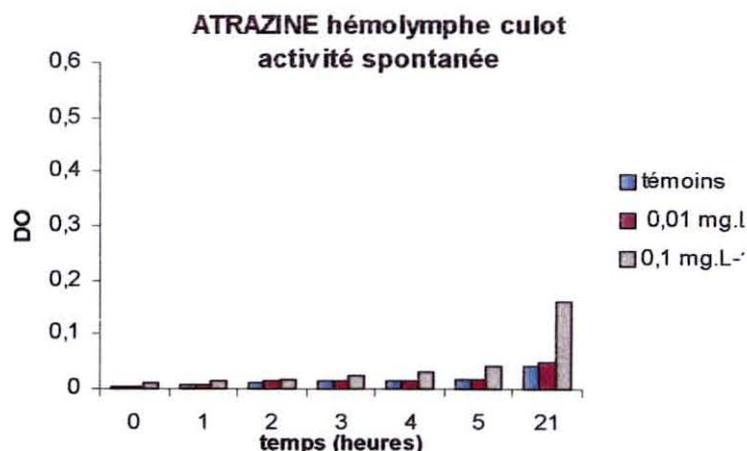


Figure 18 : Evolution de la DO de l'activité de type PO spontanée en fonction du temps dans la fraction « hémolymph culot » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

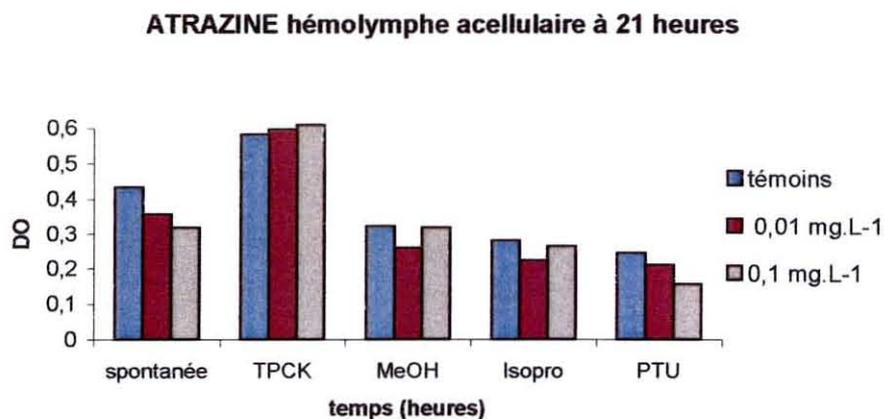


Figure 19 : DO à 21 heures en fonction des différents activateurs utilisés de la fraction « hémolymph acellulaire » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

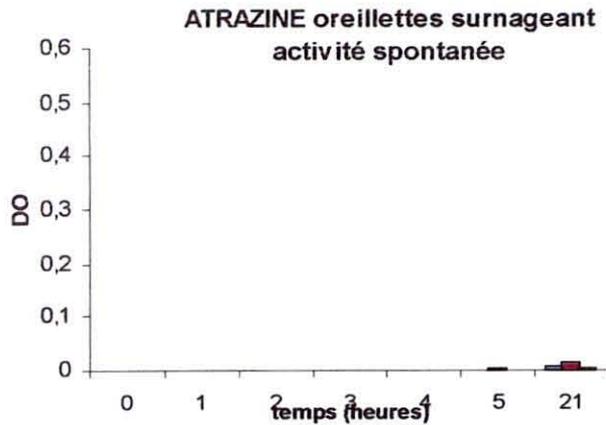


Figure 20 : Evolution de la DO de l'activité de type PO spontanée en fonction du temps dans la fraction « oreillettes surnageant » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

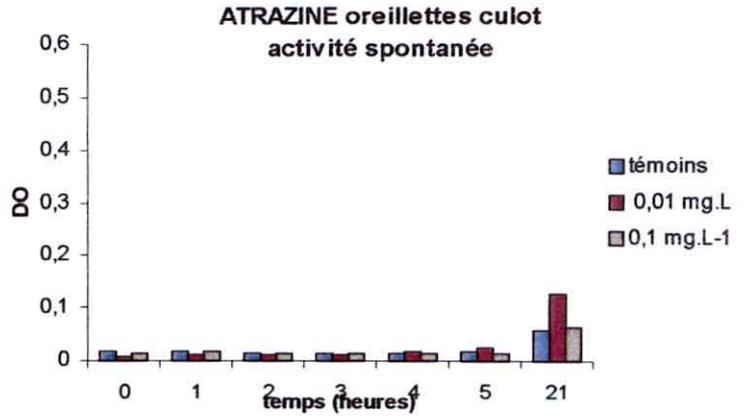


Figure 21 : Evolution de la DO de l'activité de type PO spontanée en fonction du temps dans la fraction « oreillettes culot » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

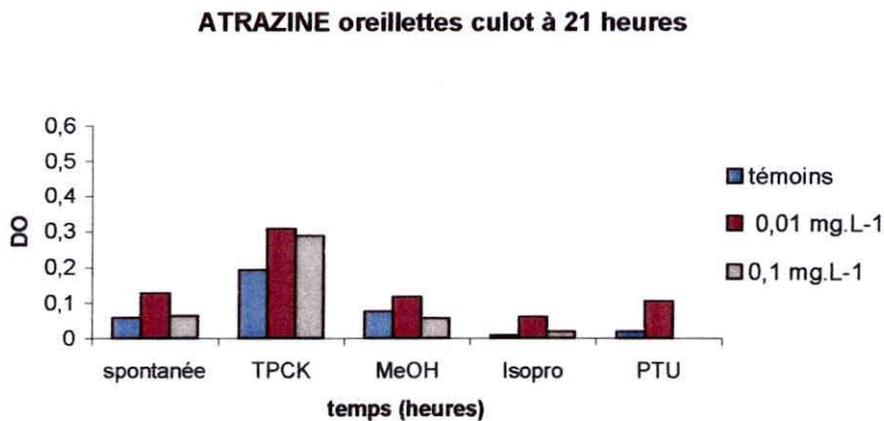


Figure 22 : DO à 21 heures en fonction des différents activateurs utilisés de la fraction « oreillettes culot » des animaux témoins et en contact avec les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

** Traitement in vitro*

Les résultats de la mise en contact des échantillons et de l'atrazine directement sur la plaque sont reportés sur les figures 20, 21 et 22. L'atrazine ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de type PO des échantillons testés. L'atrazine seule présente une forte DO.

IV.2.3 Activité des hémocytes exposés au mercure *in vitro*

L'activité de type PO diminue de façon dose dépendante et temps dépendant : elle disparaît au bout de 3 heures de contact pour toutes les fractions étudiées, et aux deux concentrations de mercure testées. Les résultats sont rapportés sur les figures 23, 24, 25 et 26.

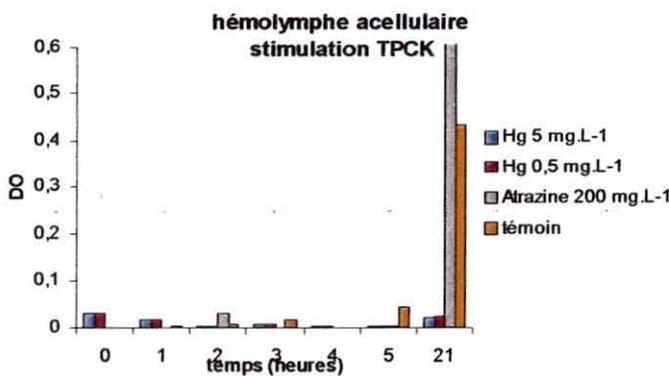


Figure 23 : Evolution de la DO en fonction du temps dans la fraction « hémolymphe acellulaire » d'animaux ayant reçu les différents polluants *in vitro* en présence de TPCK.

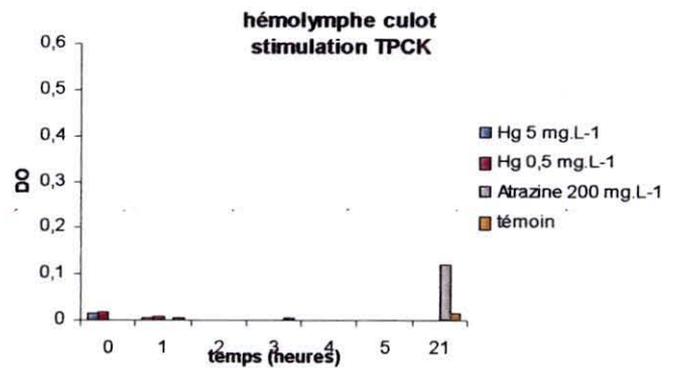


Figure 24 : Evolution de la DO en fonction du temps dans la fraction « hémolymphe culot » d'animaux ayant reçu les différents polluants *in vitro* en présence de TPCK.

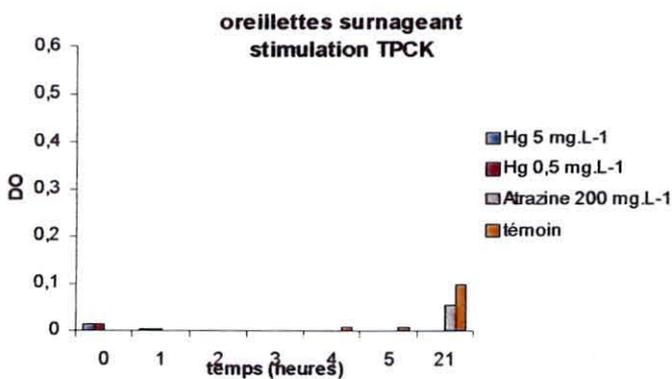


Figure 23 : Evolution de la DO en fonction du temps dans la fraction « oreillettes surnageant » d'animaux ayant reçu les différents polluants *in vitro* en présence de TPCK.

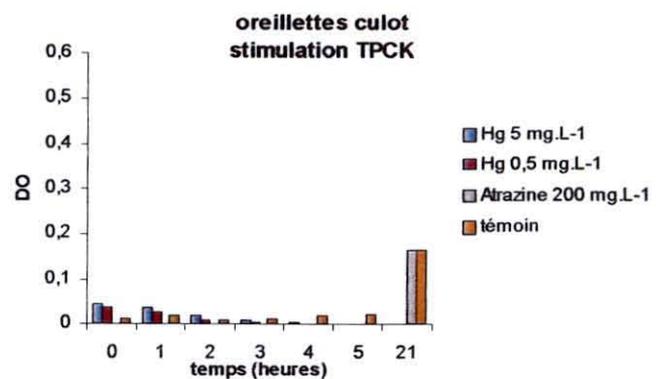


Figure 23 : Evolution de la DO en fonction du temps dans la fraction « oreillettes culot » d'animaux ayant reçu les différents polluants *in vitro* en présence de TPCK.

V. DISCUSSION

V.1 Etude de l'impact de polluants en cytométrie de flux

Les hémocytes sont connus pour leurs propriétés d'agrégation spontanée dans le cas d'une infection. Ce phénomène également rencontré lors du simple prélèvement des cellules doit être pris en compte dans les analyses portant sur ces cellules. Nous avons choisi de ne rajouter aucune substance anti-agrégante pour réduire cette réaction car les effets d'une telle substance sur les propriétés intrinsèques des hémocytes sont mal connus. De plus, certaines études (Oubella, 1996 ; Auffret et Oubella, 1997) rapportent que la présence de polluants *in vivo* et *in vitro* (cadmium, cuivre et atrazine) dans des concentrations proches de celles utilisées dans ce travail sur des hémocytes de mollusques bivalves diminue significativement l'agrégation spontanée.

D'autre part, les volumes de polluants rajoutés ont été choisis de manière à ne pas modifier l'osmolarité du milieu (2 μL par mL d'hémolymphe).

V.1.1 Atrazine

Les études concernant les effets de ce polluant chez les vertébrés ne sont pas nombreuses : elles ont été réalisées principalement sur des lignées de cellules de mammifères, en particulier humaines. Lioi *et al.* (1998b) utilisent des concentrations comprises entre 1 et 11 mg.L^{-1} sur des cultures de lymphocytes humains, avec un temps d'exposition de 72 heures. Kliegerman *et al.* (2000) ont utilisé des concentrations de 5 à 15 mg.L^{-1} sur des cellules sanguines humaines. Des concentrations élevées ont été utilisées dans ce travail car une réponse rapide des cellules était recherchée. En effet, aucun système de culture ne permet de maintenir ces cellules *in vitro* et elles ne conservent pas longtemps leurs propriétés une fois prélevées. De plus il n'existe pas à l'heure actuelle de lignées cellulaires de mollusques bivalves sur lesquels il aurait été possible de réaliser les essais.

Les expériences réalisées ont permis de montrer que l'atrazine n'a pas d'effets sur les propriétés cellulaires testées sur chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ceci a été retrouvé aussi bien dans les expériences *in vitro* que dans celles réalisées *in vivo*, c'est-à-dire dans le cas d'une toxicité aigüe et chronique. Ces résultats sont identiques à ceux rapportés dans la littérature. Les études de Robert *et al.* (1986) et His et Seaman (1993) sur la toxicité de l'atrazine sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* ne montrent pas d'effet de cette molécule à ce stade du développement. L'atrazine ne semble pas avoir non plus d'effet écotoxicologique détectable chez les mollusques d'eau douce (Roses *et al.*, 1999). Les études se sont réalisées sur la génotoxicité de l'atrazine chez l'Homme et les mammifères ont montré

que cette substance n'est pas un inducteur d'aneuploïdie chez l'Homme. Elle n'est pas génotoxique ni mutagène chez les mammifères (Kligerman *et al.*, 2000). En comparaison, des études similaires portant sur d'autres herbicides (glyphosate, vincozolin) ont mis en évidence un potentiel mutagène de ces substances sur des cultures de lymphocytes de bovins (Lioi *et al.*, 1998a).

Cependant, il serait intéressant de répliquer l'expérience *in vivo* : en effet, bien que les statistiques ne montrent aucun résultat significatif, les tableaux de résultats montrent une apparition de nombreuses cellules en division après contact pendant 3 semaines avec l'atrazine à 0,1 mg.L⁻¹ (Annexe VIII). Mais ce nombre élevé de cellules en division est retrouvé en absence d'atrazine également dans la deuxième série d'expérience : cela pourrait s'expliquer par les fortes précipitations des mois d'expérimentation.

V.1.2 Métaux lourds

* *Mercure* : Ce polluant est connu pour sa forte toxicité et sa bioaccumulation. Les études sur ce composé sont nombreuses en écotoxicologie des mammifères marins, pour qui l'accumulation du mercure est une cause importante de mortalité (Cossa et Fichet, 1999). Nos résultats montrent que le mercure provoque une mortalité croissante des hémocytes avec les concentrations utilisées (0,5-5-50 mg.L⁻¹), et ce dès 4 heures de mise en contact. Cet effet rapide a été rapporté par Cheng et Sullivan (1984) sur les hémocytes de l'huître américaine, *Crassostrea virginica* : la mortalité des hémocytes augmentait dès 2 heures de contact pour une concentration de 5 ppm. La toxicité de ce polluant est confirmée dans cette étude chez l'huître creuse avec les concentrations choisies. Ces dernières sont très supérieures à celles du milieu, mais elles peuvent être proches de celles qui existent dans les animaux qui bioaccumulent le mercure. Etant donné qu'une toxicité aigüe était recherchée, il est apparu nécessaire d'utiliser ces concentrations. De plus, des études sur la toxicité du mercure sur des cultures de cellules Vero (fibroblastes de primates) ont été menées avec des concentrations de 3 mg.L⁻¹ (Traoré *et al.*, 1999).

Une action du mercure sur la détection d'activité aminopeptidases a également été mise en évidence. Pour les expériences réalisées sur des pools d'hémocytes, le mercure induit une nette augmentation de la quantité d'AP, alors que pour les expériences effectués sur des individus, une diminution de la quantité d'AP est observée. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par le fait de problèmes observés avec les hémocytes pendant la période février-mars : mortalités d'hémocytes importantes, diminution de leurs activités enzymatiques. Les précipitations ont été anormalement importantes sur la région de la

Charente-Maritime au cours de cette période. La diminution de la salinité dans les bassins d'élevage associée à cette forte pluviométrie a pu avoir un effet sur les hémocytes. Les expériences sur le mercure en pools ont été réalisées sur ces animaux, alors que les expériences sur individus ont été faites plus tardivement (fin avril). Les huîtres avaient visiblement récupéré des niveaux d'activité enzymatiques normaux. Le mercure pourrait donc induire une réponse différente du système immunitaire en fonction de l'état de base des cellules. Quelque soit cette réponse, il a cependant été montré que ce polluant provoque effectivement une modulation de certaines activités cellulaires.

Cette différence de réponse est sans doute liée à d'autres phénomènes : l'effet dose joue un rôle important : par exemple, Cheng et Sullivan (1984) ont montré que le mercure induisait une augmentation de la phagocytose des hémocytes de *Crassostrea virginica* pour une concentration de 0,1 ppm, alors qu'à 0,5, 1 et 5 ppm, la phagocytose était diminuée. De plus, bien que tous les animaux proviennent du même producteur, il est certain qu'en 3 mois d'expériences, nous avons eu des animaux utilisés dans ce travail ayant une histoire différente. Il existe une forte variabilité individuelle chez les huîtres creuses.

* *Autres métaux lourds* : Aucun des tests effectués avec les autres métaux choisis n'a montré d'effet, ni sur la mortalité, ni sur les activités cellulaires suivies. Rappelons que ces expériences ont été réalisées pendant la période où les hémocytes présentaient des altérations des activités enzymatiques. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec ce qui est rapporté dans la littérature. Une étude sur l'effet du cadmium chez *Mytilus galloprovincialis* a montré que le polluant n'était qu'un faible inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Najimi *et al.*, 1997). D'autres études réalisées chez d'autres espèces (larves d'oursin, *Paracentrotus lividus* Lamarck) montre que le cadmium provoque peu d'anomalies au cours du développement embryonnaire chez cette espèce, contrairement au plomb (Radenac *et al.*, 2001). Les larves de *Crassostrea gigas* sont elles plus sensibles au cuivre et au TBT, et beaucoup moins au plomb et au mercure (His *et al.*, 1999).

Concernant le TBT, du fait des forts facteurs de bioconcentration, il apparaît possible qu'en milieu naturel, les hémocytes des huîtres soient exposés à des concentrations en TBT provoquant des effets immuno-toxiques (Anderson *et al.*, 1996). L'un des premiers effets rapportés sur les mollusques bivalves a été les anomalies de croissance de la coquille de *C. gigas* (Dyrynda, 1992). Une étude a montré qu'il peut diminuer la phagocytose de *C. gigas* (Fisher *et al.*, 1990). Un autre travail a montré qu'il induit une mortalité chez les huîtres creuses dès 10 jours de contact à 150 ng.L⁻¹, ce que nous n'avons pas vérifié dans nos

expériences ; mais il semble que la structure génétique de la population a un rôle important. Certains génotypes survivent plus longtemps que d'autres (Tanguy *et al.*, 1999). D'autre part, les bivalves (*Mytilus edulis*) semblent capables d'éliminer ce toxique rapidement dès qu'il n'est plus présent dans le milieu (Skarphédinsdottir *et al.*, 1996).

L'effet des métaux sur la réponse immunitaire peut résulter d'une concordance de différents facteurs, et il serait intéressant de répéter les expériences en mélangeant plusieurs polluants : il peut exister une synergie ou encore un antagonisme entre métaux. Il est rapporté dans la littérature que la présence de zinc ou de cadmium peut diminuer sensiblement les effets toxiques du mercure (Gutierrez-Galindo et Breittmayer, 1981 ; Breittmayer *et al.*, 1984). De plus, il peut y avoir des interactions entre polluants et maladies : une étude a montré qu'une exposition chronique d'huîtres américaines, *Crassostrea virginica*, au TBT pouvait augmenter la progression de la maladie liée au parasite *Perkinsus marinus* (Anderson *et al.*, 1996).

Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'étudier les caractéristiques cellulaires en cytométrie de flux. En effet, cette technique s'avère être un bon outil pour évaluer l'état des cellules. Les résultats avec le mercure permettent de valider qu'il est possible d'observer les effets d'un polluant sur la mortalité et les activités enzymatiques des cellules.

V.2 Etude du système phénoloxydase

V.2.1 Activité chez les animaux avant traitement

La détection d'une activité de type PO est inégale dans toutes les fractions : le maximum d'activité se trouve dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe, et pour les oreillettes, elle se situe dans le culot. Cette présence dans la fraction acellulaire peut être interprétée par une libération de cette enzyme des cellules dans la fraction acellulaire; ce mode d'action présente des similitudes avec à l'activation du système du complément chez les vertébrés, réponse immunitaire non-spécifique. Pour les oreillettes, la présence de la PO dans le culot, c'est-à-dire dans la partie cellulaire, est intéressante : en effet, les oreillettes sont fortement pigmentées ; or les produits finaux de la dégradation des corps étrangers par la PO sont sous forme de pigments, notamment de mélanine. La présence de cette enzyme à cet endroit pourrait jouer un rôle de défense au niveau du cœur, qui joue un rôle de filtre associé au rein chez les bivalves (Zaroogian et Yévich, 1994).

Les alcools purs (méthanol et isopropanol) s'avèrent ne pas stimuler l'activité de type PO. La TPCK ne semble pas activer la réponse de l'activité de type PO dans la fraction acellulaire,

mais la réponse spontanée est tellement forte qu'elle atteint peut-être une saturation et qu'il est impossible de l'augmenter. En revanche, elle active sensiblement l'activité dans les oreillettes, ce qui tend à montrer que le système enzymatique comprendrait une partie inactive sous forme de pro-enzyme. En effet, les substances protéiques telles que la trypsine activent la réaction de clivage protéolytique qui transforme la pro-PO en PO. Ceci est également confirmé par le fait qu'il reste une cinétique de l'activité de type PO (activité maximale au bout de 21 heures) : un certain temps est nécessaire pour que le système se mette en place. Les résultats de la littérature ont montré que la PO existe sous une forme inactive chez les mollusques (Deaton *et al.*, 1999). Elle existe chez de nombreuses espèces d'embranchements différents : crustacés, ascidies (chez la Cione (*Ciona intestinalis* Linné)), échinodermes, mollusques (Smith et Söderhäll, 1991).

Les activateurs et les inhibiteurs de la PO varient selon l'espèce considérée, mais de manière générale, elle est inhibée par la PTU, la benzamidine et l'EDTA (chélateur de Ca^{2+}) ; elle fonctionne mieux en présence de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Cu^{2+}), et elle peut être activée par la température, avec un maximum à 37°C pour la crevette rose *Penaeus monodon* (Sung *et al.*, 1998).

La PTU est un inhibiteur de protéases qui inhibe la transformation de pro-PO en PO. L'activité de type PO détectée chez *C. gigas* est annulée en présence de cette substance, sauf dans la fraction acellulaire dans laquelle une activité enzymatique élevée est constatée : peut être que la concentration de PTU utilisée n'est pas suffisante. Cependant, il faut également signaler que la méthode de dosage peut présenter un biais : en effet, la mesure de DO représente la transformation de la L-Dopa en oquinone, mais la L-Dopa n'est pas le substrat exclusif de la PO : la peroxydase peut la dégrader également (Coles et Pipe, 1994). Il est possible que la PTU n'inhibe pas les autres enzymes capables de dégrader la L-Dopa dans la fraction acellulaire.

La PO a été principalement étudiée chez les insectes, et son rôle n'est pas encore bien déterminé : les molécules intermédiaires produites pendant la synthèse de la mélanine peuvent posséder des propriétés bactéricides. Un des intermédiaires est probablement l'oquinone. Cette molécule réagit avec de nombreux acides aminés et protéines et inhibe les activités enzymatiques, cytolytiques et cytotoxiques de certains micro-organismes. La PO et les protéines associées pourraient également prendre une part dans les phénomènes de reconnaissance des particules étrangères et de réparation des blessures. (Söderhäll et Smith, 1983 ; Söderhäll et Cerenius, 1998). Chez les mollusques (*Mytilus edulis*), en général les plus fortes concentrations de PO sont rencontrées dans le liquide intervalvaire, alors que dans le

reste de l'animal elle est présente à de faibles niveaux d'activité : elle pourrait alors intervenir dans le tannage et la sclérotisation, en formant des dépôts de mélanine (Smith et Soderhäll, 1991 ; Coles et Pipe, 1994). Son rôle dans la défense immunitaire n'est pas bien démontré.

Cette étude est la première à avoir porté sur la recherche d'activité de type PO dans les oreillettes de l'huître creuse. Cette recherche se justifie par le fait que les oreillettes sont composées de cellules cardiaques pigmentées. Le système pro-PO-PO fait intervenir en dernier lieu la mélanisation des produits de dégradation, donc la pigmentation noire des cellules contenant de la PO. Les résultats ont montré la détection d'une activité de type PO dans les oreillettes. Les cellules cardiaques participeraient donc également au système de défense de l'organisme. Une étude sur les cellules brunes d'huîtres américaines a mis en évidence qu'elles sont impliquées dans la prise, l'accumulation, la détoxification et la dégradation de substances solubles étrangères (Zaroogian et Yévich, 1994).

V.2.2 Activité chez les animaux traités à l'atrazine

Le traitement à l'atrazine des huîtres pendant 3 semaines n'a eu aucune influence sur la détection de l'activité de type PO, ni dans l'hémolymphe, ni dans les oreillettes, ni sur l'activité rapportée aux protéines totales. Les essais de contact sur plaque avec des hémocytes et l'atrazine n'ont donné aucune réponse (ni activation, ni inhibition). Ceci confirme les résultats obtenus en cytométrie de flux : l'atrazine ne semble pas moduler la réponse immunitaire de l'huître creuse.

V.2.3 Activité des hémocytes exposés au mercure *in vitro*

Les deux concentrations de mercure (0,5 et 5 mg.L⁻¹) testées inhibent totalement la transformation de la L-Dopa en oquinone dans l'hémolymphe. Le mercure pourrait agir sur la transformation de la pro-PO en PO. Ces résultats confirment également ceux obtenus en cytométrie de flux : le mercure est un modulateur important de la réponse immunitaire, en agissant à plusieurs niveaux *in vitro*. L'effet de polluants sur l'activité de type PO a été étudié avec le cuivre, qui la diminue chez la moule *Mytilus edulis* (Pipe *et al.*, 1999). Une étude a également été réalisée avec du PCB (polychlorinated biphenyl) chez la crevette grise (*Crangon crangon* Linné), pour qui l'activité PO diminue également à une concentration de 5 ppm (Smith et Johnston, 1992). Cependant, dans cette expérience, la diminution intervient après 5 jours. Dans le présent travail, le mercure agit donc précocement sur l'activité de type PO ; la réponse est dose dépendante et temps dépendante.

VI. CONCLUSION

Cette étude a permis de tester la sensibilité des huîtres creuses à divers micropolluants et leurs influences sur la réponse immunitaire de ces animaux. Les résultats permettent de conclure que l'atrazine ne semble pas présenter de toxicité aïgue, ni de toxicité chronique sur les hémocytes. De la même manière plusieurs métaux lourds testés en toxicité aïgue (TBT, plomb, cadmium) ne présentent aucun effet. *A contrario*, le mercure est un polluant très actif : il provoque une mort cellulaire et une modulation de la réponse immunitaire (aminopeptidases, phénoloxydase). Il serait donc intéressant de mener une expérience *in vivo* comme celle de l'atrazine avec du mercure pour étudier la toxicité chronique de ce composé. Ces résultats ont été confirmés par les expériences menées en cytométrie de flux et la recherche d'une activité de type PO en ELISA.

La cytométrie de flux est peu utilisée à l'heure actuelle dans le domaine de l'étude des invertébrés marins. Le choix de la méthode de mesure a permis de montrer ses avantages et inconvénients dans ce type de suivi : en effet, il apparaît qu'une difficulté importante pour ce genre d'analyse est l'état des cellules : suivant l'état de base des hémocytes, les résultats peuvent être différents et difficiles à interpréter. Cependant, elle permet justement de connaître l'état des individus : les analyses mettaient clairement en évidence les altérations des hémocytes pendant la période de fortes précipitations. La cytométrie de flux pourrait donc être adaptée comme un bon outil de surveillance de l'état des cellules, et cela pourrait intéresser en particulier les producteurs de savoir dans quel état physiologique se trouvent leurs animaux.

La forte variabilité inter-individuelle et inter-lots reste un problème majeur pour l'interprétation des résultats : afin de limiter ce problème, il faudrait concevoir de réaliser les expériences avec des animaux ayant la même origine génétique et élevés dans les mêmes conditions environnementales. Ceci pourrait diminuer la part de variabilité liée à l'environnement et à l'histoire différente des individus.

Une approche pourrait également être réalisée en cytofluorimétrie pour déterminer les flux de calcium dans les hémocytes et les cellules cardiaques. Un essai a été fait sur hémocytes, laissant entrevoir la présence de calcium dans ces cellules, et ouvrant donc des possibilités quant à l'étude de l'impact des polluants sur les flux de calcium intracellulaire.

- DYRYNDA, E. (1992). Incidence of abnormal shell thickening in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Poole Harbor (UK), subsequent to the 1987 TBT restrictions. *Marine Pollution Bulletin*, 324 (3) : 156-163.
- FISHER, W.S., WISHKOVSKY, A., et CHU, F-L.E. (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19 : 354-360.
- *GUTIERREZ-GALINDO, E.A., et BREITTMAYER, J.P. (1981). Effet du zinc sur l'accumulation du mercure par la moule *Mytilus edulis*. *Revue Internationale d'Océanographie Méd.* Tomes LXIII-LXIV.
- HIS, E., et SEAMAN, M.N.L. (1993). Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES C.M., Marine Environmental Quality Committee*.
- HIS, E., HEYVANG, I., GEFFARD, O., et DE MONTAUDOUIN, X. (1999). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research*, 33 (7) : 1706-1718.
- KLIGERMAN, A.D., DOERR, C.L., TENNANT, A.H., et ZUCKER, R.M. (2000). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. *In vitro* studies. *Mutation Research*, 465 : 53-59.
- LIOI, M.B., SCARFI, M.R., SANTORO, A., BARBIERI, R., ZENI, O., DI BERARDINO, D., et URSINI, M.V. (1998a). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research*, 403 : 13-20.
- LIOI, M.B., SCARFI, M.R., SANTORO, A., BARBIERI, R., ZENI, O., SALVEMINI, F., DI BERARDINO, D., et URSINI, M.V. (1998b). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32 : 39-46.
- MUNOZ, I., et ROSES, N. (2000). Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll., Gastropoda). *Water Research*, 34 (10) : 2846-2848.
- MUNSCHY, C. (1995). Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de 3^{ème} cycle, spécialité Océanologie, Météorologie et Environnement. Université Pierre et Marie Curie. 152 pp.
- NAJIMI, S., BOUHAIMI, A., DAUBEZE, M., ZEKHINI, A., PELLERIN, J., NARBONNE, J.F., et MOUKRIM, A. (1997). Use of Acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (south of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58 : 901-908.
- OUBELLA, R., et AUFFRET, M. (1995). Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Rade de Brest. *Acte de Rencontre Scientifique Internationale (Programme Rade de Brest)*, 1 : 307-319.
- OUBELLA, R. (1996). Réponses immunitaires chez les Mollusques bivalves. Effets de facteurs environnementaux sur le système de défense interne. Thèse de 3^{ème} cycle, Océanographie biologique. Université de Bretagne Occidentale (Brest), 152 pp.
- PIPE, R.K. (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal*, 22 : 595-603.
- PIPE, R.K., COLES, J.A., CARISSAN, F.M.M., et RAMANATHAN, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 46 : 43-54.
- RADENAC, G., FICHET, D., and MIRAMAND, P. (2001). Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Marine Environmental Research*, 51 : 151-166.
- RIVIERE, J.L. (2001). Ecotoxicologie et toxicologie des produits phytosanitaires. De l'obligation réglementaire à la surveillance des milieux. *XXXIème Congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP)*, ENS Lyon.

- ROBERT, R., HIS, E., et MAURER, D. (1986). Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis*, 15 : 319-325.
- ROSES, N., POQUET, M., et MUNOZ, I. (1999). Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. And *Ancylus fluviatis* Müll. Gastropoda). *Journal of Applied Toxicology*, 19 : 351-356.
- SCHLENCK, D., MARTINEZ, P.G., et LIVINGSTONE, D.R. (1991). Studies on myeloperoxidase activity in the commun mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99C (1/2) : 63-68.
- SKARPHEDINDOTTIR, H., OLAFSDOTTIR, K., SVAVARSSON, J., et JOHANNESSON, T. (1996). Seasonal fluctuations of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the blue mussel, *Mytilus edulis*, in Icelandic waters. *Marine Pollution Bulletin*, 32 (4) : 358-361.
- SMITH, V.J., et SÖDERHÄLL, K. (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 15 : 251-261.
- SMITH, V.J., and JOHNSTON, P.A. (1992). Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101 (3) : 641-649.
- SÖDERHÄLL, K., et SMITH, V.J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine Decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology*, 7 : 229-239.
- SÖDERHÄLL, K., et CERENIUS, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Innate immunity*, 23-28.
- SRITUNYALUCKSANA, K., CERENIUS, L., et SÖDERHÄLL, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 23 : 179-186.
- SUNG, H.H., CHANG, H.J., HER, C.H., CHANG, J.C., et SONG, Y.L. (1998). Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71 : 26-33.
- TANGUY, A., FERNANDEZ CASTRO, N., MARHIC, A., et MORAGA, D. (1999). Effects of an organic pollutant (Tributyltin) on genetic structure in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (7) : 550-559.
- TORREILLES, J., GUERIN, M.C., et ROCH, P. (1996). Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*, 319 : 209-218.
- TORREILLES, J., GUERIN, M.C., et ROCH, P. (1997). Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 21 (3) : 267-275.
- TRAORE, A., BONINI, M., DANO, S.D., et CREPPY, E.E. (1999). Synergistic effects of some metals contaminating mussels on the cytotoxicity of the marine toxin okadaic acid. *Archive of Toxicology*, 73 : 289-295.
- XUE, Q. (1998). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Bretagne Occidentale (Brest). 323 pp.
- XUE, Q., et RENAULT, T. (2000). Enzymatic activities in european flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76 : 155-163.
- ZAROOGIAN, G., et YEVICH, P. (1994). The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 37 : 355-373.

ANNEXE I: Composition du tampon cacodylate CAC, de la L-Dopa, du Davidson et du tampon de lyse

Tampon CAC :

- 0,01 M cacodylate de sodium (Cacodylat acid, sodium salt hydrate 98%, $C_2H_6AsO_2Na \cdot 3 H_2O$, 100 g, Sigma)
- 0,45 M NaCl (sodium chloride, NaCl, 1 kg, Sigma)
- 100 mM citrate de trisodium (Sodium citrate, trisodium salt dihydrate, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$, 500 g, Sigma)
- 10 mM $CaCl_2$ (Calcium chloride dihydrate, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 500 g, Sigma)
- 26 mM $MgCl_2$ (Magnesium chloride hexahydrate, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 500 g, Sigma)
- pH : 7,0

L-Dopa :

- 3 mg.mL⁻¹ de L-dihydrophénylalanine
- 10 mM $CaCl_2$
- 26 mM $Mg Cl_2$

Davidson :

- eau de mer filtrée : 1200 mL
- alcool à 95° : 1200 mL
- formol : 300 mL
- glycérine : 400 mL

Tampon de lyse :

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM
- Triton X100 0,2% (vol/vol)

ANNEXE II : Plan de préparation des microplaques pour la détection d'activité spontanée et stimulée dans les échantillons.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20 µL échantillon 1 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 1 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 1 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 1 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								
B	20 µL échantillon 2 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 2 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 2 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 2 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL de L-Dopa + 100 µL de CAC							
C	20 µL échantillon 3 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 3 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 3 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 3 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	120 µL de CAC							
D	20 µL échantillon 4 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 4 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 4 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 4 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								
E	20 µL échantillon 5 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 5 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 5 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 5 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								
F	20 µL échantillon 6 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 6 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 6 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 6 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								
G	20 µL échantillon 7 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 7 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 7 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 7 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								
H	20 µL échantillon 8 + 20 µL de L-Dopa + 80 µL de CAC	20 µL échantillon 8 + 100 µL de CAC	20 µL échantillon 8 + 20 µL de stimulant + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC	20 µL échantillon 8 + 20 µL de CAC + 20 µL L-Dopa + 60 µL de CAC								

Colonne A et B : activité spontanée

Colonne C et D : activité stimulée

Colonne E : ces deux puits sont les témoins de l'expérience, présents aussi bien pour l'activité spontanée que pour l'activité stimulée.

Activité spontanée : la L-Dopa est rajoutée au même moment dans tous les puits et le CAC est ajouté 30 minutes après l'ajout de L-Dopa.

Activité stimulée : la L-Dopa est ajoutée 20 minutes après l'ajout du stimulant ou CAC; le CAC est ajouté 30 minutes après l'ajout de L-Dopa.

Le blanc correspond à une mesure effectuée sur le puits ne contenant que du CAC. Cette valeur est automatiquement retranchée à tous les puits.

La valeur du puits L-Dopa + CAC est également retranchée à tous les puits où la L-Dopa est présente, de manière à tenir compte de l'oxydation spontanée de ce composé.

ANNEXE III : Préparation de la microplaque pour le dosage des protéines totales.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 100 µL réactif	90 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 10 µL H ₂ O + 100 µL réactif	80 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 20 µL H ₂ O + 100 µL réactif	70 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 30 µL H ₂ O + 100 µL réactif	60 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 40 µL H ₂ O + 100 µL réactif	50 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 50 µL H ₂ O + 100 µL réactif	40 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 60 µL H ₂ O + 100 µL réactif	30 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 70 µL H ₂ O + 100 µL réactif	20 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 80 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif		
B	5 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 95 µL H ₂ O + 100 µL réactif	2 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 98 µL H ₂ O + 100 µL réactif	1 µL de BSA 1 g.L ⁻¹ + 99 µL H ₂ O + 100 µL réactif	100 µL H ₂ O + 100 µL réactif								
C												
D	10 µL éch 1 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 2 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 3 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 4 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 5 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 6 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 7 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 8 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 9 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 10 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif		
E												
F	10 µL éch 1 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 2 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 3 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 4 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 5 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 6 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 7 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 8 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 9 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif	10 µL éch 10 + 90 µL H ₂ O + 100 µL réactif		
G												
H												

ANNEXE IV : Résultats atrazine *in vitro*

* Tableau A : moyennes et écart-types des expériences avec l'atrazine *in vitro* pour chaque paramètre testé, à chaque concentration utilisée et pour les deux temps de contact.

4h DMSO		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyali	% Granulo
Témoin	Moyenne	4,07	35,70	6,07	75,53	11,57	23,97	93,43	6,57
	Ecartype	1,99	20,51	3,32	5,48	5,51	9,43	3,82	3,82
2 mg.L ⁻¹	Moyenne	4,97	40,45	4,37	73,50	7,30	17,13	91,33	8,67
	Ecartype	4,01	7,99	3,41	2,86	3,60	6,59	4,84	4,84
20 mg.L ⁻¹	Moyenne	5,53	31,10	4,07	75,23	10,90	25,50	94,37	5,63
	Ecartype	5,61	14,00	4,59	7,05	5,38	18,71	2,58	2,58
200 mg.L ⁻¹	Moyenne	7,07	33,00	3,60	69,47	12,67	27,75	91,63	8,37
	Ecartype	6,96	14,57	0,40	14,33	5,35	16,62	5,66	5,66

24h DMSO		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyali	% Granulo
Témoin	Moyenne	30,77	1,00	2,87	14,57	10,50	20,90	87,47	12,53
	Ecartype	12,95	0,79	1,66	21,42	17,75	12,90	2,37	2,37
2 mg.L ⁻¹	Moyenne	31,07	0,63	3,03	20,10	16,27	23,43	86,70	13,97
	Ecartype	13,58	0,67	1,50	24,93	13,94	7,56	1,47	2,47
20 mg.L ⁻¹	Moyenne	22,23	2,93	2,67	14,33	6,43	14,33	89,80	10,20
	Ecartype	15,81	4,24	1,01	14,63	10,62	4,50	3,10	3,10
200 mg.L ⁻¹	Moyenne	30,03	0,90	1,83	22,73	38,57	30,00	70,00	30,00
	Ecartype	28,28	0,70	1,12	26,02	24,57	17,36	30,35	30,35

* Tableau B : Résultats des tests statistiques.

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl = nombre de concentrations - 1 = 4 - 1 = 3.

Valeur seuil : α^2 à 3 ddl, $\alpha (0,05) = 7,81$

Polluant	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
Atrazine	Mort 4h	1,1153	N
	Mort 24h	0,538	N
	Est 4h	1,73	N
	Est 24h	1,089	N
	Cath 4h	2,0769	N
	Cath 24h	2,3718	N
	AP 4h	0,538	N
	AP 24h	0,897	N
	Perox 4h	1,97	N
	Perox 24h	4,435	N
	Phago 4h	1,3589	N
	Phago 24h	2,589	N
	Hyalino 4h	1,5769	N
	Hyalino 24h	4,128	N

ANNEXE V : Effets des métaux lourds sur la mortalité.

* Tableau C : moyennes et écart-types des expériences avec les métaux *in vitro* pour la mortalité, à chaque concentration utilisée et pour les deux temps de contact.

T	Moyennes		Ecartypes	
	4h	24h	4h	24h
T	12,03	42,50	6,14	10,04
Cd 50 µg.L ⁻¹	13,80	38,07	6,27	5,57
Cd 100 µg.L ⁻¹	13,27	48,60	5,41	24,85
Cd 2 mg.L ⁻¹	19,53	44,67	8,15	6,62
Pb 100 µg.L ⁻¹	12,60	51,10	8,01	18,31
Pb 250 µg.L ⁻¹	12,63	54,23	5,93	20,38
Pb 2 mg.L ⁻¹	13,57	43,63	8,53	10,60
Hg 0,5 mg.L ⁻¹	12,63	44,07	8,96	23,39
Hg 5 mg.L ⁻¹	41,67	68,37	31,76	12,00
Hg 50 mg.L ⁻¹	87,27	70,83	13,91	5,83
TBT 5 µg.L ⁻¹	11,27	59,93	9,41	21,77
TBT 50 µg.L ⁻¹	19,03	61,53	19,08	18,13
TBT 500 µg.L ⁻¹	18,00	66,27	15,95	18,35

* Tableau D : essai avec les concentrations susceptibles de provoquer des effets sub-léthaux sur les activités immunitaires :

4h	Mortalité	Esterase	AP	Perox	Phago	Apoptose
Témoin	4,5	0,9	51,1	0,5	0,4	1,4
Cd 2 mg.L ⁻¹	5	1	56,2	1,9	1,1	1,2
Pb 2 mg.L ⁻¹	3,1	1,4	30,4	1,3	1,4	1,2

24h	Mortalité	Esterase	AP	Perox	Phago	Apoptose
Témoin	36,7	0,2	0,3	0,7	2,5	2,1
Cd 2 mg.L ⁻¹	57,9	0,2	0,2	0,2	0,5	1,3
Pb 2 mg.L ⁻¹	67,4	0,2	0,3	0,3	1,4	2,2

* Tableau E : résultats des tests statistiques.

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl=nombre de concentrations-1=4-1=3.

Valeur seuil : α^2 à 3 ddl, $\alpha (0,05) = 7,81$

Paramètre	Hc Kruskall	significatif
Cd 4h	2,487	N
Cd 24h	1,5128	N
Pb 4h	1,33	N
Pb 24h	1,256	N
Hg 4h	8,23	O (&=0,05)
Hg 24h	6,59	O (&=0,1)
TBT 4h	0,743	N
TBT 24h	3,2	N

ANNEXE VI : Résultats Mercure *in vitro*

*Tableau F : moyennes et écart-types des expériences avec le mercure *in vitro* pour chaque paramètre testé, à chaque concentration utilisée et pour les deux temps de contact.

4h		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyalino	% Granulo
Témoin	Moyenne	4,83	16,57	1,97	74,20	6,03	13,73	90,33	9,67
	Ecartype	1,77	13,97	0,42	9,56	2,40	16,61	6,12	6,12
0,5 mg.L ⁻¹	Moyenne	7,07	19,67	1,57	80,43	10,23	10,33	91,75	8,25
	Ecartype	3,27	12,65	1,03	4,63	9,62	6,65	6,15	6,15
5 mg.L ⁻¹	Moyenne	19,57	19,00	0,95	80,23	9,53	19,33	91,30	8,70
	Ecartype	11,91	8,81	0,49	6,67	4,92	19,57	6,02	6,02
50 mg.L ⁻¹	Moyenne	49,47	8,30	2,53	87,80	14,43	21,27	89,77	10,23
	Ecartype	19,46	7,75	1,17	3,44	11,83	16,45	8,44	8,44

24h		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyalino	% Granulo
Témoin	Moyenne	16,20	0,50	0,63	1,17	0,57	4,87	93,57	6,43
	Ecartype	17,03	0,44	0,21	1,50	0,55	3,30	3,54	3,54
0,5 mg.L ⁻¹	Moyenne	43,00	0,27	0,87	1,00	8,97	5,80	94,80	5,20
	Ecartype	23,74	0,06	0,31	1,21	14,32	4,81	0,72	0,72
5 mg.L ⁻¹	Moyenne	53,70	5,90	1,67	18,53	8,67	6,50	89,23	10,77
	Ecartype	30,45	7,65	0,96	31,15	7,49	2,83	4,36	4,36
50 mg.L ⁻¹	Moyenne	77,93	9,60	4,00	73,10	10,30	3,47	89,97	10,03
	Ecartype	16,88	8,36	2,74	15,73	6,02	0,75	5,65	5,65

*Tableaux G et H : résultats des tests statistiques.

-Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl = nombre de concentrations - 1 = 4 - 1 = 3.

Valeur seuil : α^2 à 3 ddl, $\alpha (0,05) = 7,81$. $\alpha (0,1) = 6,25$.

Polluant	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
Mercure	Mort 4h	8,23	O ($\alpha \neq 0,05$)
	Mort 24h	7,41	O ($\alpha \neq 0,1$)
	Est 4h	2,69	N
	Est 24h	3,29	N
	Cath 4h	4,628	N
	Cath 24h	6,69	N
	AP 4h	4,43	N
	AP 24h	6,32	O ($\alpha \neq 0,1$)
	Perox 4h	0,897	N
	Perox 24h	5,25	N
	Phago 4h	0,948	N
	Phago 24h	2,589	N
	Hyalino 4h	0,141	N
	Hyalino 24h	3,718	N

-SNK : valeurs seuils prises dans la table de l'étendue de Student :

pour 4 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 8, 4} = 4,529$

pour 3 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 8, 3} = 4,041$

pour 2 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 8, 2} = 3,261$

Paramètre	moyennes comparées	q _c	significatif
Mortalité 4h	x4-x1	7,096	O
	x4-x2	6,74	O
	x3-x1	2,34	N
	x4-x3	4,75	O
	x3-x2	-1,98	N
	x2-x1	0,356	N
Mortalité 24h	x4-x1	4,99	O
	x4-x2	2,82	N
	x3-x1	3,031	N
	x4-x3	1,958	N
	x3-x2	0,865	N
	x2-x1	2,166	N
AP 24h	x4-x1	7,57	O
	x4-x2	7,56	O
	x3-x1	1,84	N
	x4-x3	5,76	O
	x3-x2	1,82	N
	x2-x1	0,01	N

Décision : $x_1=x_2=x_3 < x_4$ pour mortalité 4h et AP 24h.

* Tableau I : résultats des tests statistiques pour les expériences en individuel.

Test non paramétrique de comparaison de moyennes de deux échantillons indépendants : test U de Mann et Whitney.

N=10 réplicats : $U_{\alpha/2} = 2$

Paramètre	U	significatif
Mortalité	0	Oui
AP	33	Non
cellules mortes +AP	48	Non
cellules vivantes +AP	16	Oui

ANNEXE VII : Résultats TBT *in vitro*

* Courbes :

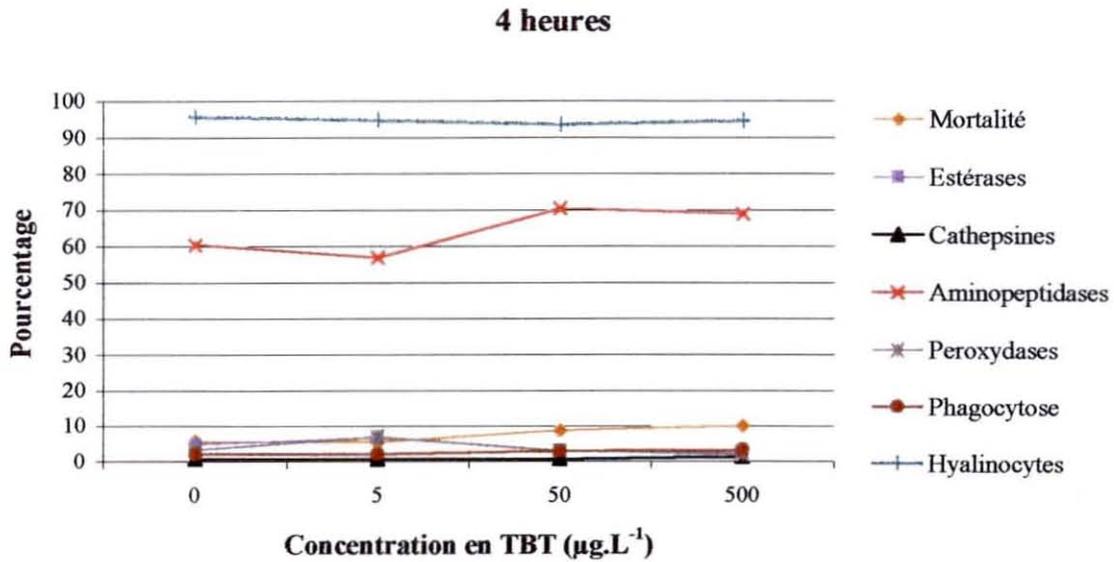


Figure VII.1 : évolution des paramètres immunitaires testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations de TBT *in vitro* (0-5-50-500 µg.L⁻¹) à l'issue de 4 heures d'incubation.

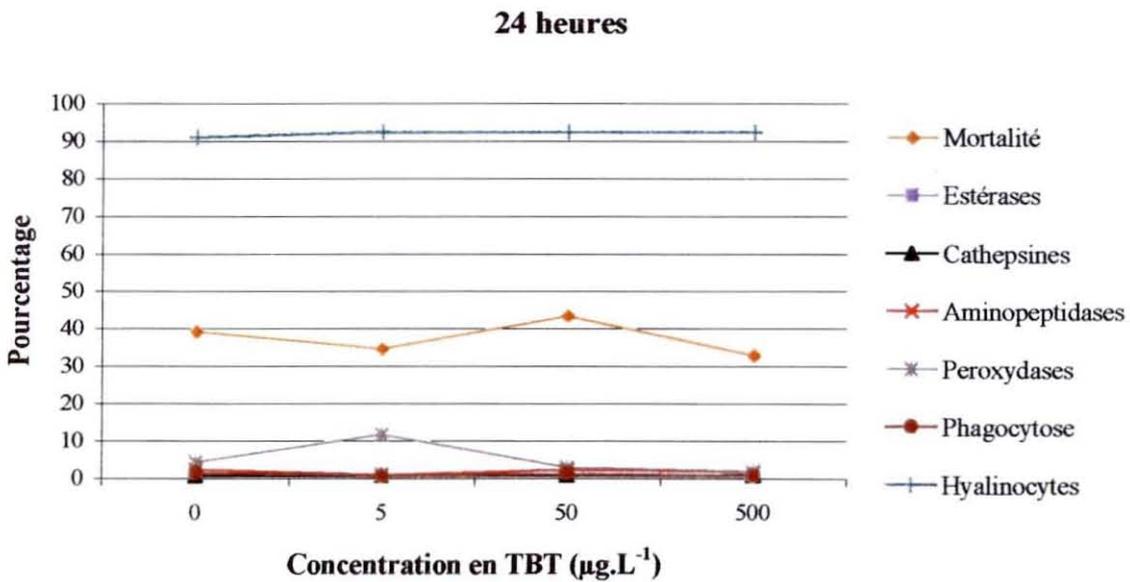


Figure VII.2 : évolution des paramètres immunitaires testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations de TBT *in vitro* (0-5-50-500 µg.L⁻¹) à l'issue de 24 heures d'incubation.

* Tableau J : moyennes et écart-types des expériences avec le TBT *in vitro* pour chaque paramètre testé, à chaque concentration utilisée et pour les deux temps de contact.

4h		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyalino	% Granulo
Témoin	Moyenne	5,93	4,93	0,70	60,47	3,43	2,10	95,73	4,27
	Ecartype	5,38	1,86	0,20	11,43	1,91	0,46	0,95	0,95
5 µg.L ⁻¹	Moyenne	5,73	7,00	0,57	57,07	7,20	2,23	94,83	5,17
	Ecartype	4,79	4,92	0,21	21,90	7,38	0,71	3,07	3,07
50 µg.L ⁻¹	Moyenne	8,93	3,33	0,67	70,60	3,23	3,03	93,63	6,37
	Ecartype	7,93	2,62	0,21	1,14	0,72	1,32	2,56	2,56
500 µg.L ⁻¹	Moyenne	10,20	2,43	1,30	69,03	1,93	3,50	94,73	5,27
	Ecartype	7,94	2,01	0,70	14,31	1,79	1,95	2,03	2,03

24h		Viabilité % cellules mortes	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres (peroxydase) % cellules +	Phagocytose % cellules actives	Hémolymphe seule	
			Estérase % cellules +	Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +			% Hyalino	% Granulo
Témoin	Moyenne	39,10	0,93	0,53	2,33	4,40	1,23	90,93	9,07
	Ecartype	41,07	0,67	0,15	1,84	6,84	0,81	4,27	4,27
5 µg.L ⁻¹	Moyenne	34,63	0,60	0,73	0,93	11,77	0,57	92,47	7,53
	Ecartype	38,36	0,61	0,25	0,87	20,03	0,64	2,46	2,46
50 µg.L ⁻¹	Moyenne	43,40	0,60	0,70	2,27	3,00	1,17	92,30	7,70
	Ecartype	26,82	0,61	0,36	3,58	4,11	1,42	1,71	1,71
500 µg.L ⁻¹	Moyenne	32,80	0,87	0,77	1,83	1,97	0,57	92,30	7,70
	Ecartype	36,33	0,99	0,47	2,49	3,06	0,15	1,85	1,85

* Tableau K : résultats des tests statistiques.

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl=nombre de concentrations-1=4-1=3.

Valeur seuil : α^2 à 3 ddl, $\alpha (0,05) = 7,81$

Polluant	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
TBT	Mort 4h	1,269	N
	Mort 24h	0,7435	N
	Est 4h	3,782	N
	Est 24h	1,73	N
	Cath 4h	4,87	N
	Cath 24h	0,859	N
	AP 4h	3,359	N
	AP 24h	0,6154	N
	Perox 4h	1,6	N
	Perox 24h	0,641	N
	Phago 4h	1,1154	N
	Phago 24h	1,654	N
	Hyalino 4h	1,628	N
	Hyalino 24h	0,1154	N

ANNEXE VIII : Résultats atrazine *in vivo*

* **Tableau L** : moyennes et écart-types des expériences avec l'atrazine *in vivo* pour chaque paramètre testé, à chaque concentration utilisée et pour les deux expériences réalisées.

			Viabilité	Cycle cellulaire			% cellules 4n	Enzymes lysosomiales			Radicaux libres	Phagocytose	Hémolymphé seule	
			% cellules mortes	% cellules 1n	% cellules 2n	Estérase % cellules +		Cathepsine % cellules +	Amino-peptidase % cellules +	(peroxydase) % cellules +	% cellules actives	% Hyalino	% Granulo	
1 ^{ère} exp	T=0	Moyenne	3,72	11,02	79,58	9,40	77,50	2,98	90,67	47,68	18,18	81,18	18,83	
		Ecart-type	1,49	4,31	4,63	2,45	8,65	0,97	3,13	5,96	3,39	3,62	3,62	
	T=3 semaines	Moyenne 0	6,20	19,75	59,70	20,55	46,65	2,85	91,90	28,30	30,50	90,85	9,15	
		Moyenne 0,01	5,70	28,10	54,30	17,60	50,60	1,40	91,00	30,80	30,70	94,15	5,85	
		Moyenne 0,1	6,10	11,30	48,70	40,00	57,60	0,95	92,25	31,00	31,00	91,20	8,80	
		Ecart-type 0	-	12,23	3,96	8,27	6,29	2,33	3,11	7,07	2,12	2,47	2,47	
Ecart-type 0,01	-	4,95	10,04	5,09	1,13	0,14	0,99	4,67	4,81	0,78	0,78			
Ecart-type 0,1	-	3,54	10,61	14,14	11,17	0,35	0,92	1,84	1,84	1,84	1,84			
2 ^{ème} exp	T=0	Moyenne	-	-	-	-	12,73	1,90	78,36	35,36	28,72	96,14	3,86	
		Ecart-type	-	-	-	-	4,31	1,81	5,26	10,88	23,68	0,90	0,90	
	T=3 semaines	Moyenne 0	15,05	27,45	29,15	43,40	-	0,50	45,55	18,95	4,25	91,20	8,80	
		Moyenne 0,01	20,20	14,55	26,20	59,25	-	0,55	69,90	4,05	1,90	88,85	11,15	
		Moyenne 0,1	19,75	22,00	34,60	43,40	-	0,45	76,80	7,45	2,45	89,95	10,05	
		Ecart-type 0	9,69	20,15	22,13	42,28	-	0,14	37,55	6,58	2,90	2,12	2,12	
Ecart-type 0,01	14,85	12,80	4,53	8,27	-	0,35	-	-	-	-	-			
Ecart-type 0,1	10,96	14,99	16,26	31,25	-	0,07	5,09	6,15	2,90	6,43	6,43			

* **Tableau M** : résultats des test statistiques.

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl=nombre de concentrations-1=4-1=3.

Valeur seuil : α^2 à 3 ddl, $\alpha (0,05) = 7,81$

Polluant	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
Atra <i>in vivo</i>	Mort 1er exp	-	N
	Mort 2e exp	0,857	N
	Cell 1n 1er exp	2,57	N
	Cell 1n 2e exp	2,57	N
	Cell 2n 1er exp	2,57	N
	Cell 2n 2e exp	0,857	N
	Cell 4n 1er exp	3,7	N
	Cell 4n 2e exp	0	N
	Est 1er exp	0,857	N
	Est 2e exp	-	N
	Cath 1er exp	2,64	N
	Cath 2e exp	0,071	N
	AP 1er exp	0,285	N
	AP 2e exp	3,71	N
	Perox 1er exp	0,285	N
	Perox 2e exp	3,42	N
	Phago 1er exp	0,285	N
	Phago 2e exp	2	N
	Hyalino 1er exp	3,42	N
	Hyalino 2e exp	0,28	N
	Mort	0,088	N
	cell 1n	0,346	N
	cell 2n	0,269	N
	cell 4n	0,807	N
	Est	0,857	N
	Cath	0,73	N
	AP	0,269	N
	Perox	0,269	N
	Phago	0,154	N
	Hyalino	0,461	N

ANNEXE IX : Résultats de l'activité de type PO dans les échantillons stimulés ou non.
 * Courbes :

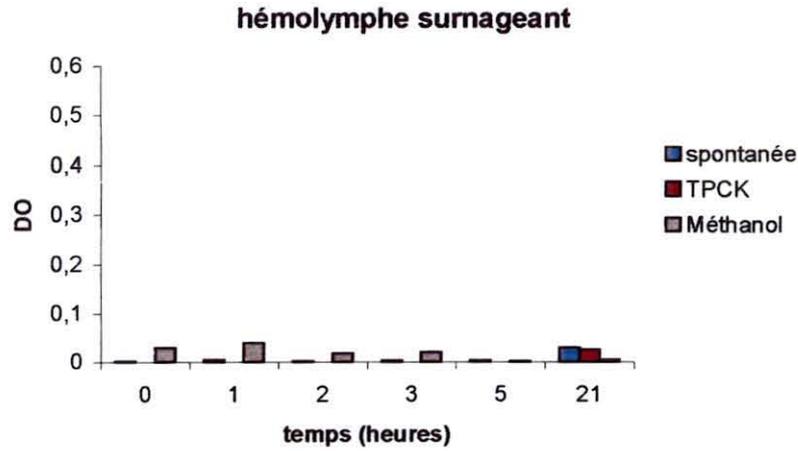


Figure IX.1 : Evolution de la DO en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe.

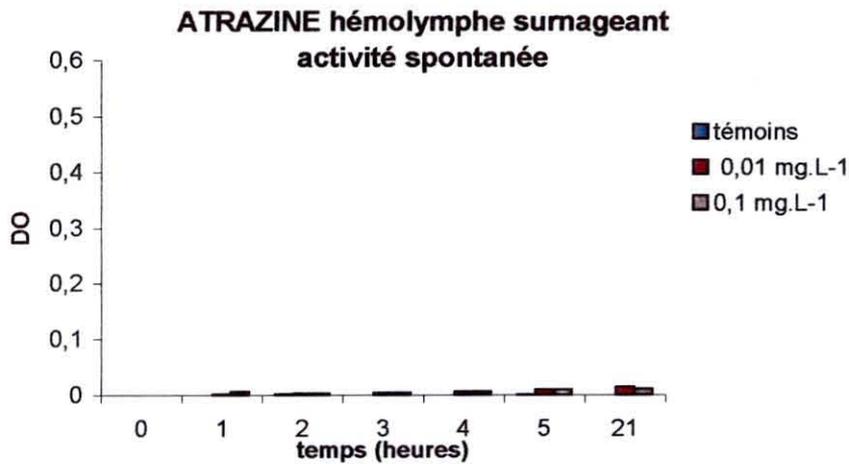


Figure IX.2 : Evolution de la DO spontanée en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

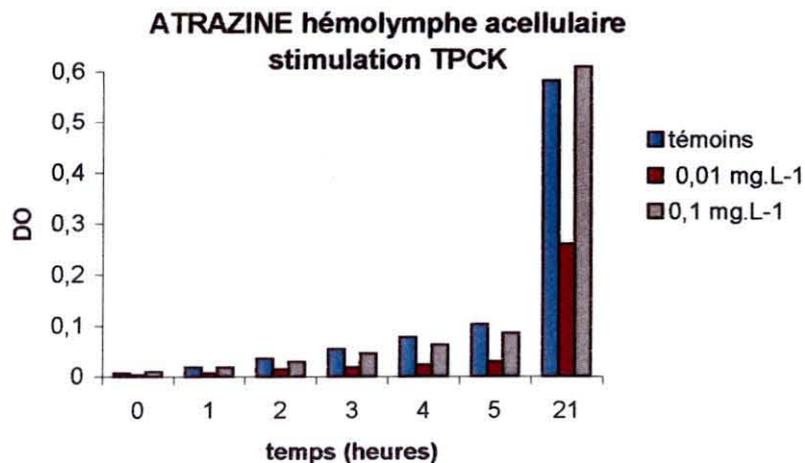


Figure IX.3 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en fonction du temps dans l'hémolymphe acellulaire des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

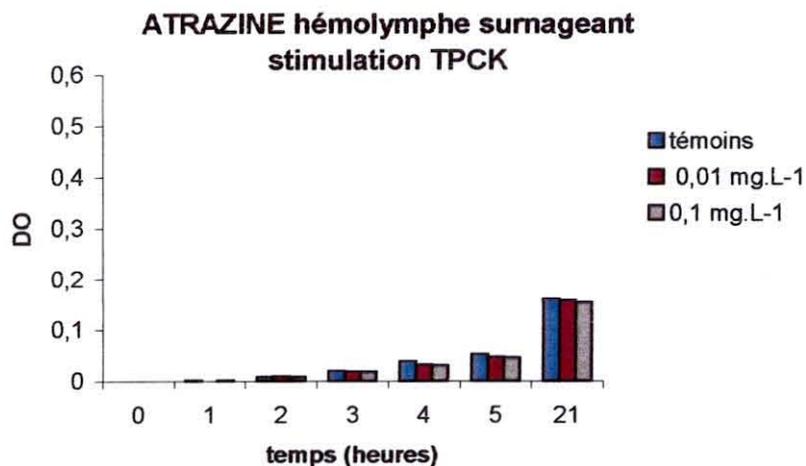


Figure IX.4 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

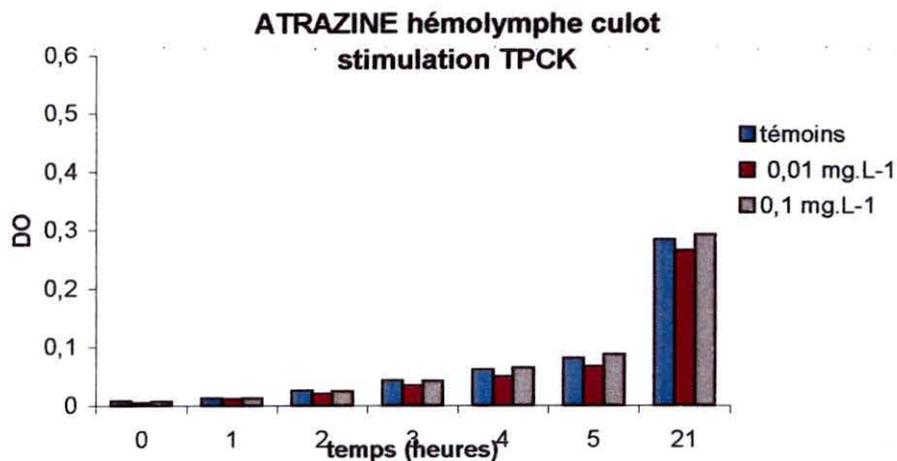


Figure IX.5 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en fonction du temps dans le culot d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

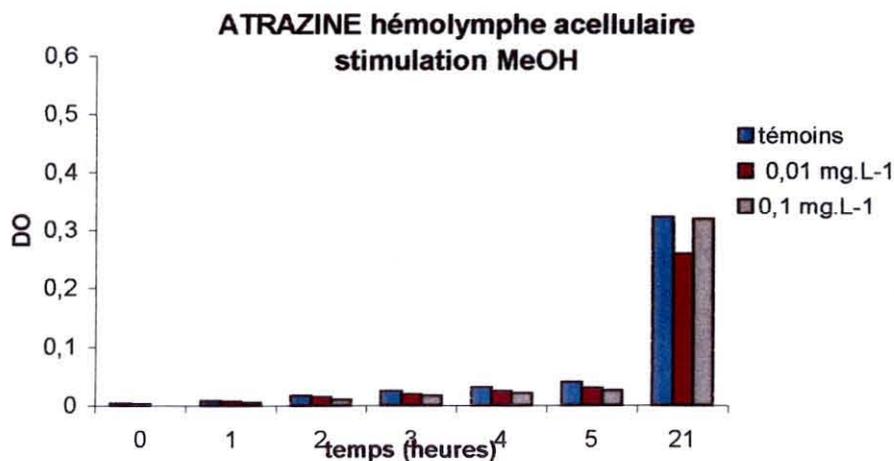


Figure IX.6 : Evolution de la DO stimulée par le méthanol en fonction du temps dans l'hémolymphe acellulaire des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

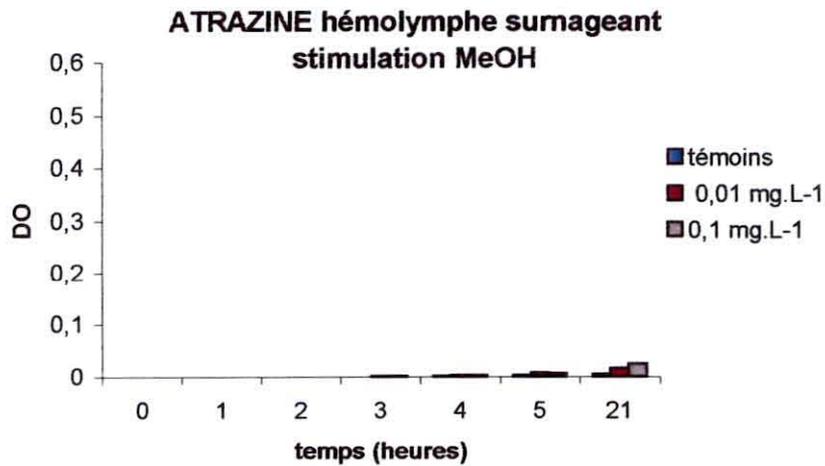


Figure IX.7 : Evolution de la DO stimulée par le méthanol en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

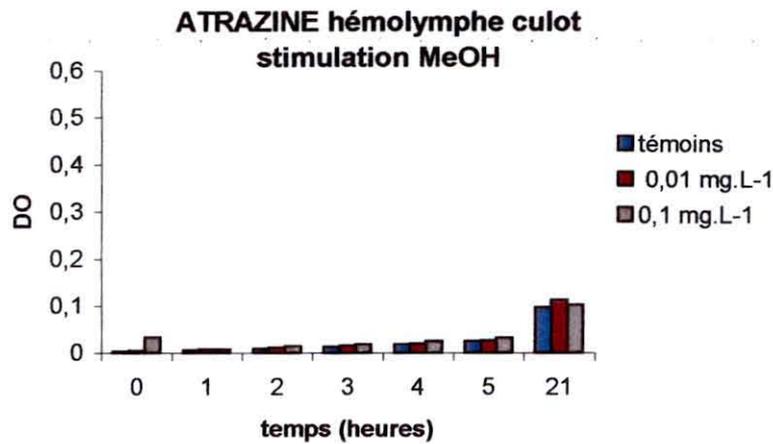


Figure IX.8 : Evolution de la DO stimulée par le méthanol en fonction du temps dans le culot d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

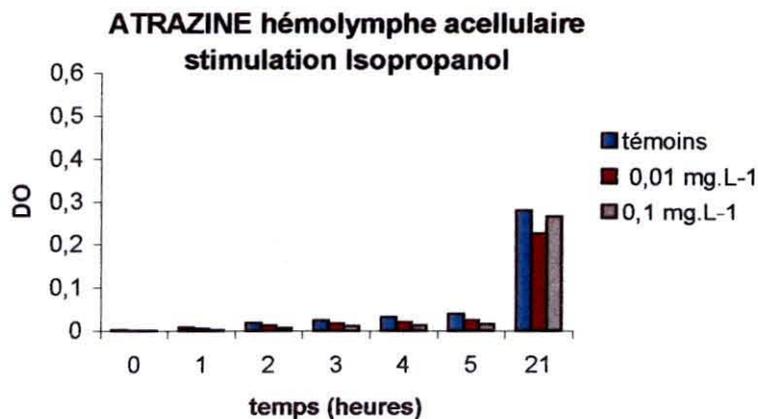


Figure IX.9 : Evolution de la DO stimulée par l'isopropanol en fonction du temps dans l'hémolymphe acellulaire des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

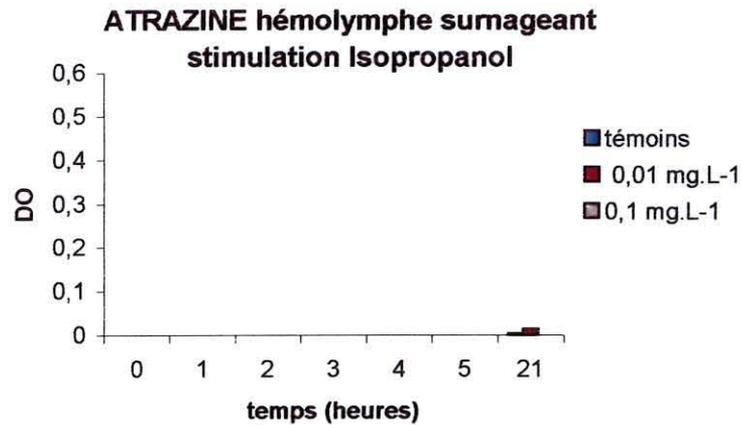


Figure IX.10 : Evolution de la DO stimulée par l'isopropanol en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

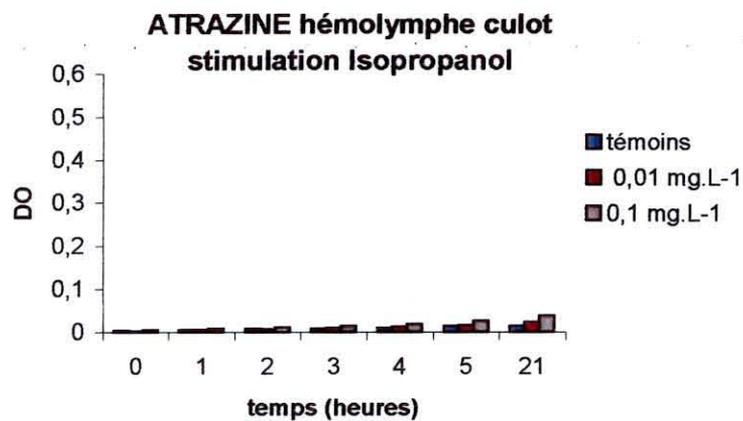


Figure IX.11 : Evolution de la DO stimulée par l'isopropanol en fonction du temps dans le culot d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

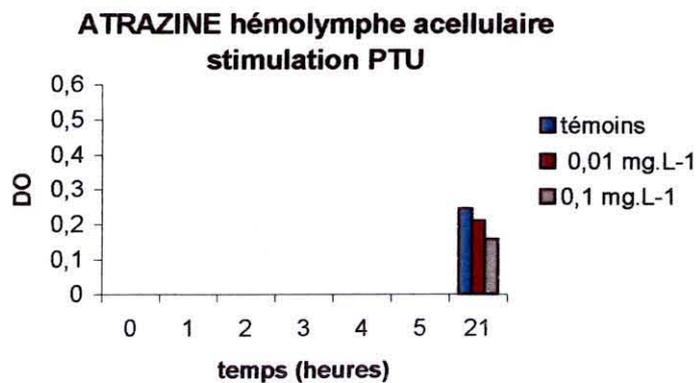


Figure IX.12 : Evolution de la DO inhibée par la PTU en fonction du temps dans l'hémolymphe acellulaire des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

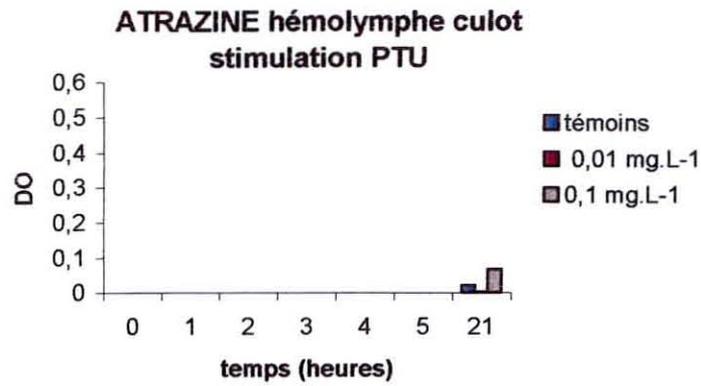


Figure IX.13 : Evolution de la DO inhibée par la PTU en fonction du temps dans le culot d'hémolymphe des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

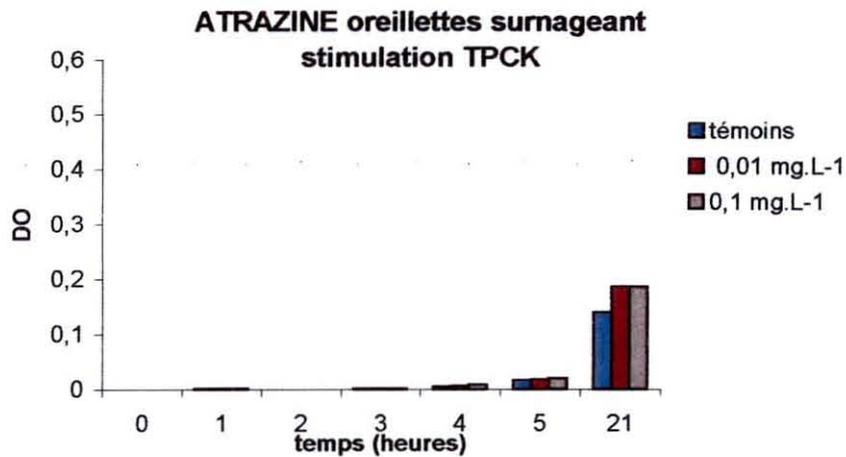


Figure IX.14 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en fonction du temps dans le surnageant d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

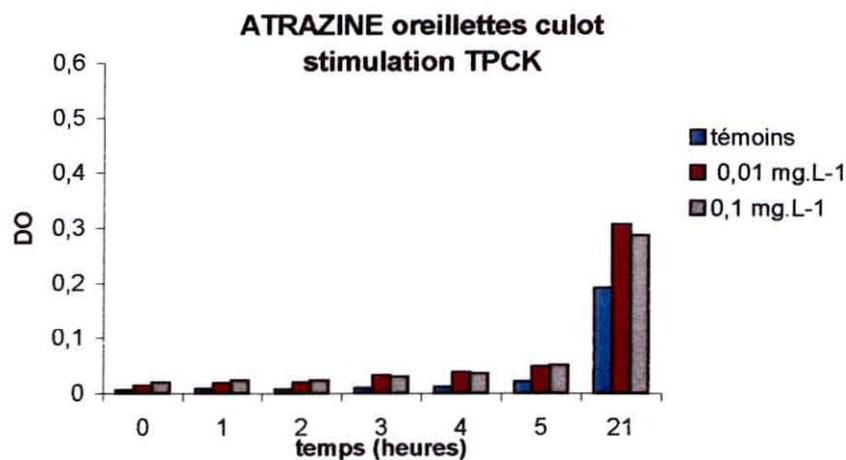


Figure IX.15 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en fonction du temps dans le culot d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

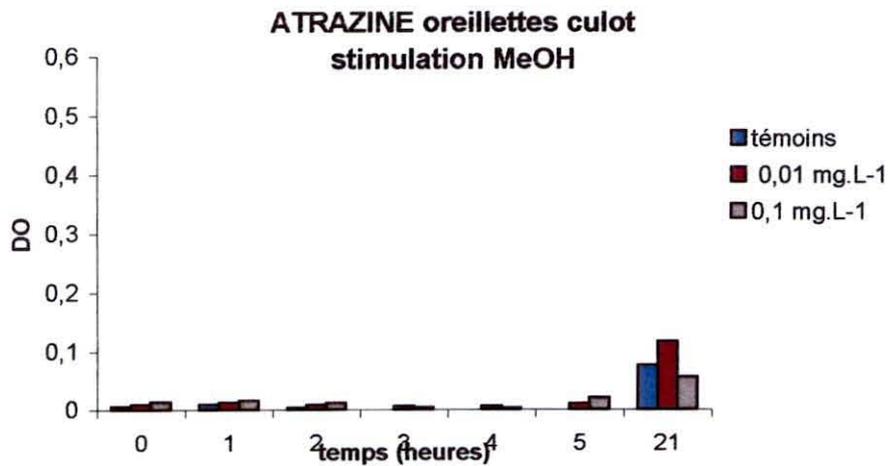


Figure IX.16 : Evolution de la DO stimulée par le méthanol en fonction du temps dans le culot d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

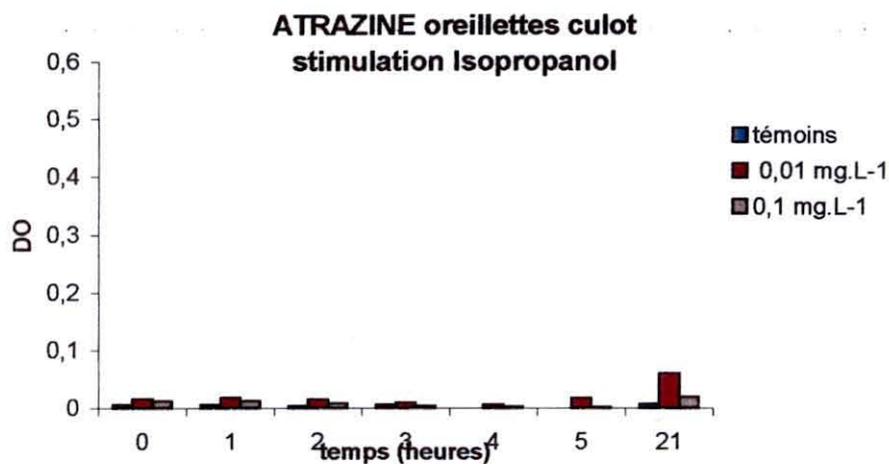


Figure IX.17 : Evolution de la DO stimulée par l'isopropanol en fonction du temps dans le culot d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

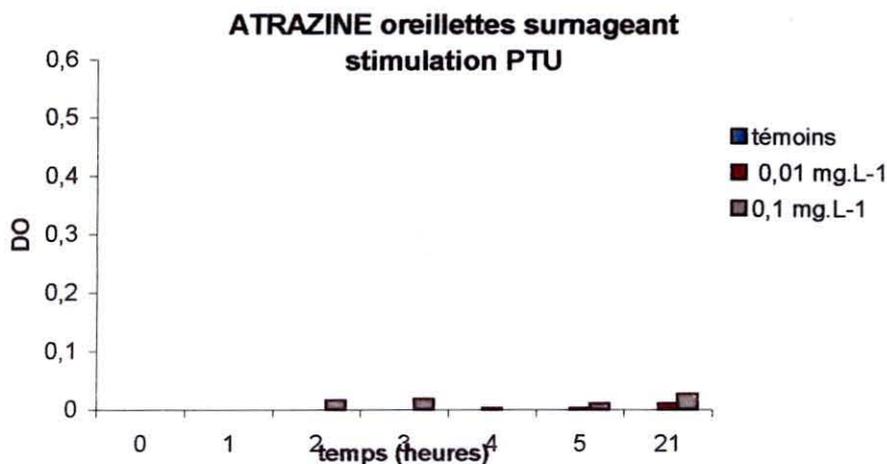


Figure IX.18 : Evolution de la DO inhibée par la PTU en fonction du temps dans le surnageant d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

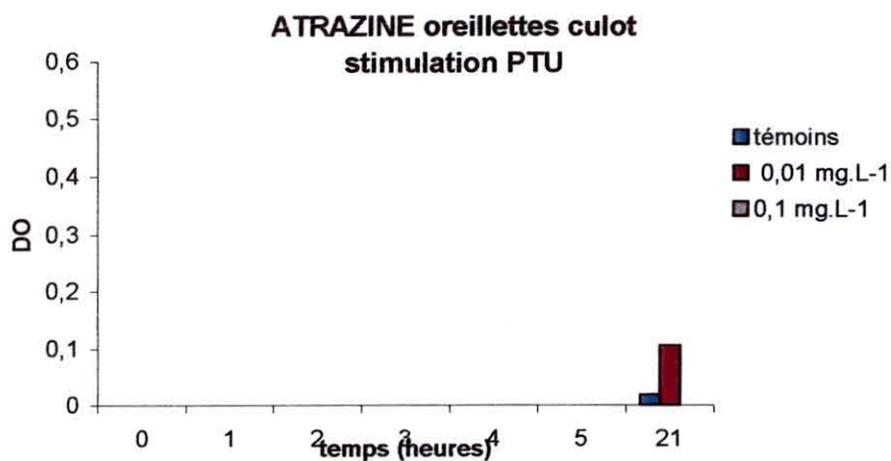


Figure IX.19 : Evolution de la DO inhibée par la PTU en fonction du temps dans le culot d'oreillettes des animaux ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines.

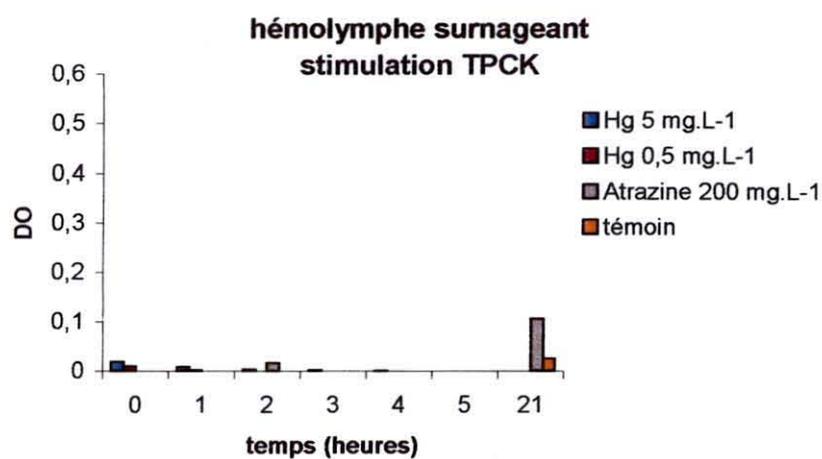


Figure IX.20 : Evolution de la DO stimulée par la TPCK en présence de polluants en fonction du temps dans le surnageant d'hémolymphe des animaux n'ayant reçu aucun traitement.

* Tableau N et O : résultats des test statistiques : évolution de l'activité PO dans les différentes fractions ayant reçu l'atrazine pendant 3 semaines testée avec différents activateurs.

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl=nombre de concentrations-1=4-1=3.

Valeur seuil : χ^2 à 2 ddl, $\alpha (0,05) = 5,99$

PO	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
atra in vivo	or S spont	0,413	N
	or C spont	2,49	N
	or S MeOH	0	N
	or C MeOH	4,15	N
	or S Iso	0	N
	or C Iso	0,73	N
	or S TPCK	2,42	N
	or C TPCK	0,04	N
	or S PTU	0,355	N
	or C PTU	2,49	N
	H acR spont	0,461	N
	or S spont	0,125	N
	or C spont	4,26	N
	H acR MeOH	1,5	N
	or S MeOH	0,894	N
	or C MeOH	0,067	N
	H acR Iso	4,02	N
	or S Iso	0,0384	N
	or C Iso	1,007	N
	H acR TPCK	1,65	N
	or S TPCK	2,92	N
	or C TPCK	2,88	N
	H acR PTU	0,115	N
	or S PTU	1,038	N
	or C PTU	3,5	N

PO	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
Protéines totales	or S spont	2,21	N
	or C spont	4,57	N
	or S MeOH	0	N
	or C MeOH	3,71	N
	or S Iso	0	N
	or C Iso	0,071	N
	or S TPCK	0,85	N
	or C TPCK	3,71	N
	or S PTU	0,28	N
	or C PTU	0,928	N
	H acR spont	1,14	N
	or S spont	0,28	N
	or C spont	3,42	N
	H acR MeOH	3,42	N
	or S MeOH	0	N
	or C MeOH	2	N
	H acR Iso	3,42	N
	or S Iso	0,28	N
	or C Iso	0,28	N
	H acR TPCK	4,57	N
	or S TPCK	1,14	N
	or C TPCK	1,14	N
	H acR PTU	1,14	N
	or S PTU	0	N
	or C PTU	3,42	N

ERRATUM : RAJOUT D'UN TEST STATISTIQUE (A INCLURE DANS L'ANNEXE IX)

Résultats statistiques :

Activation de l'activité PO par les différents activateurs : TPCK, méthanol, Isopropanol, PTU

Kruskall-Wallis : test du χ^2 à n ddl : nombre de ddl=nombre de paramètres-1=5-1=4.

Valeur seuil : α^2 à 4 ddl, $\alpha (0,05) = 9,49$; $\alpha (0,1) = 7,78$.

PO	Paramètre	Hc Kruskall	significatif
stimulation	H acR témoins	15,15	O (&=0,05)
	H acR 0,01	9,63	O (&=0,05)
	H acR 0,1	8,25	O (&=0,1)
	H S témoins	13,3	O (&=0,05)
	H S 0,01	13,94	O (&=0,05)
	H S 0,1	15,4	O (&=0,05)
	H C témoins	13,47	O (&=0,05)
	H C 0,01	14,75	O (&=0,05)
	H C 0,1	13,07	O (&=0,05)
	or S témoins	11,13	O (&=0,05)
	or S 0,01	9,54	O (&=0,05)
	or S 0,1	12,26	O (&=0,05)
	or C témoins	3,1	N
	or C 0,01	5,75	N
or C 0,1	3,36	N	

Test SNK : valeurs seuils prises dans la table de l'étendue de Student :

pour 5 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 15, 5} = 4,367$

pour 4 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 15, 4} = 4,076$

pour 3 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 15, 3} = 3,674$

pour 2 moyennes : $q_{\alpha, v, k} = q_{0,05, 15, 2} = 3,014$

La majorité des tests donne le résultat suivant (sauf pour H acR 0,1, HS 0,01, HC témoins, HC 0,1, or S 0,01):

$x_1 < x_2 = x_3 = x_4 < x_5$

où x_5 correspond à la moyenne de la TPCK, x_1 à celle de la PTU et x_2, x_3 et x_4 aux autres (spontanée, méthanol, isopropanol).

Les autres tests donnent :

$x_1 = x_2 = x_3 = x_4 < x_5$

sauf HC témoins et or S 0,01 qui ne montrent pas de différence.

ANNEXE X : résultats protéines totales

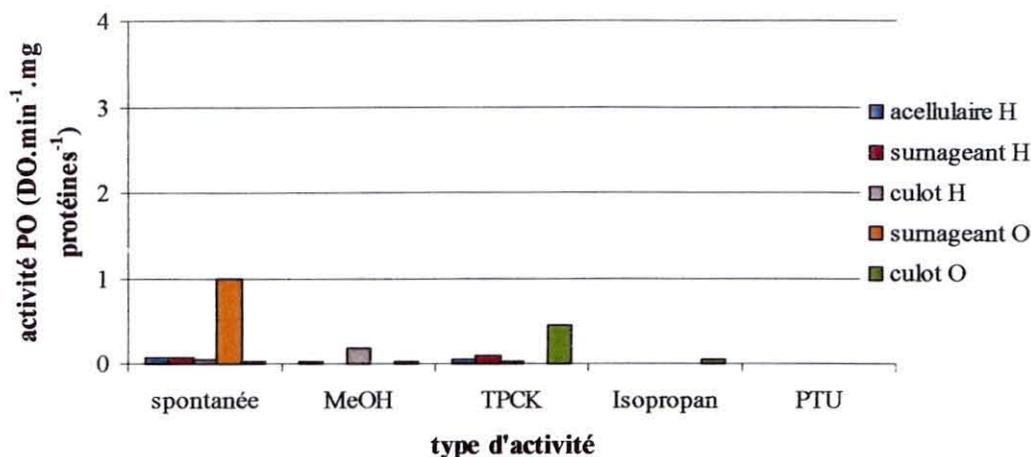


Figure X.1 : activité PO dans les différentes fractions en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction des activateurs utilisés.

Hémolymphe acellulaire

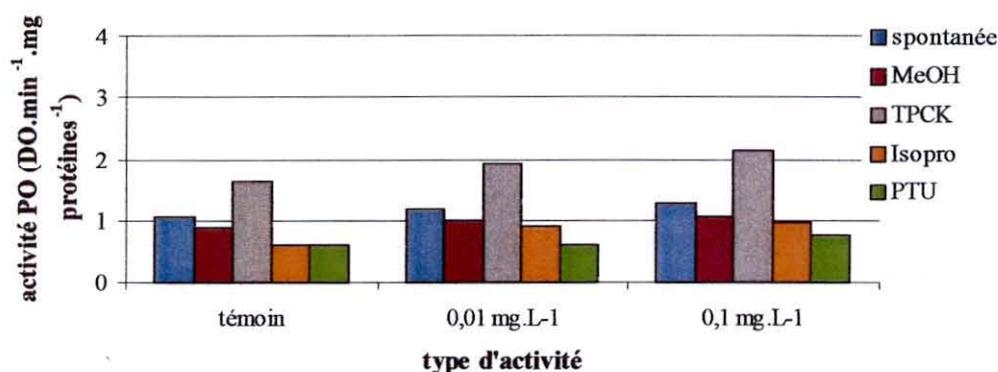


Figure X.2 : activité PO dans la fraction hémolymphe acellulaire en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction de la concentration en atrazine.

Hémolymphe surnageant

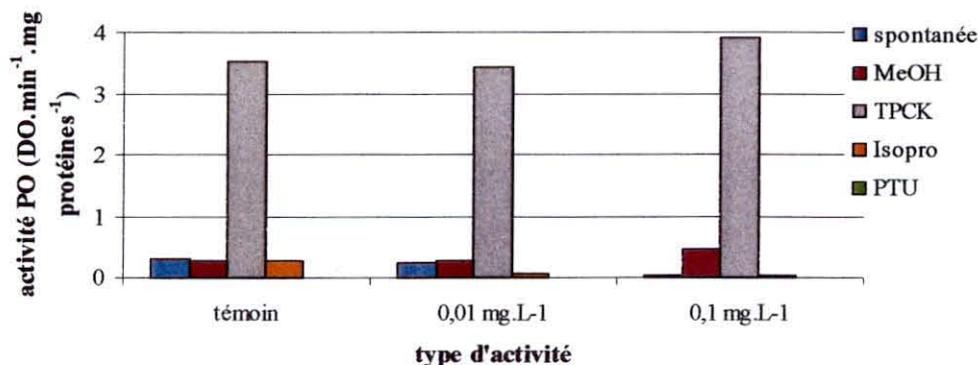


Figure X.3 : activité PO dans la fraction hémolymphe surnageant en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction de la concentration en atrazine.

Hémolymphe culot

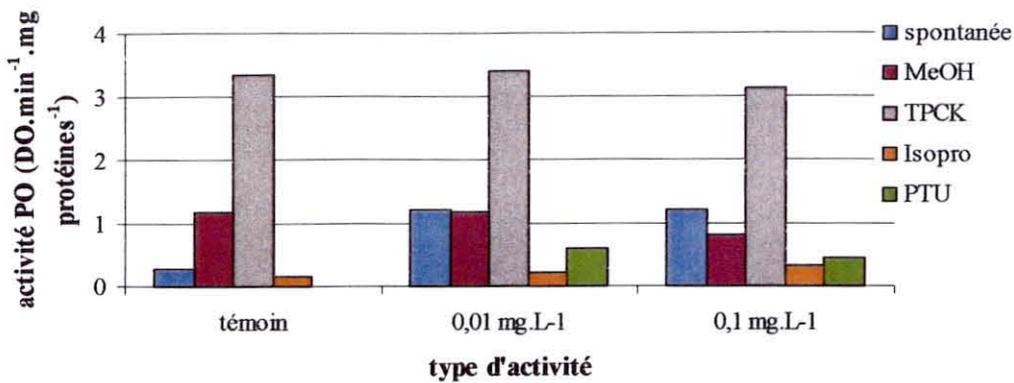


Figure X.4 : activité PO dans la fraction hémolymphe culot en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction de la concentration en atrazine.

Oreillettes surnageant

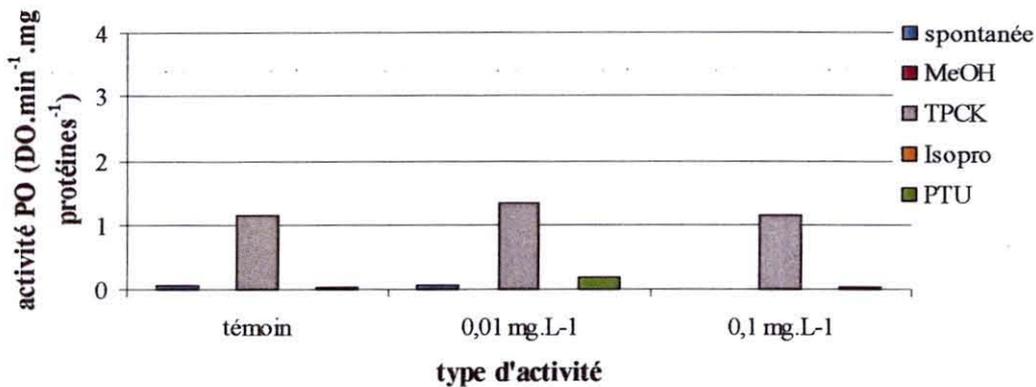


Figure X.5 : activité PO dans la fraction oreillettes surnageant en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction de la concentration en atrazine.

Oreillettes culot

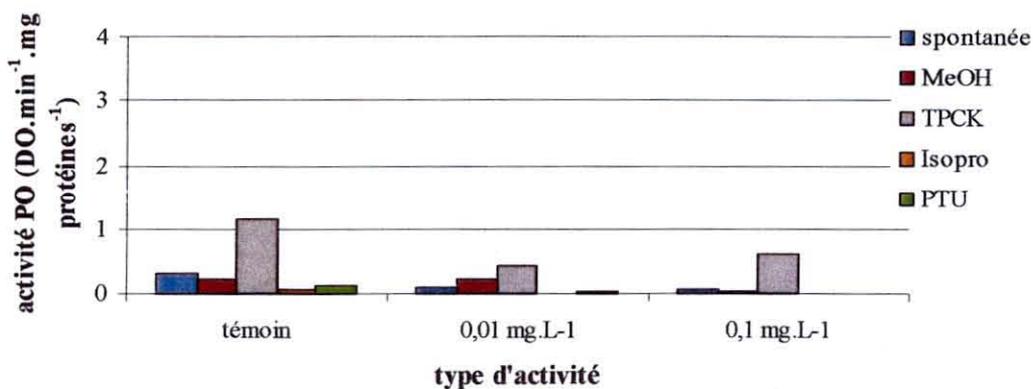


Figure X.6 : activité PO dans la fraction oreillettes culot en DO.min⁻¹.mg protéines⁻¹ en fonction de la concentration en atrazine.

ANNEXE XI : RÉSUMÉ DES COMMUNICATIONS ÉCRITES ET PAR AFFICHES

- Poster présenté au 31^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP) à l'ENS Lyon les 15-16-17 mai 2001.

Titre : **Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*.**

Poster accompagné d'une présentation orale de 5 minutes.

Le fichier est joint ci-après.

- Publication (en cours de rédaction).

Titre (provisoire): ***In vitro* effects of several micropolluants on Japanese oyster *Crassostrea gigas* haemocytes.**

- Poster présenté au Colloque d'Immunologie des Invertébrés qui aura lieu à Villeneuve d'Ascq du 11 au 14 septembre 2001.

Titre : **Recherche *in vitro* d'effets biologiques de différents micropolluants sur les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.**

Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*



B. Gagnaire^{1,2}, T. Renault¹, H. Thomas-Guyon², S. Lapègue¹, K. Bouilly¹, A. Gérard¹, P. Miramand²



¹Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade
²Laboratoire de Biologie et d'Environnement Marin, La Rochelle

Introduction:

La conchyliculture représente une activité à haute importance économique en France et tout particulièrement dans le bassin de Marennes-Oléron : ce bassin est l'un des premiers producteurs d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : 30 000 tonnes par an, soit 20 % de la production nationale (150 000 tonnes par an).

Cette zone d'élevage reçoit les apports de rivières transportant de nombreux polluants, notamment les produits issus de l'agriculture. L'atrazine, un désherbant introduit massivement durant ces dernières années, fait partie de ces produits. Elle est principalement utilisée sur les cultures de céréales. Absorbée par les racines, elle provoque une inhibition puissante du photosystème II, maillon central de la photosynthèse chez tous les organismes autotrophes et notamment le phytoplancton.

Les huîtres sont particulièrement sensibles aux pollutions car elles peuvent concentrer les produits toxiques par filtration de l'eau. Dans ce contexte, l'influence de l'atrazine sur les mécanismes de défense développés par l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, a été testée.

Matériel et Méthodes :

L'atrazine a été testée d'une part *in vitro* sur des hémocytes d'huître creuse, cellules du système immunitaire, en utilisant plusieurs concentrations (2, 20 et 200 mg.L⁻¹) et différents temps de contact (4 et 24 heures). D'autre part, le même composé a également été utilisé dans des expériences *in vivo* : dans ce cas, des huîtres de deux ans ont été mises en contact avec deux concentrations d'atrazine (0,01 et 0,1 mg.L⁻¹) pendant deux mois. Dans les deux types d'expériences, les hémocytes ont été analysés en cytométrie de flux à l'aide d'un EPICS XL (Beckman Coulter). La viabilité ainsi que différentes activités cellulaires (phagocytose, recherche d'enzymes lysosomiales, cycle cellulaire) ont été déterminées.

Afin de valider la technique, des expériences ont été réalisées *in vitro* en mettant en contact les hémocytes avec du mercure aux concentrations 0,5, 5, 50 mg.L⁻¹. Ce polluant a été choisi du fait de sa forte toxicité.

Résultats:

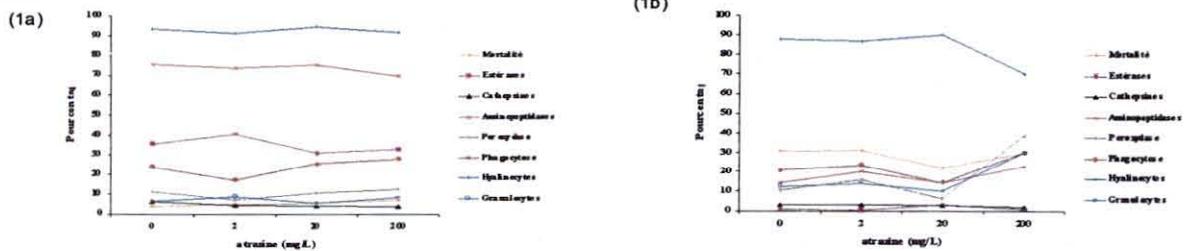


Figure 1 : Evolution des différents paramètres évalués en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations d'atrazine (*in vitro* (2, 20 et 200 mg.L⁻¹) et du temps de contact : 1a : 4h de contact; 1b : 24 h de contact.

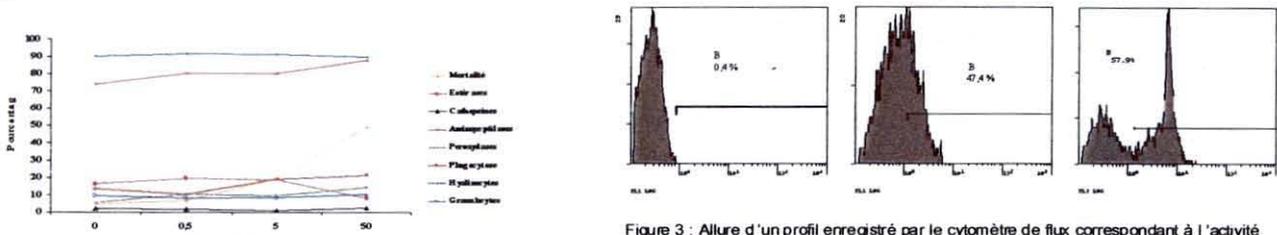


Figure 2 : Evolution des différents paramètres évalués en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations de mercure *in vitro* (0,5, 5 et 50 mg.L⁻¹) après 4h de contact.

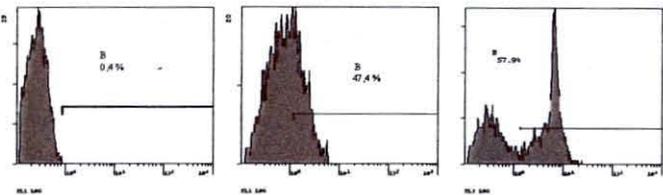


Figure 3 : Allure d'un profil enregistré par le cytomètre de flux correspondant à l'activité peroxylase à 24h pour le témoin (à gauche) et à la concentration 200 mg.L⁻¹ (au milieu); le profil de droite correspond à la mortalité à 4h avec du mercure à la concentration 50 mg.L⁻¹. Le pic de fluorescence en FL1 indique la présence d'enzyme et le pic en FL3 indique la mortalité.

Témoin	Cycle cellulaire		
	% cellules 1n	% cellules 2n	% cellules 4n
Moyenne	11,02	79,58	9,4
Ecart-type	4,31	4,63	2,45

Tableau A : Pourcentages des différentes cellules pour les animaux témoins n'ayant reçu aucune dose d'atrazine, les cellules 2n sont majoritaires.

Expérience 1 3 semaines	Concentration en atrazine	Cycle cellulaire		
		% cellules 1n	% cellules 2n	% cellules 4n
Moyenne	0 mg.L ⁻¹	19,75	59,70	20,55
	0,01 mg.L ⁻¹	28,10	54,30	17,60
	0,1 mg.L ⁻¹	11,30	48,70	40,00
Ecart-type	0 mg.L ⁻¹	12,23	3,96	8,27
	0,01 mg.L ⁻¹	4,95	10,04	5,09
	0,1 mg.L ⁻¹	14,99	16,26	31,25

Tableau B : Pourcentages des différentes cellules pour les animaux de l'expérience 1 ayant reçu les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

Expérience 2 3 semaines	Concentration en atrazine	Cycle cellulaire		
		% cellules 1n	% cellules 2n	% cellules 4n
Moyenne	0 mg.L ⁻¹	27,45	29,15	43,40
	0,01 mg.L ⁻¹	14,55	26,20	59,25
	0,1 mg.L ⁻¹	22,00	34,60	43,40
Ecart-type	0 mg.L ⁻¹	20,15	22,13	42,28
	0,01 mg.L ⁻¹	12,80	4,53	8,27
	0,1 mg.L ⁻¹	3,54	10,61	14,14

Tableau C : Pourcentages des différentes cellules pour les animaux de l'expérience 2 ayant reçu les deux concentrations d'atrazine pendant 3 semaines.

Conclusions:

- ✓ L'atrazine n'induit pas de mortalité chez les hémocytes dans les conditions testées *in vitro*. En revanche, les expériences menées *in vivo* ont permis de mettre en évidence un possible effet génotoxique de ce phytosanitaire (apparition de nombreuses cellules en division après contact pendant 3 semaines avec l'atrazine à 0,1 mg.L⁻¹). Le nombre élevé de cellules en division en absence d'atrazine dans l'expérience 2 (Tableau C) pourrait s'expliquer par les variations des conditions physico-chimiques du milieu liées aux fortes précipitations des derniers mois.
- ✓ Comparativement, le mercure donne des résultats plus probants : il induit une mortalité importante dès 4h de contact. Ce constat permet de valider la méthode.
- ✓ Le développement de nouvelles techniques (cytométrie de flux) permettant l'analyse de l'impact d'un composé tel que l'atrazine sur la biologie d'un bivalve marin pourrait aboutir à la mise en place d'outils diagnostiques adaptés au suivi du transfert de produits phytosanitaires vers les zones estuariennes.
- ✓ Les bivalves marins et en particulier les huîtres sont considérés comme de bons organismes sentinelles de la surveillance des pollutions estuariennes.