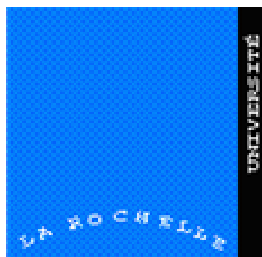




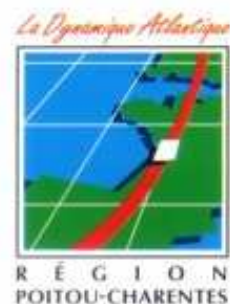
Ifremer



Université de La Rochelle

U.F.R de Sciences et Technologie

École Doctorale



THÈSE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

Discipline : Océanologie Biologique et Environnement Marin

Par

Béatrice GAGNAIRE

Étude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de
l'huître creuse, *Crassostrea gigas* – Interactions entre
environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses

Soutenue publiquement le 9 décembre 2005

JURY

M. Thierry BURGEOT	Cadre de Recherche II, IFREMER Nantes	Directeur de thèse
M. Tristan RENAULT	Cadre de Recherche II, IFREMER La Tremblade	Responsable scientifique
Mme Hélène THOMAS-GUYON	Maître de Conférences, Université de La Rochelle	Responsable scientifique (Membre invité)
M. Michel FOURNIER	Professeur, Université du Québec à Montréal	Rapporteur
M. François LÉBOULENGER	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
M. Michel AUFFRET	Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
M. Pierre MIRAMAND	Professeur, Université de La Rochelle	Examineur (Président du Jury)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Messieurs Philippe Gouilletquer et Tristan Renault pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie de la Station IFRÈMÈRE La Tremblade pendant les trois années de ma thèse. Merci également à Jean-Louis Nicolas, directeur du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés au centre IFRÈMÈRE Brest,, pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans son laboratoire.

Je remercie l'IFRÈMÈRE et la Région Poitou-Charentes, sans le soutien financier desquels ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie sincèrement Mr le Professeur Pierre Miramand d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Il a suivi ce travail depuis le début de mon stage de DEA, en me faisant part de ses remarques. Avec sa participation à ce jury, la boucle est bouclée, en quelque sorte.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail

A Monsieur le Professeur François Le Boulenger. Nous ne nous sommes rencontrés qu'une fois, à l'occasion d'un congrès très sympathique en Italie, dont le souvenir est légèrement terni à cause de moustiques sanguinaires dont j'ai fait les frais ! Mis à part ce désagrément, j'ai beaucoup aimé ce premier contact et j'espère que notre collaboration ne s'arrêtera pas avec ce travail de thèse. Merci également de m'avoir tenue informée des possibilités de postes d'ATER à l'Université du Havre.

A Monsieur le Professeur Michel Fournier. Notre première rencontre remonte à mars 2003. J'étais alors très impressionnée et intimidée de rencontrer l'auteur des nombreuses publications que j'avais lues avec intérêt. Heureusement, il m'a très vite mise à l'aise et cela a été avec un grand plaisir et un grand intérêt scientifique que j'ai participé à ces workshops avec lui. Le travail qu'il a accompli fait de lui une référence dans le domaine de l'immunotoxicité, ce qui ne l'empêche pas d'avoir toujours des anecdotes rigolotes à raconter. Merci, Michel, pour avoir accepté de t'impliquer dans ce travail malgré tes nombreuses responsabilités.

Je suis très heureuse de pouvoir compter parmi les membres de mon jury Monsieur Michel Auffret. Michel a témoigné de son intérêt pour ce travail depuis un certain temps, en acceptant déjà d'être membre du jury de mon stage de DES en 2002. C'est toujours avec un grand plaisir que je le rencontre, en France ou au Québec, et je serai également heureuse de pouvoir continuer des actions de recherche communes avec lui.

Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont à mes responsables scientifiques.

Tout d'abord, à Monsieur Thierry Burgeot, mon directeur de thèse. Nous nous sommes rencontrés au début de cette aventure. Merci de ta grande implication dans ce travail, de tes conseils, de ton soutien. Merci pour les corrections apportées à ce mémoire, souvent complémentaires de celles de Tristan. Merci également de m'avoir intégrée au GDR et de m'avoir fait rencontrer de nombreuses personnes, ce qui va peut être déboucher sur un post-doctorat.

Ensuite, à Madame Héléne Thomas-Guyon. Ce travail de thèse n'est pas le premier fruit de notre collaboration ! Merci pour ta compréhension, ton aide, tes tuyaux sur les postes à venir et les personnes à contacter. Nous aurons encore l'occasion de nous voir, mais dans le cadre d'une autre thèse, cette fois. Merci également de m'avoir permis

de me faire mes premières armes dans le domaine de l'enseignement, cela a été très important pour moi.

Enfin, celui qui me tient le plus à cœur, à Monsieur Tristan Renault. Il est difficile de trouver les mots pour remercier Tristan... Que dire, sinon tout d'abord que sans lui, tout cela ne serait jamais arrivé ! C'est en effet lui qui a porté le projet de thèse et l'a présenté à l'IFREMER, Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir estimée capable de réaliser cette thèse. Pour le travail proprement dit, merci d'avoir toujours été là. Malgré tes nombreuses activités, agrémentées depuis le début de l'année par d'importantes responsabilités administratives, tu as toujours trouvé le temps de répondre à mes questions. Tu m'as également permis de m'affirmer en tant que chercheuse, en me faisant rencontrer de nombreuses personnes, en me permettant de faire mes propres choix quant à l'orientation de mon sujet. Mais tu as toujours été là, tu as toujours su « changer de casquette » et reprendre celle de mon encadrant quand j'en avais besoin, tu as su me faire voir le côté positif des choses quand je n'y arrivais pas (« un résultat négatif, c'est déjà un résultat ! »). Je pourrais continuer pendant des pages, mais je pense que tu sais toute la gratitude que je te porte ! De manière plus générale, merci de m'avoir fait prendre goût à la recherche. C'est un monde très particulier, où l'on rencontre des personnes très différentes, et je suis sûre que je n'aurais pas pu mieux tomber pour commencer. Merci de ta formidable foi en la science, je pense que tu as réussi à me la transmettre en partie ! Plus que cela, grâce à toi j'ai pu avoir une vision globale de ce qu'était ce milieu, et c'est aussi grâce à toi que j'ai envie d'y trouver ma place malgré les difficultés. Merci également de m'avoir accueillie dans ton bureau de « grand chef », merci pour tous les fous rires que l'on a partagés, merci pour ta confiance pour cette année à venir, merci pour tout. Je ne doute pas que l'on continuera à travailler ensemble à l'avenir !

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse. Certains ont déjà été cités, mes encadrants, ainsi que Michel Auffret. Je remercie maintenant Monsieur Stefan Chilmonczyk, cadre de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas. Comme Michel, tu es au fait de ce travail depuis mon stage de DES que tu avais accepté d'évaluer. Tu nous as apporté ton point de vue « poisson » sur le travail, et ta connaissance en cytométrie de flux a également été des plus intéressante. Je n'oublierai pas non plus toutes tes anecdotes notamment sur tes missions si alléchantes en Antarctique !

Merci également à Monsieur Philippe-Jacques Hatt, directeur de recherche au CREMA L'Houmeau. Vous avez montré votre intérêt à ce travail en demandant à participer à ce comité, et votre expérience a été des plus enrichissante pour moi. Merci donc pour vos conseils avisés.

Que Monsieur Yanis Wessels, consultant et Maître de Conférences à l'Université de La Rochelle, soit ici remercié pour sa participation en tant que « mentor » à la rédaction du Nouveau Chapitre de la Thèse. Cette expérience a été très enrichissante et Yanis m'a permis de voir en quoi elle était importante.

Merci à Brigitte Hudelaine, de l'école doctorale, pour avoir répondu à mes nombreuses questions concernant la soutenance et d'avoir fait en sorte que je puisse envoyer mon dossier de qualification dans les temps !

Je remercie Virginie Maillot, responsable de l'E.C.O.L.E. de la Mer, grâce à qui la soutenance a pu se dérouler dans l'amphithéâtre René Coutant de l'Aquarium de La Rochelle, sous l'œil attentif de la tortue.

Un grand merci à Yves Papin ainsi qu'aux responsables du programme MOREST, pour m'avoir fournie en matière première, à savoir les huîtres, malgré le triste sort qui les attendait entre mes mains !

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de l'équipe de génétique et pathologie de La Tremblade. Il règne dans ce laboratoire un climat très agréable, et j'y ai fait mon trou depuis presque cinq ans maintenant. Merci donc à toutes les personnes que j'ai côtoyées chaque jour et qui ont rendu mon séjour plus qu'agréable. À l'équipe REPAMO, Maeva, Céline, Bruno, Isabelle, Jean-Pierre et Laurence, pour m'avoir laissée encombrer parfois leur paillasse ou leur hotte en histologie, en bactériologie. Grâce à vous, j'ai vu des ormeaux et des huîtres énormes, et j'ai aussi bien gardé en mémoire l'odeur de toutes ces bestioles au moment des mortalités ! À Frédérique et Denis pour leur compétence en bactériologie et leur bonne humeur. À Jean-François pour ses remarques et ses compliments. À Cyrille pour ses infos sur EndNote. À Nicole pour sa bonne humeur, ses éclats de rire, sa transformation du labo (faites place à « Victor » !), sa sympathie qui rend le travail à la paillasse bien agréable ! Merci également à l'équipe de génétique, notamment à Sylvie Lapègue et Karine Bouilly (bien qu'elle n'y soit plus maintenant), pour nos collaborations très agréables à l'occasion de manipulations et de publications.

Un grand merci à toute l'équipe éclosion, et notamment à Raphaël Brizard, Serge Heurtebise, Pascal Pheipot et à Jean-Christophe Billy. Vous avez réussi à trouver de la place pour mes petites bêtes, à me fournir les installations, l'eau de mer et les algues, merci pour elles !

Merci également à Stéphane Bodin et à Pascal Schwerdtle qui m'ont aidée à plusieurs reprises dans la mise en place des structures expérimentales.

La Tremblade est aussi le site du Laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis Charentais. Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes de ce labo, car les croiser dans le couloir est toujours agréable ! Depuis le temps je finis par savoir à peu près qui est dans quel bureau, quoique je me trompe encore... merci à Jean pour ses blagues, à Stéphane pour son rire, à Jean Luc, pour m'avoir trimballée quelques fois en bateau pour aller chercher mes huîtres, à Olivier, Philippe, Daniel, Patrice, et à tous les autres. Un petit clin d'œil à celui avec lequel nous avons beaucoup travaillé dans le cadre de MOREST, à savoir le « singing » Patrick Soletchnik. Le travail avec Patrick fut des plus agréables, en commençant par la paillasse où nous venions nous incruster pour ponctionner les hémolymphes de nos petites huîtres. Nous avons pu découvrir ton inépuisable répertoire de chansons qui agrémentaient le travail ! Merci pour toutes ces discussions qui ont permis de nous intégrer dans le programme MOREST. Ensuite, est venue la partie d'exploitation des résultats. Merci de m'avoir initié aux joies des analyses statistiques, et d'avoir toujours été présent pour répondre à mes questions, ou pour regarder avec moi les résultats ou les choses bizarres. Tu as tenu jusqu'au bout, il n'y a pas si longtemps que je suis venue te parler des analyses multivariées ! Enfin, la dernière étape est celle de la valorisation. Il aurait fallu compter le nombre de mails échangés, le nombre de documents écrits sur ces manipulations DYNAMO ! Je garde un très bon souvenir de cet exercice, car même si le résultat a été difficile à obtenir, nous avons partagé de nombreux moments de rigolade avec Tristan. Merci pour ta bonne humeur.

J'adresse de sincères remerciements à nos « drôles de dames » qui forment une équipe administrative de choc : Martine Grasset pour ta patience et ta disponibilité, pour avoir pris le temps de me ressortir l'historique de mes commandes et missions, pour ta bonne humeur. Florence Rivet pour mes nombreuses listes de demande d'articles et

la rapidité avec laquelle tu les obtenais, pour ton rire communicatif. Et les différentes secrétaires, notamment Delphine Rousic et Véronique Betto : merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre sourire. Merci également à Joëlle, à Sylvie, pour avoir été compréhensive au moment de l'impression de ce rapport.

Une partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre IFRFEMER de Brest. Je remercie Jean-Yves Daniel pour m'avoir appris à me servir de cette bête étrange qu'est la PCR en temps réel, pour sa présence lors de mes questions, pour son calme, bref, pour m'avoir soutenue lors de mes visites très chargées en termes de manip au LPI. Je n'oublierai pas de remercier également Arnaud Huvet, qui, bien qu'ayant des tas de choses à faire, a accepté de m'accueillir au LPI. C'est lui qui m'a appris à analyser mes données, partie importante s'il en est ! Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer cette technique et d'avoir répondu à mes nombreux mails et à mes questions. Merci également à toutes les autres personnes du LPI pour avoir rendu mes séjours dans ce laboratoire aussi agréables que possible.

Un grand merci également à tout le personnel du laboratoire de Bouin, qui fait maintenant partie du LGP. Chaque fois que nous sommes allés y faire des manip, nous avons toujours été très bien reçus, parfois même autour d'un verre de Troussepinette ! C'est également là que j'ai rencontré Florence Géret, qui est maintenant partie plus au sud, mais malgré nos travaux respectifs on arrive encore à travailler ensemble ! Merci pour tes conseils.

Même si je n'y ai pas été souvent pendant ma thèse, je tiens à remercier tout le personnel du Laboratoire de Biologie et Environnement Marin de l'Université de La Rochelle, en particulier Christine Trichet pour son aide à la préparation des TP et Nicolas Alligner pour son aide efficace concernant mes missions. Merci également à Gérard Blanchard, directeur du LBEM, pour avoir accepté cette collaboration.

Je remercie également tout ceux qui m'ont aidé dans mes manip. A Carine Churlaud du CCA, pour m'avoir aidée avec l'appareil à mercure. A Bruno et Maeva qui m'ont gentiment aidé à ouvrir des huîtres quand je croulais sous le nombre ! A Mélanie, Fred et Denis pour m'avoir aidée à maîtriser le fonctionnement de la salle patho expé (je n'oublierai jamais comment on règle la clim !). Un très grand merci aussi à Mélanie pour le temps qu'elle a passé à m'apprendre comment endormir mes bestioles, à cultiver les petites bactéries, et à les injecter dans les huîtres... et tout le reste, les questions sur comment soutenir à l'amphi de l'aquarium, comment on fait un dossier de qualif, j'en passe et des meilleures ! Merci bien sûr également à Tristan, qui a trouvé du temps pour venir m'aider à la paillasse, à comprendre les messages que nous envoyait le cytomètre, etc. Enfin, la dernière mais pas la moindre, un grand merci à Nicole Faury pour ta participation aux manip DYNAMO. A cette époque, tu étais encore une « mickette », à croire que de nous voir rigoler tout le temps avec Tristan t'a donné envie de venir voir ce qui se passait au LGP ! Merci pour ton aide technique, mais aussi pour tout le reste... pour tous ces bons moments partagés que je n'oublierai pas. Merci également aux 10 000 huîtres (ce chiffre ne doit pas être très éloigné de la réalité) que j'ai trucidées tout au long de ma thèse !

J'ai participé à l'encadrement de plusieurs stagiaires durant cette thèse, mais il n'y en a qu'une que j'ai « prise en main » du début à la fin : merci à Héloïse pour m'avoir supporté en tant qu'encadrante ! Tu as fait preuve pendant ton stage d'une grande autonomie et d'une immense volonté d'apprendre, je te souhaite du courage et plein de

bonnes choses pour continuer dans cette voie. Tabernacle !

Je remercie également les nombreux stagiaires qui se sont succédés dans le labo, je ne les listerai pas de peur d'en oublier. Je me souviens plus précisément des « Tristanettes » et « Tristanets », Valérie, Gaëlle, Emilie, Lucile, Kevin et Xavier, nous avons partagé des supers moments avec notre chef commun bien sûr !

Un labo ne serait peut être pas aussi vivant sans tous ses thésards : les anciens, qui ont fini (eux !) : Valérie Barbosa, qui après un tour au Mexique est revenue à Jouy, et je l'espère bientôt dans le coin, Lionel Dégremont, parti pour d'autres horizons américains (merci pour l'agréable surnom de « vampire des huitres » que tu m'as donné...hum), Mélanie Gay, qui découvre le nord de la France, et Karine Bouilly, qui elle est dans des contrées plus chaleureuses ; mon contemporain, Nicolas Taris (merci pour toutes nos discussions...); et les p'tits jeunes, Noelia Carrasco, Christopher Sauvage, Yann Reynaud et Delphine Lallias, bon courage à tous pour la suite... et la fin ! Vous voyez, ça arrive un jour !

La thèse est une période délicate, qu'il serait très difficile de traverser sans le soutien de ses amis. Aux « locaux », d'abord, merci à tous les stagiaires et les non-stagiaires du labo, pour tous ces très bons moments passés ensemble, et plus particulièrement à Maeva, Céline, Valérie, Gaëlle, Nolwenn, Mélanie, qui au départ étaient des collègues et qui sont devenues de réelles amies, merci à toutes pour les remontages de moral, les papotages sur tout, les ragotages, et j'en oublie... Merci également à Noelia, Lionel, Nico, Delphine, Frédéric, Karine, Isabelle, Jean-Côme, Cyrielle, pour tous les moments de détente et ces discussions très sympas. Ensuite, les amis d'un peu plus loin, compagnons de galère également, à savoir les doctorants du LBEM : Olivier, JC, Pascal, Karine, Benoît, Elise, Pierre-Yves, Benoît, Manu. Bon courage à ceux qui ont fini pour trouver du travail, et aux autres pour finir ! Enfin, tous les amis plus lointains, mais qui sont restés très proches de moi malgré la distance : les lyonnais Eveline et Julien, et Anne, la québécoise Marion, la vesoulaise Virginie, les landais Véro et Fred, la palloise Fred, la vendéenne Flo ; la fine équipe de Rjorges, à savoir Valérie et David et leurs trois adorables bouts de choux, Coco, Maclo et Sandra, Christophe et Céline, et Stef ; mes amis parisiens, Benoît et Mélanie, Antoine, Ketty, Célinou, Christèle ; tous mes collègues de DEA ; et tous les autres...ça y est, je vais arrêter de vous parler de ma thèse, maintenant ce sera la recherche d'emploi qu'il faudra supporter ! Merci de votre soutien à tous.

Je ne suis pas des plus sportives, mais il faut savoir se détendre parfois ! Merci donc pour les bons moments passés aux adhérents des clubs de plongée de la fac (Olivier, Pascal, Manu, Christine, Toni, Michel, Serges), puis de Rochefort (David, Nicolas, Stéphane, Nathalie).

Je ne serais bien sûr jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de ma famille. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi, cru que j'y arriverai, parfois même plus que moi, merci de m'avoir soutenue dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci de faire 1500 km à chaque fois que vous venez me voir, merci pour tout. J'espère vous rendre le bonheur que vous m'apportez. Je remercie également mon frère Christophe, pour sa présence très importante, pour nos nombreuses conversations sur les mangas, Magic, les jeux vidéos, qui ont largement contribué à me changer les idées !

La dernière pensée va à celui qui est dans mon cœur, Olivier. Merci de ta présence, de ton soutien au quotidien.

Suggestions culinaires

Huîtres chaudes au champagne

Ingrédients :

- huîtres creuses : 12
- jaunes d'oeufs : 2
- beurre : 100 g
- Champagne : 3 c. à soupe
- vinaigre de vin blanc
- jus de citron : 1 c. à café
- cerfeuil haché : 1 c. à café
- poivre de Cayenne
- sel fin, poivre blanc du moulin

Préparation :

Nettoyez bien les coquilles et séchez-les. Faites fondre le beurre au four à micro-ondes (600 W) pendant 1 minute 30. Mélangez les jaunes d'oeufs, le champagne, le vinaigre, le jus de citron et le cerfeuil. Faites chauffer le tout au four (360 W) pendant 45 secondes. Incorporez peu à peu le beurre. Salez et poivrez la sauce obtenue. Replacez les huîtres dans les coquilles. Napper chaque coquille d'une cuillerée à soupe de sauce. Faites cuire au four à micro-ondes (330 W) pendant 1 minute 30. Saupoudrez d'une pincée de poivre de Cayenne. Servez aussitôt.

Huîtres à la ciboulette

Ingrédients :

- 12 huîtres
- 4 cuillerées à soupe de crème fraîche
- 2 cuillerées à soupe de ciboulette ciselée
- 1 citron

Préparation :

Ouvrir les huîtres et les sortir de leur coquille. Les mettre dans une casserole et les faire légèrement frémir dans leur jus. Filtrer le jus qui va être utilisé dans les préparations suivantes. Réserver les huîtres d'une part et les coquilles d'autre part. Mélanger la crème fraîche avec la ciboulette. Ajouter le citron et le jus. Réserver.

Garnir de gros sel le fond d'un plat allant au four. Déposer les coquilles d'huîtres sur le sel. Mettre les huîtres pochées au fond de chaque coquille. Napper les huîtres avec la préparation à la ciboulette. Passez environ 5 minutes à four chaud.

Huîtres chaudes à la fondue de poireaux

Ingrédients :

6 huîtres

1 poireau

2dl de crème fraîche

1 jaune d'oeuf

sel, poivre

Préparation :

Emincer le poireau et les faire cuire dans 1 litre d'eau bouillante salée. Ouvrir les huîtres et les mettre dans une casserole avec leur eau pour les pocher. Egoutter poireaux et huîtres. Faire réchauffer les poireaux avec une cuillère de crème fraîche. Remettre les huîtres dans leurs coquilles et les couvrir avec l'émincé de poireau. Garder au chaud, fouetter le reste de la crème pour l'épaissir légèrement et incorporer le jaune d'oeuf. Saler, poivrer, et mettre 1 cuillerée de crème sur chaque huître.

Gratiner au four.

« Rien ne vaut la recherche lorsqu'on veut trouver quelque chose. »

J. R. R. Tolkien, Bilbo le Hobbit

« L'huître, elle aussi, a des ennemis. »

Alexis Tolstoï

A mes parents

Avant-propos

Une partie des résultats rapportés dans ce mémoire a donné lieu à des publications dans des revues scientifiques et des communications lors de congrès scientifiques internationaux.

Publications :

Article 1 : Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H. & Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20: 536-547.

Article 2 : Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. & Renault, T. (sous presse). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*.

Article 3 : Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O. & Renault, T. (sous presse). Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*.

Article 4 : Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O. & Renault, T. (soumis). Analysis of hemocyte parameters and study of their temporal trend in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field - Study of hatchery diploids and diploids from natural bed. *Fish & Shellfish Immunology*.

Article 5 : Bouilly, K., Bonnard, M., **Gagnaire, B.,** Renault, T. & Lapègue, S. (soumis). Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.

D'autres articles ne sont pas présentés dans ce rapport.

Article 6 : Faucet, J., Maurice, M., **Gagnaire, B.,** Renault, T. & Burgeot, T. (2004). Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science* 25: 177-184.

Article 7 : Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S. & Thomas-Guyon, H. (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 9: 193-199.

Article 8 : Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. & Renault, T. (2004). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 501-512.

Article 9 : Aton, E., Renault, T., **Gagnaire, B.**, Thomas-Guyon, H., Cognard, C. & Imbert, N. (2006). A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca²⁺ in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20 : 493-503.

Article 10 : Bouilly, K., **Gagnaire, B.**, Bonnard, M., Thomas-Guyon, H. & Renault, T. (accepté, en révision). Cadmium effects on aneuploidy and defence response in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*.

Article 11 : Géret, F., Haure, J., **Gagnaire, B.**, Renault, T., Quirion, S., Papin, M., Ménard, D. & Burgeot, T. (soumis). Physiological and metabolic responses to pesticides in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*.

Article 12 : Bado-Nilles, A., Auffret, M., Quentel, C., Le Floch, S, **Gagnaire, B.**, Renault, T. & Thomas-Guyon, H. (en préparation). *In vivo* effect of environmental pollution by soluble fraction of heavy fuel on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), defence capacities.

Article 13 : Hellio, C., Bado-Nilles, A., **Gagnaire, B.**, Renault, T. & Thomas-Guyon, H. (en préparation). *In vitro* study of phenoloxidase-like activity in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) .

Article 14 : Thomas-Guyon, H., **Gagnaire, B.**, Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S. & Renault, T. (en préparation). Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg).

Communications :

Seules les participations aux congrès internationaux sont indiquées.

ICSR (International Conference on Shellfish Restoration) : 8ème édition, Brest, 2-5 Octobre 2005

- **Gagnaire, B.**, Renault, T., Thomas-Guyon, H. & Burgeot, T. Effect of *in vivo* pesticide exposure and injection of bacteria on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).

EAFP (European Association of Fish Pathology)

2005 : 12^{ème} édition, Copenhague, Danemark, 11-16 septembre

- **Gagnaire, B.**, Renault, T., Thomas-Guyon, H. & Burgeot, T. Effect of *in vivo* pollutant exposure and injection of OshV-1 disease on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).

2003 : 11^{ème} édition, Malte, 21-26 septembre

- **Gagnaire, B.**, Soletchnik, P., Faury, N., Guilpain, P., Kerdudou, N., Le Moine, O. & Renault, T.
A cytometric morpho-functional analysis of the haemocytes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared in contrasted natural environments.

PRIMO (Pollutant Responses in Marine Organisms)

2005 : 13^{ème} édition, Alessandria, Italie, 19-22 juin

- **Gagnaire, B.**, Renault, T., Thomas-Guyon, H. & Burgeot, T. Effect of *in vivo* pollutant exposure and injection of infectious diseases on immune gene expression in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (anglais).

- Burgeot, T., Quirion, S., Quiniou, F., Knoery, J., Soletchnik, P., **Gagnaire, B.**, Renault, T., Haure, J., Moraga, D., Osada, M., Geret, F. & Gagné, F. Environmental stress of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during the gametogenesis (Poster en anglais).

2003 : 12^{ème} édition, Tampa, Floride, 10-13 mai

- Géret, F., **Gagnaire, B.**, Ménard, D., Renault, T., Le Roux, A., Haure, J., Bocquené, G. & Burgeot, T. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to pesticide exposition (Poster en anglais).

ESCPB (European Society for Comparative Physiology and Biochemistry) : 23^{ème} édition, Cesenatico, Italie, 23-26 septembre 2004

- **Gagnaire, B.** & Renault, T. *In vitro* exposure to different pollutants : effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes (anglais).

ACFAS (Association Francophone pour le Savoir) : 72^{ème} édition, Montréal, Québec, 12 mai 2004

- Burgeot, T., Géret, F., Ménard, D., Quiniou, S., Haure, J., Renault, T., **Gagnaire, B.**, Le Roux, A., Huvet, A., Moal, J., Samain, J-F., Moraga, D., Boutet, I., Violeau, D., Royer, A., Communal, P.Y., Pfhof Leskowicz, A., Quiniou, F., Klein, B., Caisey, X., Masson, P., Faury, N. & Soletchnik, P. Stress environnemental chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en zone ostréicole impactée par les phytosanitaires.

SEM (Sociétés Européennes de Malacologie) : 3^{ème} édition, La Rochelle, 24-27 juin 2003 (Lauréate prix SEM)

- **Gagnaire, B.**, Géret, F., Haure, J., Martin, J-L., Burgeot, T. & Renault, T. Effect of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes.

NSA (National Shellfisheries Association)

2003 : Nouvelle-Orléans, Louisiane, 13-17 avril

- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., Frouel, S., Degremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Soletchink, P., Le Moine, O., Ropert, M., Bédier, E., Renault, T., **Gagnaire, B.**, Huvet, A. & Samain, J-F. Immunological status of selected *Crassostrea gigas* families and descendants, reared in different environmental conditions.
- Renault, T., **Gagnaire, B.**, Solechnik, P. & Le Moine, O. A cytometric morpho-functional analysis of the haemocytes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared in contrasted natural environments - Effects of sampling time and genetic origin.

2002 : Mystic, Connecticut, 12-17 avril

- **Gagnaire, B.**, Thomas-Guyon, H. & Renault, T. Evaluation of the toxicity of micropollutants (heavy metals and atrazine) on haemocytes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *in vivo* and *in vitro* (Poster en anglais).

CLIO (Congrès International de Limnologie et Océanographie) : 5^{ème} édition, Institut Océanographique, Paris, 9-12 septembre 2002

- **Gagnaire, B.**, Thomas-Guyon, H. & Renault, T. Etude *in vivo* et *in vitro* des effets de métaux lourds sur la réponse hémocytaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : développement de techniques évaluant les impacts de la pollution estuarienne.

EFMS (European Federation of Marine Science and Technology Societies) : Athènes, Grèce, 27-29 septembre 2002

- **Gagnaire, B.**, Renault, T. & Thomas-Guyon, H. Evaluation of the toxicity of micropollutants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *in vivo* and *in vitro* (Poster en anglais).

SEB (Society for Experimental Biology) : Edinburgh, Grande-Bretagne, avril 2004

- Aton, E., Cognard, C., Renault, T., **Gagnaire, B.**, Thomas-Guyon, H. & Imbert, N. Calcium signalling in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes : a first approach (Poster en anglais).

HarmaBIM : Workshop sur les mesures des paramètres cellulaires chez les bivalves, Québec, Canada, 9-13 mai 2005

- **Gagnaire, B.**, & Renault, T. Assays for adjustment of *in vitro* pollutant exposure protocols on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes (anglais).
- **Gagnaire, B.**, Renault, T., Auffret, M., & Duchemin, M. Analysis of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocyte parameters, using flow cytometry: inter-laboratory method comparisons (anglais).

Liste des abréviations

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid
AChE	AcétylCholinEstérase
ADEME	Agence pour le DEveloppement et la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AHH	Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
AMA	Advanced Mercury Analyser
AMPA	Aminomethyl Phosphonic Acid (métabolite du glyphosate)
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BaP	Benzo(a)Pyrène
BCF	Bio Concentration Factor
BET	Bromure d'ETHydium
BPI	Bactericidal/Permeability-Increasing protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CCA	Centre Commun d'Analyses
CE	CarboxylEstérases
CFU	Colony Forming Unit
CHE	CHolinEstérases
CIEM	Comité International pour l'Exploitation de la Mer
CL	Concentration Létale
CNC	Comité National de la Conchyliculture
Ct	threshold Cycle
CV	Coefficient de Variation
CYP	Cytochrome P450
DBT	DiButylTin
DCFH-DA	2',7'-DiChloroFluorescein DiAcetate
DDD	1-1'-(2,2-dichloroéthylidène)-bis-(4-chlorobenzene)
DDE	1-1'-(2,2-dichloroéthénylidène)-bis-(4-chlorobenzene)
DDT	Dichloro Diphényl Trichloroéthane
DEA	DéEthylAtrazine
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
DFP	Di-isopropylFluoroPhosphate
DHR 123	DiHydroRhodamine 123

DL	Dose létale
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
dNTPs	Deoxy Nucléotides TriPhosphates
DOCK	Dedicator Of CytoKinesis protein
DS	Dismutase Spontanée
DTT	DiThioThreitol
DYNAMO	DYNamique des MOrtalités
DYNAMOR	DYNamique des MORTalités
ECSIT	Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways
EDMAS	Eau De Mer Artificielle Stérile
EDTA	Ethylène Diamine Tétracetic Acid
EH	Epoxyde Hydrolase
EPA	Environmental Protection Agency
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
EROD	EthoxyRésorufine-O-Dééthylase
EST	Expressed Sequenced Tags
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Fluorescein DiAcetate
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FL	Fluorescence Lens
FMO	Flavine MonoOxygenase
FSC	Forward SCatter height
GESAMP	Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution
GIRPA	Groupement Interrégional de Recherche sur les Produits Agropharmaceutiques
GPX	Glutathion PeroXydase
GRED	Glutathion REDuctase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion-S-Transférase
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCB	Hexa-ChloroBenzène
HCH	Hexa-ChloroHexane
HSP	Heat Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	InterFéroN
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IL	InterLeukine

INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IP	Iodure de Propidium
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
L-Dopa	L- dihydrophénylalanine
LEMAR	Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin
LERPC	Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais
LGBP	LPS and β -1,3-Glucan Binding Protein
LGP	Laboratoire de Génétique et Pathologie
LPS	LipoPolySaccharides
LSD	Least Significance Difference
MBT	MonoButylTin
MEKK-1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1 (MAPK/ERK ¹ Kinase Kinase-1 ou Map3k1 ou MAPKKK1) ¹ ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase (ou MAPK 2)
MFO	Mixed-Function Oxidase
MIH	Milieu d'Incubation des Hémocytes
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOREST	MORtalités ESTivales de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (programme de recherche de l'IFREMER)
MPO	MyéloPerOxydase
MRP	Multidrug Resistance related Protein
MSX	Multinucleated Sphere X
MT	MétalloThionéine
MXR	Mutli Xenobiotic Resistance
MXRM	Mutli Xenobiotic Resistance Mechanism
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forme réduite)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forme réduite)
NK	Natural Killer
NLS	Séquence de Localisation Nucléaire
NO	Nitric Oxide
NOEC	No Observed Effect Concentration
NOS	Nitrite Oxyde Synthétase
NPI	Necrose Pancreatic Infection
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Oligo dT	Oligonucleotide deoxyThymidine
OsHV-1	Oyster HerpesVirus type 1

PAE	Pôle Analytique des Eaux
PAN	Pesticide Action Network
PCBs	PolyChloroBiphényles
PCP	PentaChloroPhénol
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel Hydrogène
PMA	Phorbol Myristate Acétate
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PNAS	Protéine d'apoptose
PO	PhénolOxydase
POP	Persistent Organic Pollutant
QR	Quantité Relative
« R »	Famille « résistante » à la mortalité (présentant une faible mortalité sur estran) sélectionnée par le programme MOREST
REST	Relative Expression Software Tool
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNO	Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcription
« S »	Famille « sensible » à la mortalité (présentant une forte mortalité sur estran) sélectionnée par le programme MOREST
SAAH	Solution Anti-Agrégante Hémocytaire
SOD	SuperOxide Dismutase
SSC	Size SCatter height
SSH	Suppressive Subtractive Hybridization
ST	SulphoTransférase
TAE	Tris Acétate EDTA
TBT	TriButylTin
TIMP	Tissue Inhibitor Metallo-Proteinase
Tm	Temperature of melting
TNF	Tumeur Necrosing Factor
TOSC	Total Oxyradical Scavenging Capacity
UBO	Université de Bretagne Occidentale
UGT	UDP ² -GlucuronosylTransférase
	² UDP : Uracile DiPhosphate
UV	Ultra-Violet
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine-1

Tables des matières

Introduction.....	1
Rappels bibliographiques.....	13
I Aquaculture mondiale et conchyliculture.....	15
I.1. Importance de l'aquaculture dans le monde	15
I.2. Les mollusques en aquaculture	15
I.3. L'aquaculture et la conchyliculture en France.....	17
I.4. L'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	17
I.4.1. Présentation.....	17
I.4.2. Production mondiale	19
I.4.3. Situation en France.....	19
II Le modèle biologique : l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	27
II.1. Systématique	27
II.2. Anatomie.....	27
II.2.1. Coquille.....	27
II.2.2. Manteau et cavité palléale.....	29
II.2.3. Masse viscérale	29
II.2.4. Système digestif	30
II.2.5. Système excréteur	30
II.2.6. Système nerveux	31
II.2.7. Système circulatoire.....	31
II.3. Mode de vie et nutrition	33
II.4. Reproduction.....	33
II.4.1. Appareil reproducteur et gamétogénèse.....	33
II.4.2. Ponte et fécondation.....	35
II.4.3. Vie larvaire.....	35
III Les hémocytes, des cellules à activités multiples	37
III.1. Les différents types hémocytaires.....	37
III.2. Origine et ontogénie des hémocytes	41
III.3. Propriétés des hémocytes	43

III.3.1.	Agrégation hémocytaire	43
III.3.2.	Plasticité	43
III.3.3.	Mobilité	44
III.3.4.	Chimiotactisme	44
III.3.5.	Adhésion	44
III.4.	Fonctions des hémocytes	44
III.4.1.	Réparation des blessures	44
III.4.2.	Réparation de la coquille.....	45
III.4.3.	Excrétion	45
III.4.4.	Digestion et transports de nutriments.....	45
III.4.5.	Détoxification des polluants	45
IV	Les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves.....	47
IV.1.	Mécanismes à médiation cellulaire	48
IV.1.1.	« Inflammation » et infiltration hémocytaire	48
IV.1.2.	Encapsulation	48
IV.1.3.	Formation de nacre.....	48
IV.1.4.	Apoptose ou mort cellulaire programmée.....	49
IV.1.5.	Réponses aux xénobiotiques	49
IV.1.6.	Phagocytose	50
IV.2.	Substances solubles présentes dans l'hémolymphe	55
IV.2.1.	Enzymes hydrolytiques lysosomales	55
IV.2.2.	Lectines	57
IV.2.3.	Protéines de stress	57
IV.2.4.	Système pro-phénoloxydase - phénoloxydase	59
IV.2.5.	Oxydes nitriques synthétases	59
IV.2.6.	Cytokines	60
IV.2.7.	Substances impliquées dans la cytotoxicité	60
V	Facteurs affectant les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves	63
V.1.	Origine génétique	63
V.2.	Facteurs environnementaux	64
V.2.1.	Facteurs physico-chimiques	64
V.2.2.	Contaminants	66
V.3.	Agents infectieux	71
V.3.1.	Effet des maladies sur les activités hémocytaires	71

V.3.2.	Relations entre facteurs physico-chimiques et sensibilité aux maladies infectieuses	73
V.3.3.	Relations entre polluants et sensibilité aux maladies infectieuses	74
VI	Risque environnemental	77
VI.1.	Définition du risque	77
VI.2.	Biomarqueurs	79
VI.2.1.	Généralités	79
VI.2.2.	Biomarqueurs immunologiques	85
VI.2.3.	Limites d'utilisation des biomarqueurs	87
VII	Polluants utilisés dans cette étude	89
VII.1.	Généralités sur les polluants	89
VII.2.	Types de polluants	91
VII.2.1.	Mode d'apport	91
VII.2.2.	Classement du risque des polluants	91
VII.3.	Pesticides	93
VII.3.1.	Herbicides	93
VII.3.2.	Insecticides	95
VII.3.3.	Fongicides	97
VII.3.4.	Pentachlorophénol	97
VII.4.	HAP	99
VII.4.1.	Benzo(a)pyrène	100
VII.4.2.	Phénanthrène	100
VII.4.3.	Anthracène	101
VII.4.4.	Pyrène	101
VII.4.5.	Fluoranthène	101
VII.5.	PCB	102
VII.5.1.	PCB 77	103
VII.5.2.	PCB 153	103
	Première partie Développements méthodologiques	105
I	Introduction	107
II	Mise au point et standardisation de protocoles de mesure de paramètres hématocytaires	109
II.1.	Mise au point de protocoles de mesure de paramètres hématocytaires en cytométrie de flux	109
II.1.1.	Matériel et Méthodes	109

II.1.2.	Résultats	111
II.1.3.	Discussion	115
II.2.	Comparaison inter-laboratoires	119
II.2.1.	Matériel et Méthodes	119
II.2.2.	Résultats	121
II.2.3.	Discussion	123
II.3.	Comparaison des activités dans différents types de tissus	125
III	Conditions de maintien des hémocytes <i>in vitro</i>	127
III.1.	Traitement des cellules avant mise en culture	127
III.1.1.	Matériel et Méthodes	127
III.1.2.	Résultats	129
III.1.3.	Discussion	129
III.2.	Effets des antibiotiques	130
III.2.1.	Matériel et méthodes	130
III.2.2.	Résultats	130
III.2.3.	Discussion	130
III.3.	Effet de la température et du temps de mise en culture sur les activités cellulaires (Article 2)	130
IV	Conclusion	132
Deuxième partie	Analyse <i>in vitro</i> de paramètres hémocytaires chez l’huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	133
I	Introduction	135
II	Effets de paramètres physico-chimiques sur les paramètres hémocytaires (Article 1)	137
III	Effets de polluants sur les paramètres hémocytaires (Article 2)	151
IV	Discussion	167
V	Conclusion	169
Troisième partie	Contamination <i>in vivo</i> d’huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i>, avec des polluants – Effets des polluants sur la sensibilité aux maladies infectieuses	171
I	Introduction	173

II	Effets <i>in vivo</i> de la température et de la salinité sur les paramètres hématocytaires.....	175
III	Contamination <i>in vivo</i> d'huîtres creuses, <i>C. gigas</i>, avec du diuron.....	177
IV	Contamination <i>in vivo</i> d'huîtres avec un mélange de pesticides.....	179
IV.1.	Préambule.....	179
IV.2.	Matériel et Méthodes	183
IV.2.1.	Animaux et protocole d'exposition aux pesticides	183
IV.2.2.	Etude des paramètres hématocytaires en cytométrie de flux	185
IV.2.3.	Extraction d'ARN et analyses en PCR	185
IV.3.	Résultats	187
IV.3.1.	Concentrations des pesticides dans l'eau	187
IV.3.2.	Effets des pesticides sur les paramètres hématocytaires.....	187
IV.3.3.	Effets des pesticides sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose.....	189
IV.4.	Discussion	189
IV.4.1.	Toxicité des pesticides utilisés dans le mélange	189
IV.4.2.	Effets des mélanges de polluants	190
IV.4.3.	Mesure de concentrations des pesticides dans l'eau	191
IV.4.4.	Effets des pesticides sur les paramètres hématocytaires.....	192
IV.4.5.	Effets des pesticides sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose.....	194
IV.4.6.	Remarques sur la technique de PCR en temps réel.....	197
IV.4.7.	Mécanismes d'action des pesticides	199
V	Contamination <i>in vivo</i> d'huîtres avec du chlorure de mercure	201
V.1.	Matériel et Méthodes	201
V.1.1.	Animaux et protocole expérimental.....	201
V.1.2.	Etude des paramètres hématocytaires en cytométrie de flux.....	201
V.1.3.	Extraction d'ARN et analyses en PCR en temps réel	203
V.1.4.	Quantification du mercure dans les tissus des huîtres.....	203
V.2.	Résultats	205
V.2.1.	Dosage de mercure dans les tissus	205
V.2.2.	Concentrations du chlorure de mercure dans l'eau.....	205
V.2.3.	Effets du mercure sur les paramètres hématocytaires.....	205

V.2.4.	Effets du mercure sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose.....	207
V.3.	Discussion	207
VI	Modulation des fonctions hémyocytaires et sensibilité aux agents infectieux	209
VI.1.	Matériel et Méthodes	209
VI.1.1.	Préparation des suspensions bactériennes.....	209
VI.1.2.	Injection dans le muscle adducteur	211
VI.1.3.	Suivi de la mortalité	211
VI.1.4.	Extraction d'ARN et analyses en PCR en temps réel	211
VI.2.	Résultats	213
VI.2.1.	Expériences d'injection sans contamination : suivi de la mortalité	213
VI.2.2.	Expériences d'injection après contamination aux pesticides.....	213
VI.3.	Discussion	217
VII	Conclusion.....	227
Quatrième partie	Analyse <i>in situ</i> de paramètres hémyocytaires chez l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>.....	229
I	Introduction.....	231
II	Suivi de paramètres hémyocytaires en relation avec la maturation sexuelle et les mortalités estivales chez trois populations d'huîtres (DYNAMO, 2002) (Articles 3 et 4).....	233
III	Suivi des paramètres hémyocytaires en relation avec la maturation sexuelle et la mortalité estivale chez quatre populations d'huîtres (DYNAMOR, 2003).....	267
III.1.	Matériel et Méthodes	267
III.2.	Résultats	269
III.2.1.	Mortalité.....	269
III.2.2.	Recherche de pesticides dans l'eau et dans les huîtres	269
III.2.3.	Corrélation entre les paramètres hémyocytaires suivis.....	271
III.2.4.	Effet cheptel et environnement	271
III.2.5.	Effet cheptel et période	271
III.2.6.	Relations entre facteurs environnementaux et paramètres hémyocytaires	273
III.3.	Discussion	273
III.3.1.	Mortalité des huîtres.....	275
III.3.2.	Corrélations des paramètres hémyocytaires entre eux.....	277

III.3.3.	Effet des cheptels	277
III.3.4.	Effet de la hauteur des tables	279
III.3.5.	Effet de la maturation.....	279
III.3.6.	Différencier les huîtres « R » et « S » sur la base des paramètres hématocytaires	280
III.3.7.	Rôle des pesticides	281
III.3.8.	Risque environnemental précédant la mortalité.....	282
IV	Conclusion.....	283
	Conclusion générale - Perspectives.....	285
	Références bibliographiques	293
	Annexes	317
	Annexe 1 - Rappels bibliographiques.....	319
	Annexe 2 - Matériel et Méthodes	335
2.1.	Animaux.....	335
2.2.	Prélèvements d'hémolymphe.....	335
2.3.	Traitement statistique des données	335
2.4.	Cytométrie en flux	337
2.4.1.	Principe	337
2.4.2.	Protocoles utilisés	338
2.5.	Biologie moléculaire	339
2.5.1.	Extraction d'ARN totaux des hématocytes.....	339
2.5.2.	Gel d'électrophorèse	340
2.5.3.	Traitement des ARN à la DNase et précipitation des sels	340
2.5.4.	Protocole de Transcription Reverse (RT)	341
2.6.	PCR en temps réel.....	343
2.6.1.	Principe de la technique	343
2.6.2.	Mise au point de la technique pour cette étude.....	345
2.6.3.	Gènes sélectionnés	347
2.6.4.	Analyse des données	347
2.7.	PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	351
2.7.1.	Principe général de la RFLP	351
2.7.2.	Application à l'étude	351
2.7.3.	Résultats	351

2.8.	Suivi de l'expression de gènes en RT-PCR semi-quantitative	353
2.8.1.	Principe	353
2.8.2.	Analyse électrophorétique.....	353
Annexe 3 -	Composition des milieux.....	355
3.1.	Zobell	355
3.2.	Eau de Lewis (EDMAS) (10 X).....	355
3.3.	Solution anti-agrégante pour les hémocytes (SAAH).....	355
3.4.	Milieu d'incubation pour les hémocytes (MIH)	356
3.5.	Milieu SAAH trypsine 5X	356
3.6.	Solution d'Antibiotiques	356
3.7.	Eau DEPC	356
Annexe 4 -	Liste des espèces citées	357
Annexe 5 -	Liste des produits utilisés	361
Annexe 6 -	Publication	363

N.B. : l'ensemble des noms latins d'espèces cités dans ce manuscrit est regroupé dans l'annexe 4 avec leur correspondance en français et en anglais.

Introduction



La conchyliculture représente à l'échelle mondiale une activité dont les enjeux économiques sont majeurs (22.9 % de la production aquacole mondiale en 2002, soit 11.8 millions de tonnes). Les données émanant d'organisations internationales telles que la FAO (Food and Agriculture Organisation), l'Union Européenne et le CIEM (Comité International pour l'Exploitation de la Mer) attestent du rôle primordial occupé par cette activité. La filière conchylicole française est notamment l'une des plus importantes au niveau mondial avec une production en 2003 de 186 000 tonnes et un chiffre d'affaire de 321 millions d'euros pour 3 700 entreprises et plus de 20 000 emplois. Elle se place ainsi au cinquième rang mondial, après la Chine, les USA, le Japon et la Corée. La France est également le principal producteur d'huîtres en Europe avec un tonnage représentant 65.5 % des coquillages produits. L'élevage de coquillages concerne un nombre limité d'espèces dont la plupart sont des mollusques bivalves. Les deux principales espèces concernées en France métropolitaine sont **l'huître creuse ou huître japonaise, *Crassostrea gigas***, et dans une moindre mesure l'huître plate, *Ostrea edulis*. L'huître creuse équivaut à elle seule à 98 % de la production ostréicole française, soit 128 000 tonnes en 2003 (FAO, 2005). La région Poitou-Charentes et principalement le bassin de Marennes-Oléron est l'une des régions les plus importantes de production française d'huître creuse avec 29.7 % de la production nationale.

L'ostréiculture est une activité qui se pratique dans la majorité des cas dans des **zones estuariennes**, environnements particuliers du fait des interactions entre le milieu marin et le milieu dulçaquicole. En effet, les contaminants produits par les activités anthropiques (industries et activités domestiques) sont rejetés dans l'environnement par le biais des eaux douces (eaux usées et lessivage des sols lors des pluies) et finissent par se retrouver dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens ou côtiers. De ce fait, ces zones comptent parmi les plus exposées aux différents types de pollutions récurrentes, comme les matières organiques, les métaux lourds, les polychlorobiphényles (PCBs), les pesticides ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), qui peuvent avoir des conséquences écologiques majeures (Galloway & Depledge, 2001). **Le bassin de Marennes-Oléron** est un exemple d'intérêt. Il constitue une zone littorale sous influence estuarienne, bénéficie d'une forte productivité biologique et est le siège d'activités humaines très variées qui contribuent au rejet de nombreuses molécules toxiques telles que des métaux lourds et des pesticides (Miramand *et al.*, 2002; Munaron, 2004).

La prédiction de l'impact environnemental des substances toxiques et de mélanges de toxiques à des niveaux sub-létaux est un des challenges majeurs pour la recherche en toxicologie environnementale. Les mollusques, en particulier les bivalves, sont des **modèles d'intérêt** (Rittschof & McClellan-Green, 2005). Les mollusques sont communs et souvent abondants, d'une

taille suffisante pour réaliser des analyses, faciles à échantillonner et importants du point de vue économique et écologique. La possibilité de travailler sur différentes classes d'âge depuis les embryons jusqu'aux adultes est avantageuse. Le fait que la plupart des adultes soient sessiles ou sédentaires et, pour certains, leur mode de nutrition de type suspensivore font des mollusques des candidats idéaux pour l'étude des effets des polluants organiques et métalliques. En effet, ils sont exposés aux fluctuations physico-chimiques de l'environnement (température, salinité, contaminants chimiques, etc) sans possibilité de fuite et peuvent accumuler les polluants sans subir d'effets létaux aux concentrations environnementales. De plus, leur physiologie est relativement bien connue et ils ont tendance à s'établir dans des régions où des espèces moins robustes ne peuvent pas survivre. De ce fait, les bivalves répondent à tous les critères d'un indicateur quantitatif biologique (Cossa, 1985; Lopez-Barea & Pueyo, 1998). Les bivalves ont été utilisés pour estimer la qualité des écosystèmes côtiers dans plusieurs programmes de surveillance, tel que le Réseau National d'Observation de la qualité de l'eau (RNO) en France et le Mussel Watch Project aux Etats-Unis (Wade *et al.*, 1998). Ces projets représentent un effort concerté permettant d'analyser les tendances spatiales et temporelles de la contamination chimique de l'environnement marin en utilisant les **huîtres** et les moules comme des **espèces indicatrices** (Lorteau *et al.*, 1995a).

Depuis le début des années 60, la communauté scientifique a pris conscience des effets à long terme des composés toxiques et de leurs **risques potentiels pour les écosystèmes terrestres et aquatiques**. La majeure partie des polluants ne sont pas dégradables et ont de longues durées de vie dans les écosystèmes marins. Le comportement des organismes vis-à-vis d'un polluant dépend du xénobiotique considéré. Le plus souvent, le composé est bioaccumulé, puis biotransformé ou excrété. Les effets biologiques des xénobiotiques résultent surtout de la métabolisation ou biotransformation à l'intérieur de l'organisme (van der Oost *et al.*, 2003). **L'altération d'une ou plusieurs fonctions biologiques est susceptible de modifier l'homéostasie et la capacité d'adaptabilité de ces organismes avec pour conséquence la remise en cause de leur croissance, de leur reproduction, voire de leur survie.**

L'**écotoxicologie** est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leur action sur l'environnement. Elle fait intervenir l'utilisation de **biomarqueurs** ayant pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution (van der Oost *et al.*, 2003). Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, de l'organisme, de la population ou de l'écosystème qui peut être reliée à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic *et al.*, 1997; Galloway & Depledge, 2001; van der Oost *et al.*, 2003).

Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés (population et écosystème) sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce d'effets toxiques.

De façon générale, le premier impact d'un paramètre environnemental tel qu'un polluant se produit à l'échelle cellulaire avec une action directe sur la respiration, les échanges ioniques, mais aussi sur le **système immunitaire**. En effet, les composés toxiques peuvent causer, directement ou indirectement, des effets nuisibles sur les principaux systèmes physiologiques comprenant les systèmes endocrinien, reproducteur, nerveux et immunitaire (Fournier *et al.*, 2000).

Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution des espèces du fait de nombreuses **interactions hôtes-agents infectieux**. Ce système contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les constituants étrangers (virus, bactéries et parasites), en détruisant les cellules néoplasiques et en rejetant les composants du « non-soi » (Krzystyniak *et al.*, 1995). Le système immunitaire comprend un réseau de cellules capables de prolifération et de différenciation, régulées par un ensemble de facteurs solubles, et est intimement intégré à d'autres fonctions de l'organisme, notamment les systèmes nerveux et endocrinien, avec lesquels il communique par l'intermédiaire de médiateurs solubles (Krzystyniak *et al.*, 1995; Kaoussi *et al.*, 2001). Pour ces raisons, il est extrêmement vulnérable face aux produits toxiques. Les xénobiotiques présents dans l'environnement peuvent agir sur les composants du système immunitaire et interférer ainsi avec leurs fonctions de protection de l'organisme (Wong *et al.*, 1992; Krzystyniak *et al.*, 1995; Kaoussi *et al.*, 2001). **L'immunotoxicité** peut être ainsi définie comme la discipline qui étudie l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique ou par tout autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire à la suite d'une exposition de l'organisme hôte. Une substance chimique est considérée comme immunotoxique lorsqu'elle ou son métabolite produit des effets non désirés, comprenant une action directe ou indirecte sur le système immunitaire. Ces effets indésirables des xénobiotiques peuvent être classés fonctionnellement, comme **l'immunosuppression**, l'allergie ou hypersensibilité (traduite par une **immunostimulation**), l'autoimmunité (réponse du système immunitaire dirigée contre les constituants du « soi »), ou la diminution de la résistance aux maladies et l'augmentation de la fréquence des cancers (Wong *et al.*, 1992; Krzystyniak *et al.*, 1995; Colosio *et al.*, 2005). Comme discipline, l'immunotoxicologie est récente et l'analyse d'atteintes immunologiques induites par l'exposition à une substance chimique ne fait que commencer. Bien que des changements majeurs dans le système immunitaire soient rapidement exprimés en une morbidité allant parfois jusqu'à la mortalité, ils sont souvent précédés de changements subtils de certains des composants du système

immunitaire, ces derniers pouvant alors être utilisés comme des biomarqueurs précoces d'immunotoxicité (Lagadic *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 2000).

Chez les vertébrés, de nombreuses molécules telles que les métaux lourds (mercure, cuivre et cadmium), les HAPs, les PCBs, les pesticides organochlorés (DDT et dieldrine), le PCP (pentachlorophénol), les carbamates (carbaryl, parathion) ont été démontrées comme immunotoxiques dans des modèles expérimentaux (Wong *et al.*, 1992). Cependant, il est difficile de classer les composés sur la base de leurs effets immunotoxiques, car des composés différents peuvent agir sur les mêmes paramètres (Wong *et al.*, 1992; van der Oost *et al.*, 2003). De plus, le système immunitaire pouvant être influencé par une large gamme de facteurs stressants, les biomarqueurs immunologiques fournissent une mesure intégrée de l'exposition et peuvent refléter une exposition simultanée à plusieurs facteurs (van der Oost *et al.*, 2003).

Chez les huîtres, le système de défense repose essentiellement sur des cellules circulantes, les **hémocytes**, qui montrent différentes activités, notamment la phagocytose, la production et la libération de molécules actives et la destruction de corps étrangers. L'étude de la modulation du système immunitaire ou immunomodulation chez les mollusques bivalves est devenue l'une des voies de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets physiologiques de facteurs environnementaux (Oubella & Auffret, 1995). Les données disponibles à l'heure actuelle montrent l'altération des activités hémocytaires chez des mollusques bivalves et en particulier des huîtres exposées à différents types de contaminants tels que les HAPs (Sami *et al.*, 1992, 1993; Coles *et al.*, 1994; Wootton *et al.*, 2003a), les PCBs (Pipe & Coles, 1995; Canesi *et al.*, 2003), les pesticides (Baier-Anderson & Anderson, 2000; Alves *et al.*, 2002), les métaux lourds (Auffret *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2004) ou encore les sédiments contaminés par différentes molécules (Cajaraville *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 2001, 2003).

En France, dans les années 94-95, les ostréiculteurs ont été confrontés en **période estivale** à l'apparition de **mortalités massives** essentiellement des cheptels de naissain **d'huître creuse**, *Crassostrea gigas* (Gouletquer *et al.*, 1998). Des épisodes de mortalités du même type ont également été observés dans d'autres pays, notamment au Japon (Koganezawa, 1974) et aux Etats-Unis (Beattie, 1988). De nombreuses études ont été développées et ont fait apparaître une conjugaison de différents facteurs pouvant être à l'origine du phénomène (facteurs environnementaux (température, nourriture), physiologiques (maturation), génétiques) (Gouletquer *et al.*, 1998). La présence **d'agents infectieux** a été rapportée. Le virus de type herpès de l'huître (Ostreid Herpesvirus 1, OsHV-1) a été détecté en microscopie électronique à transmission au cours

de certains de ces épisodes de mortalités (Nicolas *et al.*, 1992; Renault *et al.*, 1994a, 2000a, b; Le Deuff & Renault, 1999). Différentes souches de *Vibrio splendidus* et de *V. aesturianus* ont également été détectées lors de certaines mortalités (Lacoste *et al.*, 2001c; Le Roux *et al.*, 2002; Waechter *et al.*, 2002). Si un unique agent infectieux n'a pas été rapporté de manière systématique dans les phénomènes de mortalité estivale chez l'huître creuse, *C. gigas*, il n'en reste pas moins évident que certains pathogènes ont été détectés et reliés aux phénomènes. Afin de mieux appréhender ce lien, il apparaît déterminant **d'expliquer les relations qui peuvent exister entre l'apparition et le développement des maladies, les capacités de défense de ces animaux et l'environnement dans lequel ils vivent**. Ces phénomènes de mortalité constituent un sujet préoccupant pour la profession ostréicole. L'étude des mortalités estivales a fait l'objet de recherches à l'IFREMER dans le cadre du projet MOREST (MORTalités ESTivales, 2001-2005). Ce projet regroupe un grand nombre de laboratoires français.

L'émergence de maladies infectieuses représente un facteur limitant au bon développement de l'aquaculture et engendre de lourdes pertes économiques. De plus, l'intensification des élevages impliquant un nombre restreint d'espèces, le confinement ainsi que le transfert d'animaux entre bassins de production et entre pays ont favorisé et favorisent encore aujourd'hui l'émergence et la dissémination de maladies infectieuses (Grizel, 1996b; Gouletquer & Héral, 1997). Cependant, bien que l'impact des maladies en aquaculture soit important, peu de moyens de lutte sont aujourd'hui disponibles. La vaccination, utilisée pour les élevages de poissons, n'est pas envisageable pour les bivalves qui ne possèdent pas de mémoire immunitaire. La **prévention** est donc aujourd'hui la meilleure méthode pour lutter contre ces pathogènes sur la base d'un diagnostic rapide et sûr. Différentes techniques prophylactiques sont également envisageables (déplacement des cheptels en eaux profondes afin de limiter la contamination des animaux par des agents infectieux ; contrôle des paramètres physico-chimiques de l'eau, de la nourriture et application d'antibiotiques dans les éclosiers-nurseries ; programmes de sélections d'animaux génétiquement résistants aux maladies ; développement de probiotiques) (Grizel, 1996a; Naciri-Graven *et al.*, 1998; Roch, 1999). Enfin, l'acquisition de connaissances dans ce domaine apparaît indispensable. Les maladies infectieuses étant responsables de mortalités dans les élevages de bivalves d'intérêt économique tels que les huîtres, 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.

Selon Snieszko (1974), le déclenchement d'une maladie infectieuse chez un hôte résulte d'interactions conduisant à un déséquilibre entre l'hôte et un agent pathogène qui peut être dû à des facteurs externes (facteurs physico-chimiques, polluants) et/ou internes aux deux protagonistes (virulence de l'agent infectieux, sensibilité accrue de l'hôte) (**Figure 1**).

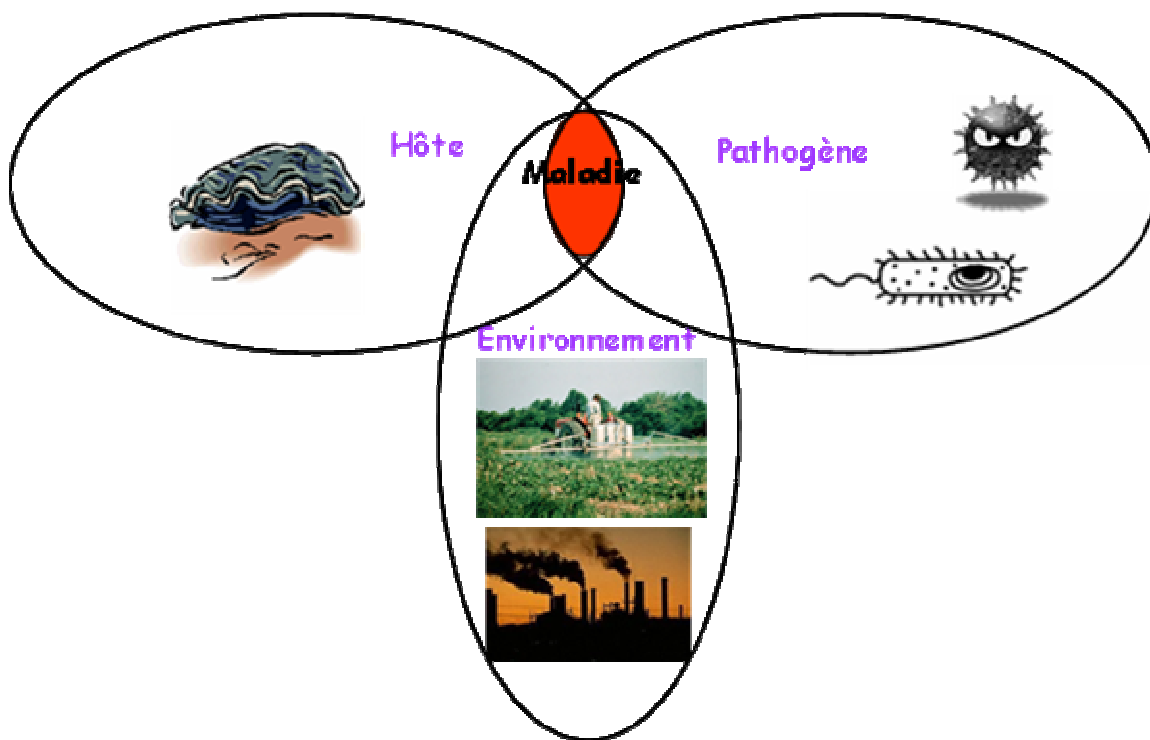


Figure 1 : schéma des interactions environnement - hôte - pathogène (modifié d'après Snieszko, 1974).

Les interactions qui existent entre l'hôte et le pathogène peuvent donc être influencées par l'environnement. La gestion d'une maladie nécessite donc la description des interactions entre les trois éléments suivants : hôte, environnement et agent pathogène.

Une augmentation de la sensibilité à des infections virales, bactériennes et parasitaires et aux tumeurs est un des effets les plus dangereux (et souvent léthal) des xénobiotiques. Cela a conduit à l'étude de modèles d'infections permettant de corréler les altérations immunitaires avec la résistance de l'hôte (Wong *et al.*, 1992). **Chez les vertébrés**, les premières données disponibles laissent entrevoir des conséquences néfastes pour les individus exposés quelles que soient les espèces considérées (Kaoussi *et al.*, 2001). Ainsi, l'épidémie due à un virus proche de celui de la maladie de Carré, qui a décimé plus des deux tiers des phoques de la Mer du Nord à la fin des années 80, s'explique probablement par le fort degré de pollution chimique des eaux marines (Van Loveren *et al.*, 2000). De la même manière, les marsouins des zones portuaires morts de maladies infectieuses présentent une concentration en PCBs plus forte que ceux morts de traumatismes physiques (Jepson *et al.*, 2005). La recrudescence de néoplasies et des cas d'infections virales à iridovirus chez certaines espèces de poisson est reliée à la pollution des eaux marines et estuariennes (Grinwis *et al.*, 2001). Chez les poissons, des études ont rapporté que des expositions de longue durée à du carbaryl, du 2,4-D ou du DDT conduisent à l'apparition de maladies bactériennes ou parasitaires (Snieszko, 1974). Chez l'homme, une étude a montré que la susceptibilité aux otites moyennes est associée à l'exposition pré-natale aux composés organochlorés chez les enfants Inuit (Dewailly *et al.*, 2000). Les jeunes habitants d'une commune contaminée par des pesticides présentent davantage de risques de contracter un zona que ceux des communes voisines (Arndt *et al.*, 1999). Certains métaux lourds (mercure, cadmium, plomb) possèdent également des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose et/ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire (Hamada *et al.*, 1997; Kim & Sharma, 2004). Les études *in vivo* dans différents modèles animaux corroborent très bien les résultats des études menées *in vitro*.

Cependant, s'il existe de nombreux exemples concernant les relations qui peuvent exister entre pollution et augmentation de la sensibilité aux maladies chez les mammifères et les vertébrés de manière plus générale, **peu de travaux ont été réalisés chez les invertébrés** et en particulier les mollusques bivalves (Galloway & Depledge, 2001). Il convient de s'interroger sur les effets néfastes de ces composés sur les mollusques bivalves, en particulier les huîtres, vivant dans les zones littorales et sur leur impact sur les productions. Certaines études rapportent que l'altération des paramètres hématocytaires chez des bivalves marins exposés à des contaminants

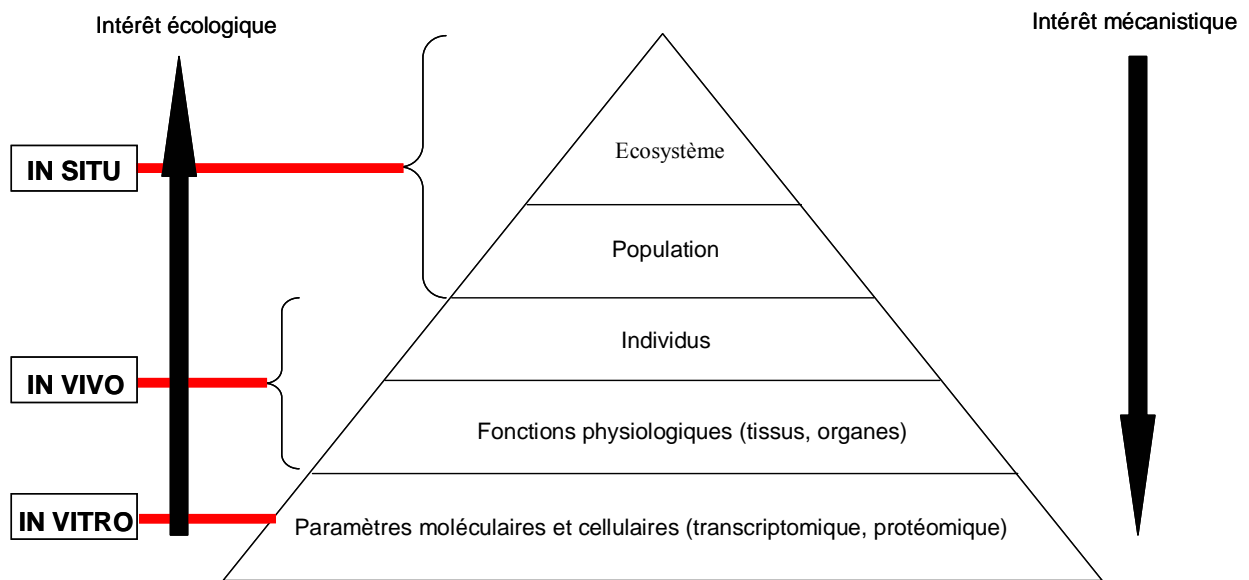


Figure 2 : représentation schématique des différents niveaux d'organisation pouvant être affectés par les polluants et de leur intérêt au niveau écologique et mécanistique ; localisation des niveaux étudiés dans ce travail (modifié d'après Snape *et al.*, 2004).

environnementaux peut être associée à l'augmentation de la sensibilité aux maladies (Coles *et al.*, 1994, 1995; Pipe & Coles, 1995; Pipe *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2002). Dans les milieux estuariens contaminés, les coquillages pourraient se montrer plus sensibles au développement des maladies. Face aux modulations de l'environnement que subissent les animaux, il apparaît primordial d'étudier leur effet sur le système immunitaire des bivalves. Ce système intervient dans la résistance aux maladies et apparaît potentiellement comme un des plus sensibles aux effets des contaminants.

Dans ce contexte, **l'huître creuse, *Crassostrea gigas***, étant données sa position phylogénique et son importance économique pour l'aquaculture, apparaît comme un modèle de choix pour tenter de définir l'importance du système immunitaire comme cible de polluants chez les invertébrés et de déterminer les relations entre ces polluants et la sensibilité aux maladies infectieuses (Cosson, 2000; Akcha *et al.*, 2000). Le présent travail a donc consisté à étudier les relations entre système de défense de l'huître, présence de polluants et maladies infectieuses. Dans un premier temps, la **cytométrie de flux** a été choisie comme outil pour réaliser le suivi de **biomarqueurs** (paramètres hématocytaires) chez *C. gigas*. Après des mises au point méthodologiques, ces biomarqueurs ont permis de suivre **l'effet de polluants** dans le cadre d'expériences réalisées *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. L'ensemble des études **à ces différentes échelles (cellules, individus et population)** permet d'avoir un aperçu global des effets de polluants (**Figure 2**). L'étude de l'influence de polluants sur **l'expression de gènes suspectés comme impliqués dans les mécanismes de défense** a été réalisée chez des huîtres creuses infectées ou non par des bactéries du genre *Vibrio*. Pour cela, **la PCR en temps réel** a été utilisée.

Le travail de thèse a débuté par un **développement de méthodes**. L'objectif de cette partie était de mettre au point le suivi en cytométrie de flux de paramètres hématocytaires chez l'huître creuse, *C. gigas*, en testant différents protocoles, en comparant les protocoles avec ceux utilisés par d'autres laboratoires, en étayant ces protocoles par la recherche d'activités dans d'autres types cellulaires chez une autre espèce de bivalve et enfin en tentant d'améliorer les conditions de maintien des hémocytes *in vitro*.

La deuxième partie a consisté à la réalisation d'**expériences *in vitro*** afin d'analyser l'effet de facteurs environnementaux (température, salinité) et de polluants sur différentes fonctions hématocytaires de *C. gigas*, sur la base de protocoles développés dans la partie précédente. Elles ont permis de tester des molécules représentatives de différentes catégories de polluants (HAPs, PCBs et pesticides) dont le potentiel immunotoxique est rapporté dans la littérature. Les expériences ont consisté en des contacts entre les hémocytes et les polluants à différentes concentrations. L'objectif était de démontrer qu'il est possible de suivre les effets de certains polluants sur les paramètres

hémocytaires et de déterminer ainsi quelles sont les molécules qui peuvent induire une modulation de la réponse hémocytaire chez l'huître creuse (mortalité cellulaire, pourcentages de granulocytes, activité estérase, production d'espèces oxygénées réactives (EOR), présence de lysosomes, phagocytose).

La troisième partie du travail a consisté en la réalisation **d'expériences *in vivo*** en laboratoire afin de démontrer l'effet de facteurs environnementaux (température, salinité) et de polluants sélectionnés sur les paramètres hémocytaires choisis. Un des objectifs de ces expériences était également de confirmer les effets obtenus *in vitro* par la réalisation de contamination en laboratoire à des doses environnementales. Le diuron, un mélange de huit pesticides présents dans le bassin de Marennes-Oléron et le chlorure de mercure ont été utilisés. Les pesticides sont considérés comme représentatifs des contaminants des eaux du bassin. Bien que le chlorure de mercure ne soit pas un contaminant majeur du bassin de Marennes-Oléron, ses propriétés en font une molécule de choix à étudier. Il s'agit en effet d'une molécule immunotoxique et dans le cadre des expériences, elle pouvait servir de molécule de référence. Les paramètres hémocytaires ont été évalués au cours de la période de contamination et à son issue (sept jours).

La suite du travail *in vivo* a consisté en l'étude de **l'effet de ces polluants sur la sensibilité de *C. gigas* aux maladies infectieuses**. Dans ce travail, les polluants sont considérés comme un facteur capable d'affaiblir l'animal et de le rendre plus sensible à la présence d'agents pathogènes. Ce modèle d'induction d'une immunosuppression peut donc faciliter la reproduction de maladies. Après un contact de sept jours avec les pesticides, des bactéries du genre *Vibrio* ont été injectées dans les huîtres. La mortalité des animaux témoins et contaminés a été suivie après l'injection de bactéries. Plusieurs gènes suspectés d'être impliqués dans le système immunitaire et plus particulièrement dans le mécanisme de phagocytose ont été sélectionnés. Leur expression a été suivie après une contamination seule et après une contamination suivie d'une injection de bactéries.

Dans une dernière partie, des **expériences *in situ*** ont été réalisées dans le cadre du programme de recherche MOREST (IFREMER) afin de suivre l'évolution de paramètres hémocytaires au cours des mortalités estivales en 2002 et 2003 sur le site de Ronce les Bains (Charente-Maritime). Les cheptels d'huîtres ayant présenté par le passé des épisodes de mortalités estivales, il apparaissait important de caractériser les variations potentielles des activités hémocytaires pendant cette période de l'année. **Différents cheptels d'animaux** ont été placés sur le terrain (diploïdes de captage naturel et d'écloserie, triploïdes), donc exposés aux polluants présents dans le bassin de Marennes-Oléron. Des dosages de divers herbicides ont été réalisés dans l'eau et dans les animaux en 2003. Cette expérience a permis d'intégrer plusieurs facteurs et d'étudier leur relation avec les paramètres hémocytaires des huîtres creuses pendant la période de maturation.

Rappels bibliographiques



Jfremer J. Barrot

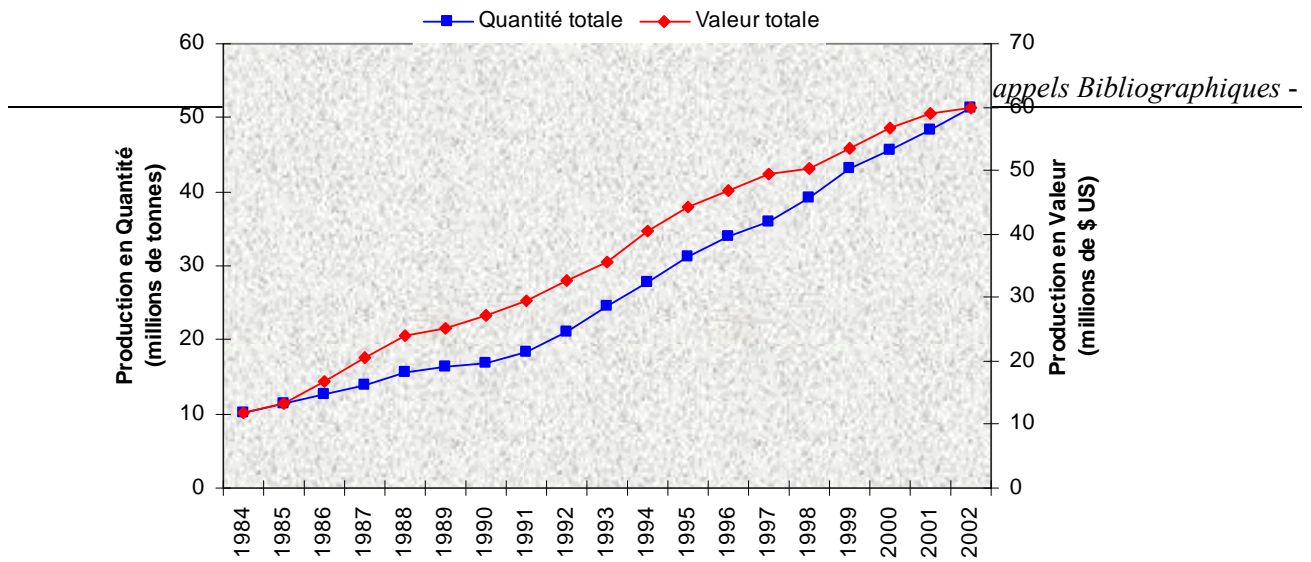


Figure 3 : tendance globale de la production aquacole mondiale toutes espèces confondues (FAO, 2005).

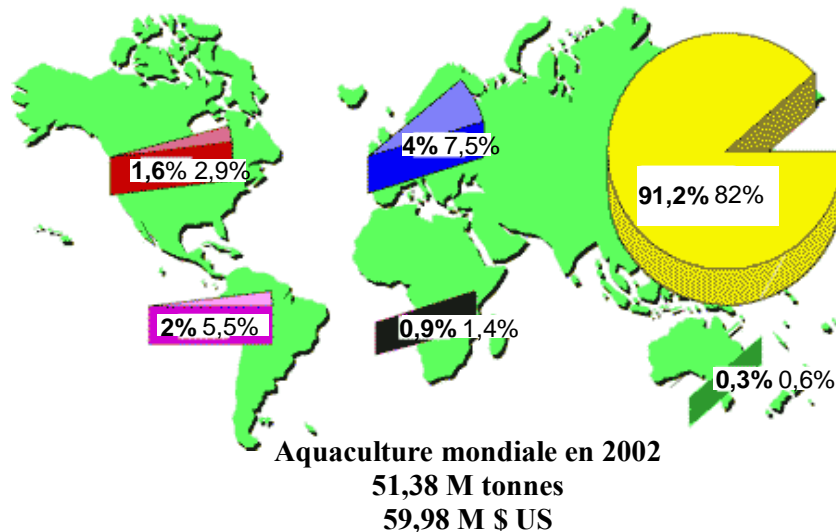


Figure 4 : comparaison de la contribution (%) en tonnage (a) et en valeur (b) des continents à la production par l'aquaculture en 2002 (FAO, 2005).

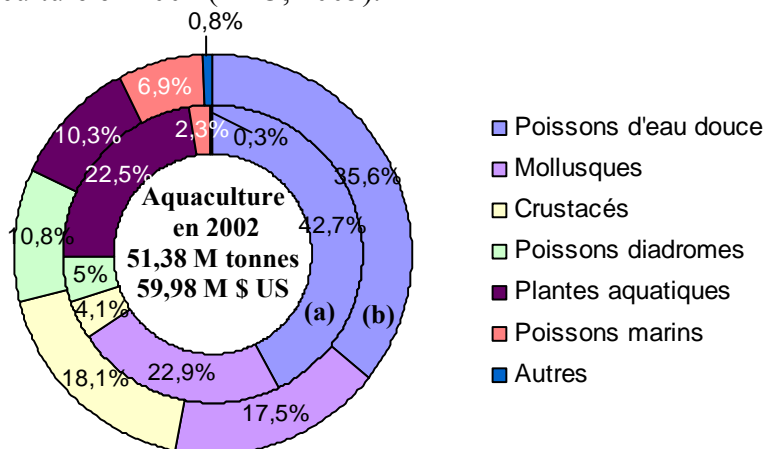


Figure 5 : répartition de la production en tonnage (a) et en valeur (b) des principaux groupes d'organismes aquatiques en 2002 (FAO, 2005).

I Aquaculture mondiale et conchyliculture

I.1. Importance de l'aquaculture dans le monde

La FAO définit l'« aquaculture » comme étant « l'élevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques, etc) nécessitant deux conditions : une intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production (mise en charge régulière, alimentation, protection) et une propriété individuelle ou juridique du stock en élevage. Les prémices de l'aquaculture sont apparues 2 000 ans avant Jésus Christ avec la mise en place de la pisciculture en Chine et en Egypte (carpe et tilapia). L'ostréiculture a été développée en l'an 600 avant Jésus Christ par les Romains. L'aquaculture existe donc depuis longtemps, mais elle ne s'est vraiment développée que depuis les dernières décennies, la production mondiale étant cinq fois plus importante en 2002 qu'en 1984 (**Figure 3**). L'intérêt de l'aquaculture actuelle est de pouvoir produire des espèces à forte valeur ajoutée en quantité (crevettes, écrevisses, truites, soles, saumons et huîtres).

L'aquaculture est surtout réalisée sur le continent asiatique qui comptabilise 91.2 % en tonnage et 92 % en valeur de l'aquaculture totale pratiquée dans le monde. L'Europe est en deuxième position avec 4 % en tonnage et 7.5 % en valeur de l'aquaculture mondiale. Viennent ensuite l'Amérique du Sud et du Nord, l'Afrique, et dans une moindre mesure l'Océanie (**Figure 4**). Avec 36.5 millions de tonnes en 2002, la Chine est le premier producteur mondial. La France se situe au 17^{ème} rang avec environ 250 000 tonnes (FAO, 2005).

I.2. Les mollusques en aquaculture

Parmi toutes les espèces produites en aquaculture, en 2002, les mollusques représentent 22.9 % de la production mondiale (soit 11.8 M de tonnes) et 17.5 % de la valeur associée (soit 10.5 millions \$ US) (**Figure 5**).

Les mollusques sont principalement produits dans les eaux de mer (99 % des espèces produites). Avec un peu plus de 4.3 millions de tonnes en 2002, les ostréidés représentent 36.6 % de la production mondiale de mollusques et 34.1 % de la valeur associée (**Figure 6**). Le pourcentage du chiffre d'affaire des palourdes et autres vénéréidés ainsi que des pétoncles (Pectinidés) est plus important que celui de leur production (respectivement 27.7 % et 16.1 % en valeur pour 20.5 % et 10.4 % en tonnage), contrairement aux moules, produit à plus faible valeur commerciale (6.7 % en valeur et 12.3 % en tonnage) (**Figure 6**) (FAO, 2005).

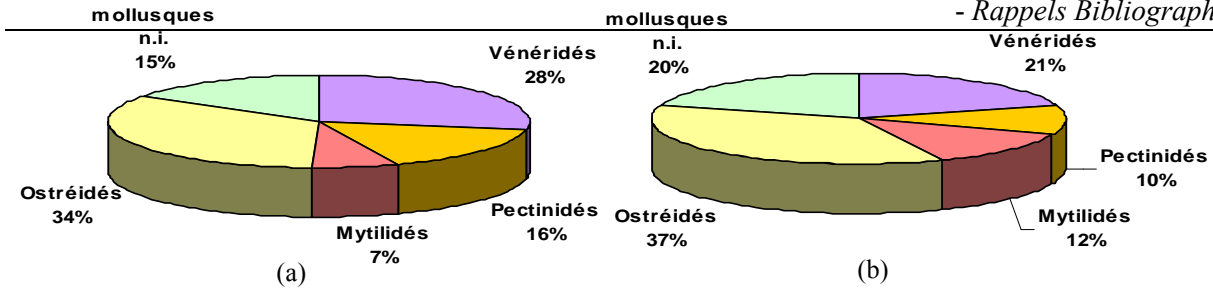


Figure 6 : répartition de la production aquacole mondiale de mollusques pour les principales familles en tonnage (a) et en valeur (b) (FAO, 2005).

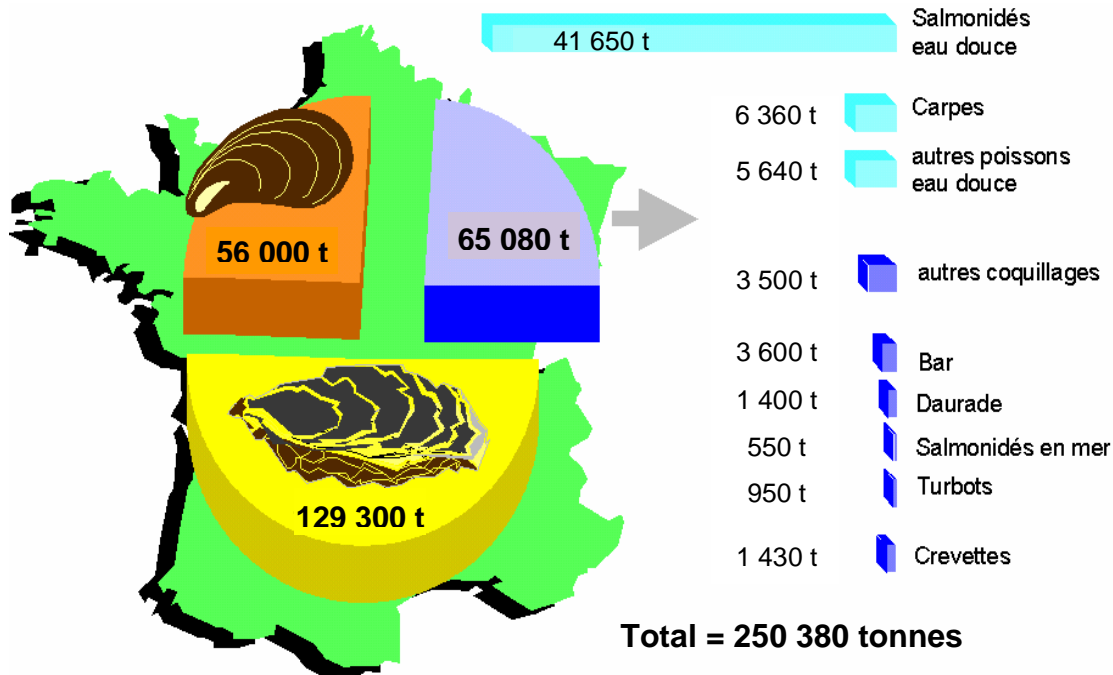


Figure 7 : production aquacole française en 2003 (Ministère de l'Agriculture, 2005).

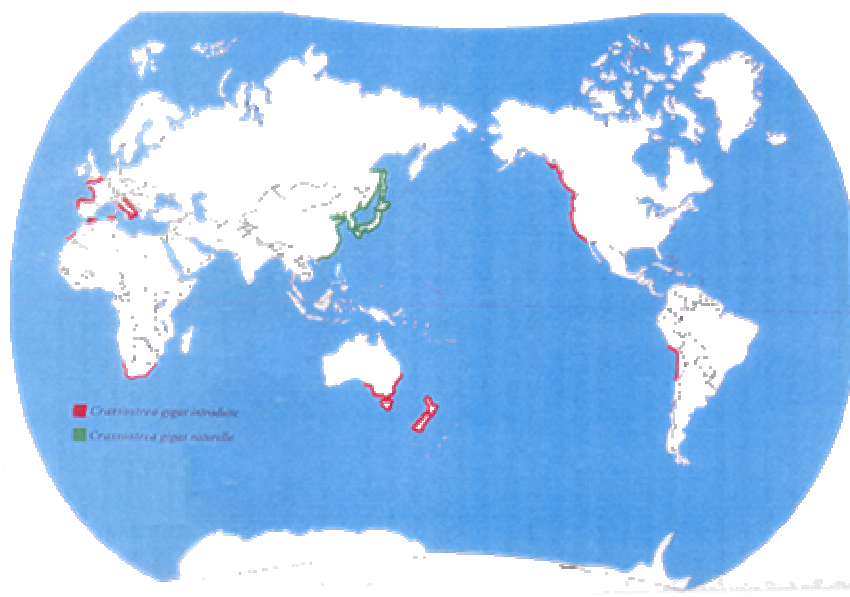


Figure 8 : répartition géographique de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

I.3. L'aquaculture et la conchyliculture en France

L'aquaculture en France intervient au 14^{ème} rang dans l'économie française du secteur maritime, pour un chiffre d'affaire de 558 M€ et 4 150 entreprises. L'aquaculture française repose principalement sur la conchyliculture (321 M €) et de manière moins importante sur la perliculture à Tahiti (165 M €) et l'aquaculture nouvelle (poissons et crustacés) (72 M €).

La production aquacole est principalement la production ostréicole avec 129 300 tonnes en 2003 (128 000 tonnes d'huîtres creuses et 1 300 tonnes d'huîtres plates) (**Figure 7**). La mytiliculture vient en seconde position avec près de 56 000 tonnes (CNC, 2005). Les salmonidés d'eau douce se placent en troisième position (41 650 tonnes) (**Figure 7**). La France fut longtemps le premier producteur mondial de truites, mais est passée en 1996 en seconde position derrière le Chili. Viennent ensuite les productions de carpes (6 360 tonnes) et autres poissons d'eau douce (5 640 tonnes) (**Figure 7**). Les produits issus de l'aquaculture marine nouvelle (bars, daurades, crevettes, etc) sont à des niveaux de production de 500 à 3 600 tonnes. Les autres coquillages représentent 3 500 tonnes (2 000 tonnes de coques et 1 500 tonnes de palourdes) (Ministère de l'Agriculture, 2005).

La production conchylicole est réalisée sur des superficies relativement importantes : 52 600 concessions existaient sur le domaine public maritime en 2001, représentant 18 100 hectares et 1 570 km de lignes de bouchot. Les entreprises exploitent également 5 530 parcelles sur domaine privé d'une superficie totale de 2 540 hectares.

Environ 5 700 concessionnaires, soit environ 3 700 exploitations conchylicoles, sont recensées. Ces exploitations représentent 21 500 emplois dont 7 000 à temps plein, soit 21 M € de chiffre d'affaire. Ce sont pour l'essentiel des entreprises familiales (79 %), qui ont une activité de production, mais aussi de commercialisation. Sur l'ensemble de ces exploitations, 85 % travaillent sur les huîtres, de façon exhaustive ou non, et 32 % sur les moules.

I.4. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

I.4.1. Présentation

Originnaire du Japon, l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (connue aussi sous les noms d'huître du Pacifique ou d'huître japonaise), du fait de ses qualités (croissance rapide, résistance aux fortes turbidités et aux variations de température) a été progressivement implantée dans de nombreux pays : aux Etats-Unis en 1902, au Canada en 1912, en Australie en 1947, au Cap en Afrique du Sud, en Tasmanie en 1952, en Nouvelle-Zélande en 1971, et en Russie (mer d'Okhotsk) et en mer Noire en 1976 (Grizel, 1996b). Son introduction en France a été effectuée à partir de 1966, et elle a également été introduite au Chili en 1982. De nos jours, *C. gigas* est présente dans 27 pays dont

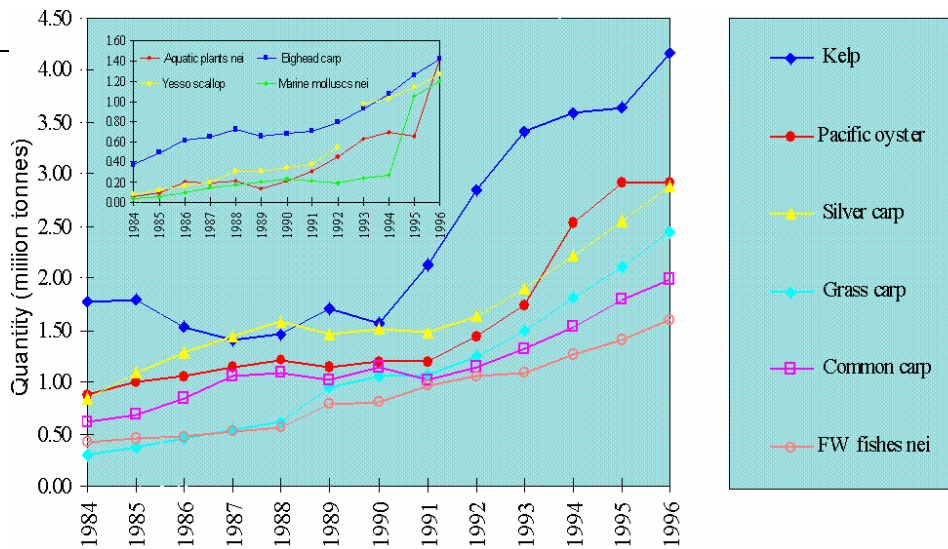


Figure 9 : tendance globale de la production pour les groupes d'espèces et les dix espèces principales (FAO, 2005).

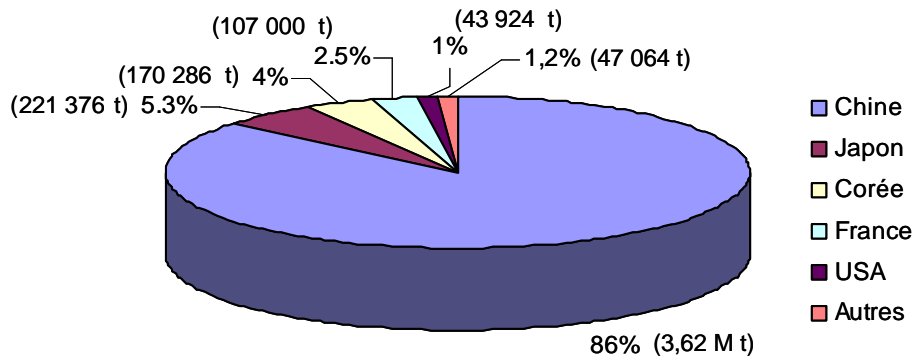


Figure 10 : contribution des différents pays à la production par l'aquaculture d'huîtres creuses en 2002 (FAO, 2005).

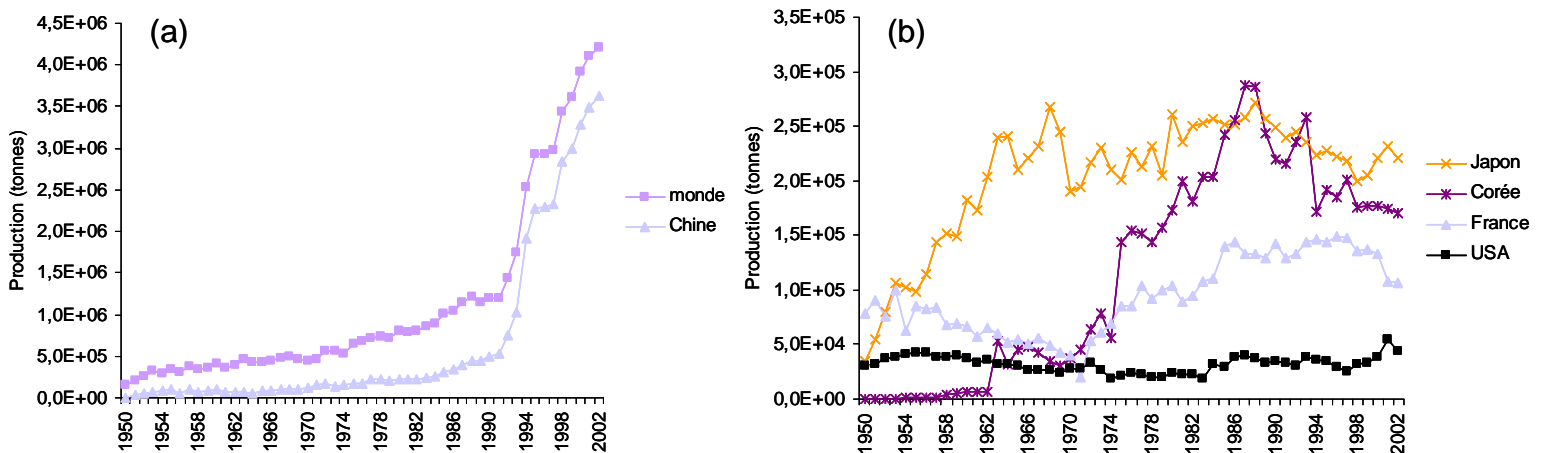


Figure 11 : évolution de la production d'huîtres creuses par aquaculture dans le monde et en Chine (a) et pour les pays les plus concernés (b) entre 1950 et 2002 (FAO, 2005).

seulement la moitié réalisent une aquaculture active (**Figure 8**). Elle est le mollusque le plus cultivé avec une production mondiale supérieure à 4.2 millions de tonnes en 2002 (FAO, 2005).

I.4.2. Production mondiale

En 1996, la production mondiale d'huîtres creuses arrive en deuxième position des espèces les plus produites après le kelp. La production d'huîtres creuses a quasiment triplée entre 1984 et 1996 (**Figure 9**).

La production d'huîtres creuses diffère suivant la zone géographique considérée. En 2002, la Chine constitue le premier pays producteur avec 3.6 millions de tonnes, suivi du Japon (221 000 tonnes), de la Corée (170 000 tonnes) et de la France (107 000 tonnes) (**Figure 10**) (FAO, 2005).

La production totale d'huîtres creuses dans le monde a augmenté de façon exponentielle depuis 1950 pour atteindre 4 millions de tonnes produites en 2002 (**Figure 11a**). La Chine est à l'origine de 95 % de la production mondiale d'huîtres creuses. Plusieurs autres pays contribuent de façon moins importante à la production d'huîtres, notamment la Corée, le Japon, la France et les Etats-Unis. Pour ces pays, la production a augmenté depuis les années 50, puis a diminué en 1970. Ensuite, la production a stagné, voire diminué pour la Corée et le Japon jusqu'à aujourd'hui (**Figure 11b**).

La capture représente une part relativement peu importante dans la production totale d'huîtres creuses (17 781 tonnes en 2002) (FAO, 2005).

I.4.3. Situation en France

I.4.3.1. Production et commerce

La France est le 4^{ème} pays producteur mondial d'huîtres creuses (**Figures 10 et 11**). Cette production résulte de l'élevage des huîtres dans différents sites.

La production conchylicole française commercialisée en 2003 est estimée à 188 800 tonnes dont 128 000 tonnes d'huîtres creuses (CNC, 2005). Les huîtres sont principalement commercialisées à partir de six régions (**Figure 12**) : Basse-Normandie (21.1 %), Bretagne Nord (16 %), Bretagne Sud (16 %), Pays de la Loire (6.3 %), Poitou-Charentes (29.7 %), Aquitaine : (5.5 %) et Méditerranée (5.5 %).

Parmi les départements français produisant des huîtres creuses, La Charente-Maritime prédomine (**Tableau 1**).

La France exporte plus d'huîtres qu'elle n'en importe (respectivement 5 800 et 2 700 tonnes en 2000), ce qui dégage un solde positif de 11,7 M €.

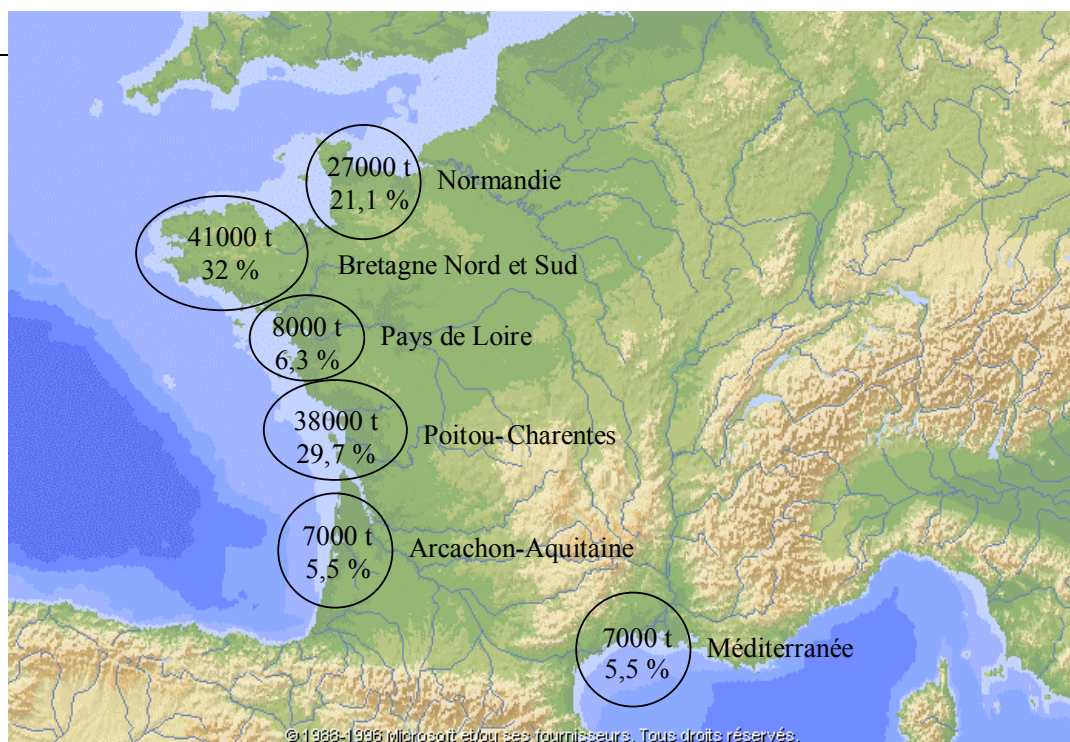


Figure 12 : production française d’huître creuse en 2003 dans les principaux sites d’élevages (CNC, 2005).

Production en 1998 (tonnes)				Production en 1998 (tonnes)			
Départements	Espèce	Pêche	Elevage	Départements	Espèce	Pêche	Elevage
Nord	Bulot	4		Morbihan	Autre/Elevage		775
Seine-Maritime	Autre/pêche	1		Morbihan	Autre/pêche	9	
Seine-Maritime	Bulot	4		Morbihan	Coquille Saint Jacques	73	
Seine-Maritime	Coquille Saint Jacques	4203		Morbihan	Huître		9344
Calvados	Autre/pêche	197		Morbihan	Moule		2623
Calvados	Bulot	10		Loire-Atlantique	Autre/Elevage		671
Calvados	Coquille Saint Jacques	2017		Loire-Atlantique	Autre/pêche	34	
Calvados	Huître		2677	Loire-Atlantique	Bulot	5	
Calvados	Moule	1321	75	Loire-Atlantique	Coquille Saint Jacques	89	
Côtes-d'Armor	Autre/pêche	5729		Loire-Atlantique	Huître		989
Côtes-d'Armor	Bulot	255		Loire-Atlantique	Moule		1470
Côtes-d'Armor	Coquille Saint Jacques	3236		Vendée	Autre/Elevage		161
Côtes-d'Armor	Huître		1503	Vendée	Autre/pêche	3	
Côtes-d'Armor	Moule		4750	Vendée	Bulot	2	
Ile-et-Vilaine	Autre/Elevage		1065	Vendée	Coquille Saint Jacques	5	
Ile-et-Vilaine	Autre/pêche	147		Vendée	Huître		6759
Ile-et-Vilaine	Bulot	1462		Vendée	Moule		2070
Ile-et-Vilaine	Coquille Saint Jacques	693		Charente-Maritime	Autre/Elevage		533
Ile-et-Vilaine	Huître		3200	Charente-Maritime	Autre/pêche	234	
Ile-et-Vilaine	Moule	39	11633	Charente-Maritime	Bulot	5	
Finistère	Autre/Elevage		366	Charente-Maritime	Coquille Saint Jacques	35	
Finistère	Autre/pêche	402		Charente-Maritime	Huître		41531
Finistère	Bulot	121		Charente-Maritime	Moule		9819
Finistère	Coquille Saint Jacques	561		Gironde	Autre/Elevage		6
Finistère	Huître		3993	Gironde	Autre/pêche	389	
Finistère	Moule		1322	Gironde	Huître		5918
Bouches-du-Rhône	Autre/pêche	52		Gironde	Moule	70	
Bouches-du-Rhône	Moule	3		Var	Moule		114

Tableau 1 : évaluation des tonnages d’élevage d’huîtres creuses en 1998 dans les différents départements français. Il manque les données concernant le département du Languedoc Roussillon (Réseau National des Données sur l’Eau, 2003).

I.4.3.2. Historique de l'ostréiculture en France

Les huîtres ont été largement consommées par les hommes préhistoriques, des traces de cette consommation ont été retrouvées dans différentes zones du globe. Les Romains sont les précurseurs de l'ostréiculture européenne, ils aidèrent au développement des techniques lors de l'invasion de la Gaule. Une nette récession dans le commerce de l'huître a marqué le Moyen Age, la consommation se limitait aux populations côtières. La Renaissance fut au contraire une période de grande diffusion : au XVI^{ème} siècle, Paris comptait 4 000 revendeurs d'huîtres, la plupart ambulants.

La façade nord-atlantique et notamment le littoral français ont longtemps été le lieu privilégié d'importants gisements naturels d'huîtres plates, *Ostrea edulis*. Dès l'époque romaine, ces gisements ont été exploités. A partir du XVII^{ème} siècle, la culture de ce bivalve s'est développée avec des techniques d'élevage après collecte des naissains sur les gisements naturels. Les premiers arrêtés visant à limiter les récoltes et la surexploitation des gisements pendant la période reproductrice datent de 1750. Pourtant, l'intensification de l'effort de pêche à laquelle s'ajoutent des années de faible recrutement ont contribué au déclin des gisements d'huîtres plates, de surcroît affaiblis par des épisodes de mortalité. Les plus importants ont eu lieu en 1920 et à partir de 1969 et 1979 avec l'apparition respective des parasites protozoaires *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974) et *Bonamia otreae* (Pichot *et al.*, 1980) (**Figure 13**).

Pour faire face à cette pénurie d'huîtres plates, des huîtres creuses portugaises, *Crassostrea angulata*, ont été importées à partir de 1860 dans le bassin d'Arcachon. En 1868, au cours d'un des transports en provenance du Portugal, le bateau « Le Morlaisien » s'est réfugié dans l'estuaire de la Gironde au cours d'une tempête l'obligeant à rejeter sa cargaison à la mer. L'expansion de *C. angulata* fut ensuite très rapide. Dès 1873, sa présence était enregistrée dans l'estuaire de la Gironde, un an plus tard dans le bassin de Marennes-Oléron et en 1878 à La Rochelle et le long de l'île de Ré (Barré, 1981; Héral, 1989). Elle est devenue l'espèce d'huître dominante sur le littoral français (avec une limite Nord dessinée par la Vilaine). Entre 1966 et 1973, *C. angulata* a subi des mortalités massives le long des côtes françaises. Ces mortalités ont été associées à deux maladies :

- La première maladie est la « Maladie des branchies », dont l'agent étiologique suspecté est un virus appelé virus de la nécrose des branchies. Ce virus est considéré comme à l'origine des mortalités entre 1966 et 1968. La maladie se traduisait par la présence de lésions sur les branchies et les palpes labiaux (Comps, 1970).

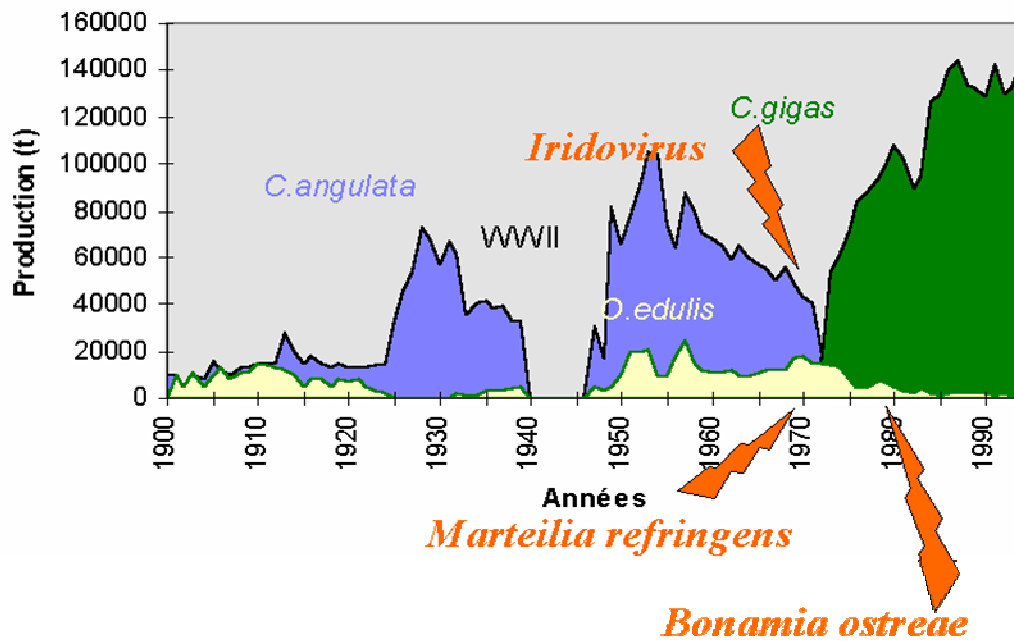


Figure 13 : évolution de la production ostréicole en France depuis 1900 : tonnage par espèce (Goulletquer & Héral, 1997).

- La seconde maladie est la « Maladie hémocytaire », dont l'agent suspecté est un virus de type iridovirus. Cette maladie a affecté les huîtres adultes de 1970 à 1973, sans description de lésions branchiales. Les fortes mortalités observées ont abouti à la quasi totale extinction de l'espèce dans les eaux atlantiques françaises en 1973. Des analyses en histologie ont permis de détecter des hémocytes anormaux présentant des corps d'inclusion cytoplasmiques (Comps *et al.*, 1976). Des particules virales comparables à celles observées chez les animaux atteints de la « Maladie des branchies » ont été détectées chez les huîtres portugaises affectées par la « Maladie hémocytaire ».

Ces maladies sont apparues de manière concomitante avec les premières importations frauduleuses d'huître creuse du Pacifique, *C. gigas*, sur le littoral français (1966), suggérant l'hypothèse de l'introduction accidentelle des agents infectieux responsables par les premières huîtres *C. gigas* importées (Barré, 1981) (**Figure 13**). De plus, ces huîtres étaient résistantes aux deux maladies ayant décimé l'huître portugaise.

Pour faire face à la disparition de *C. angulata*, la décision fut prise d'importer de manière massive l'huître creuse, *C. gigas*, en France. Les stocks importés provenaient du Japon (Préfecture de Myagi) pour le naissain et de la Colombie Britannique (Canada) pour les adultes (« opération Résur ») (Grizel & Héral, 1991). Cependant, les huîtres *C. gigas* de Colombie Britannique provenaient également du Japon (introduction en 1912). La reconstitution des stocks se poursuivit en 1972, 1973 et 1975 (Grizel & Héral, 1991). L'expansion de *C. gigas* a été très importante, aidée par l'absence de compétiteur pour les ressources trophiques, l'huître portugaise étant restreinte au sud de l'Europe au moment de l'importation massive, et les stocks d'huîtres plates *O. edulis* ayant fortement diminué (Meuriot & Grizel, 1984) (**Figure 13**).

En 2003, la production française d'huîtres est constituée à 99 % par la culture de l'huître creuse, *C. gigas*, le 1 % restant étant constitué de la production d'*O. edulis* (CNC, 2005).

I.4.3.3. Techniques d'élevage

Depuis la préhistoire, les hommes ont recherché les coquillages autant comme une nourriture indispensable que pour la variété et la beauté de leurs formes et de leurs couleurs. Dans un premier temps, les gisements naturels fournissaient la quantité nécessaire à la consommation humaine. Avec l'augmentation de la demande, les méthodes de conchyliculture ont évolué et se sont adaptées à chaque espèce.

L'approvisionnement des élevages en huîtres peut se faire de trois façons : la pêche de juvéniles sur les gisements huîtres, le captage naturel (fixation sur des supports appelés collecteurs) de larves produites par les géniteurs des gisements naturels et par les huîtres en élevage, et, enfin,



Figure 14 : captage artificiel de l'huître creuse, *C. gigas* (source : IFREMER).



Figure 15 : élevage à plat de l'huître creuse, *C. gigas* (source : IFREMER).



Figure 16 : élevage sur table de l'huître creuse, *C. gigas* (source : IFREMER).

l'approvisionnement par le biais d'écloseries.

- Pour la conchyliculture française, la production de naissain en écloserie est de plus en plus importante (20 % de la production nationale) en particulier du fait du développement des huîtres triploïdes. Elle apparaît comme une alternative de choix lorsque le captage naturel est déficitaire. La France compte aujourd'hui cinq écloseries d'huîtres privées ou semi-privées : deux en Normandie, deux en Vendée et une en Charente-Maritime.
- Les huîtres pondent en saison estivale. Les ostréiculteurs immergent leurs collecteurs à cette période au moment où les larves se fixent : il s'agit du captage (**Figure 14**). Les collecteurs peuvent être des tuiles chaulées, des tubes ou des coupelles en plastiques, ou des coquilles d'huîtres. Le bassin de Marennes-Oléron et le bassin d'Arcachon permettent un recrutement annuel de juvéniles régulier sur lequel 80 % de la production française repose (Gouletquer & Héral, 1991). Six à 18 mois après la fixation, les naissains sont « détroqués » (séparés de leur substrat ou les uns des autres) puis mis en poche ostréicole pour être placés sur estran sur le sol ou sur des tables en fer surélevées. La deuxième année d'élevage, les huîtres peuvent être élevées à même le sol à raison d'environ 5 kg par m² (**Figure 15**), en surélévation sur des tables (dans des poches ou sur des collecteurs) à raison de 10 kg par poche, en eau profonde sur le sol (Cancale, Quiberon) ou en suspension fixées à des cordes amarrées à des systèmes flottants (tables de l'étang de Thau). Concernant la culture en surélevé, le travail consiste à retourner les poches sur les tables pour empêcher la prolifération des algues, de changer la maille des poches et de dédoubler les huîtres en fonction de leur croissance (**Figure 16**).

L'élevage dure trois ou quatre années. A Marennes-Oléron, lorsque les huîtres ont atteint une taille commerciale (à partir de 40 g), un affinage en claire est effectué. L'affinage est une spécialité de Marennes-Oléron et d'autres régions ostréicoles y transfèrent leur production dans cet objectif. Il est pratiqué sur d'anciens marais salants, les claires. Un certain niveau d'eau de mer est maintenu pour le développement du plancton et notamment d'une algue microscopique (la navicule bleue, *Haslea ostrearia*) au pigment bleu consommée par les huîtres. Ce pigment donne une couleur verte aux huîtres, signe caractéristique du passage en claire. Différentes appellations commerciales sont définies (Fines, Spéciales de claires et Pousses en claires).

L'élevage est réalisé en milieu ouvert et implique des risques importants de contamination par des agents infectieux présents dans le milieu ou par des polluants. De plus, la conchyliculture est une activité traditionnelle liée à des échanges d'animaux entre zones d'élevage géographiquement éloignées, ce qui augmente les risques de dissémination des maladies.

Règne	Animal, Invertébrés
Phylum	Mollusques
Classe	Lamellibranches (Bivalvia) (Linné, 1758)
Ordre	Filibranchia (Woodward, 1892)
Sous-Ordre	Anisomyaria
Super-Famille	Ostreoidea (Rafinesque 1815)
Famille	Ostreidae (Rafinesque, 1815)
Genre	<i>Crassostrea</i> (Sacco, 1897)
Espèce	<i>gigas</i> (Thunberg, 1793)

Tableau 2 : systématique de l'huître creuse, *C. gigas*.

II Le modèle biologique : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Les premiers mollusques sont signalés à l'ère précambrienne (-570 millions d'années). Les premières huîtres sont apparues au début de l'ère secondaire (-250 millions d'années). Les fossiles du Crétacé (-60 millions d'années) renferment plus de 250 espèces d'huîtres. Actuellement, une centaine d'espèces peuplent la quasi-totalité des mers du globe (Waller, 1998).

Les données de ce chapitre sont tirées de plusieurs ouvrages (Grassé, 1960; Galtsoff, 1964; Eble & Scro, 1996; Grizel, 2003).

II.1. Systématique

La systématique des mollusques est très complexe et sujette à controverses. La classification repose sur des critères anatomiques discriminant les grands axes taxonomiques, auxquels s'ajoute la distribution géographique. La forte plasticité morphologique de ces animaux (forme et couleur de la coquille) complique encore les déterminations. Le phylum des mollusques compte plus de 8 000 espèces décrites.

Les huîtres sont des animaux métazoaires (organismes pluricellulaires), protostomiens (bouche formée à partir du blastopore), triploblastiques (possédant entre l'ectoderme et l'endoderme un troisième feuillet individualisé, le mésoderme), coelomates (possédant un coelome), hyponeuriens (système nerveux ventral) à symétrie bilatérale. Leur corps est mou et non segmenté.

L'huître creuse, *C. gigas*, appartient à la classe des Lamellibranches, à l'ordre des Filibranches, au sous-ordre des Anisomyaires, à la superfamille des Ostréoidés et à la famille des Ostréidés (**Tableau 2, Annexe 1a**).

II.2. Anatomie

II.2.1. Coquille

La coquille est sécrétée par la face extérieure et le bord libre du manteau. Elle est formée de trois parties distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur :

- Le périostracum est une membrane organique très mince et colorée, reliée au manteau et sécrétée par des cellules glandulaires spécialisées ;
- La couche des prismes est formée de prismes verticaux de carbonate de calcium (calcite) enrobés par une matrice protéique de conchyoline ;
- La nacre est une structure feuilletée constituée de cristaux d'aragonite.

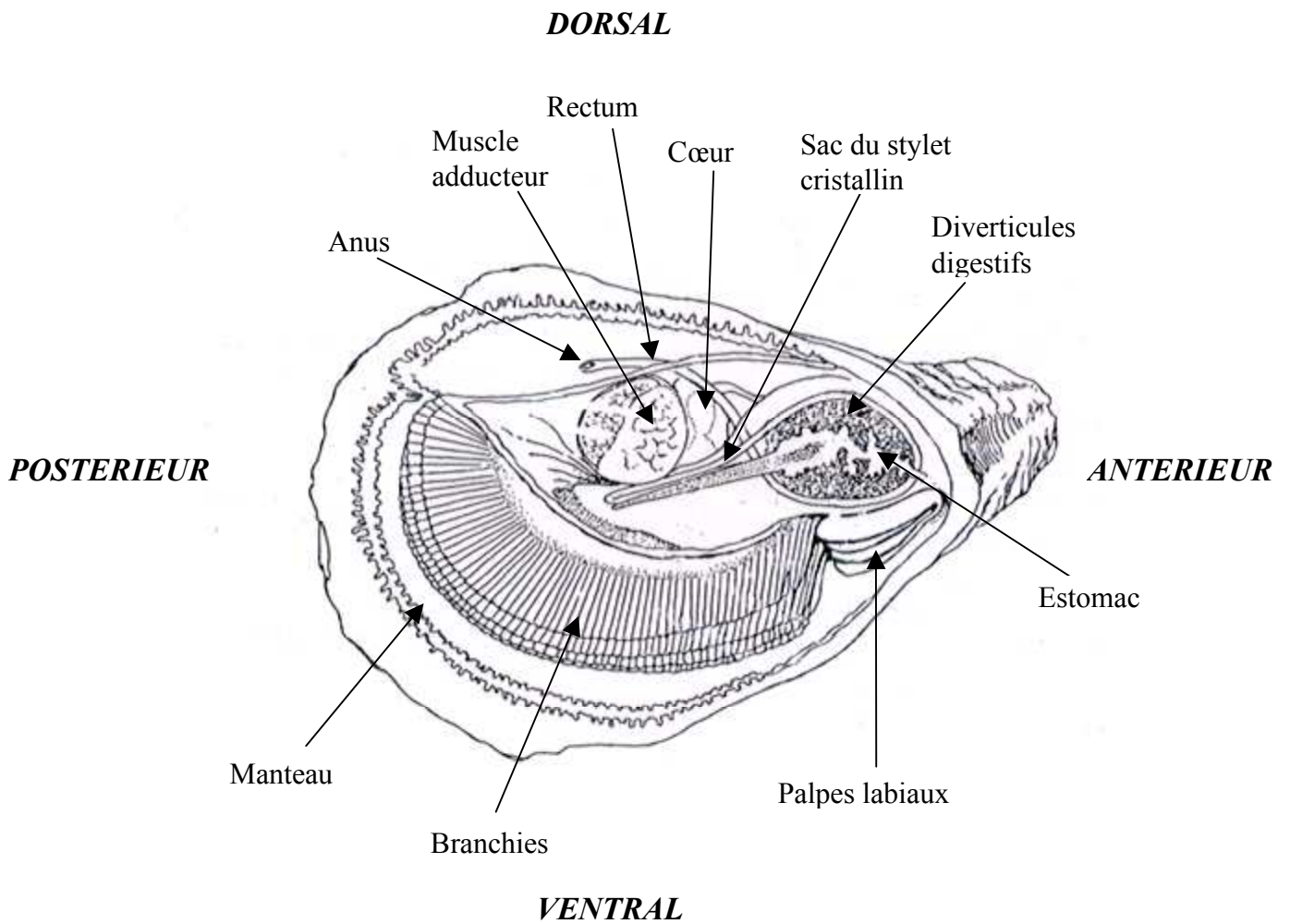


Figure 17 : anatomie de l'huître creuse, *C. gigas*.

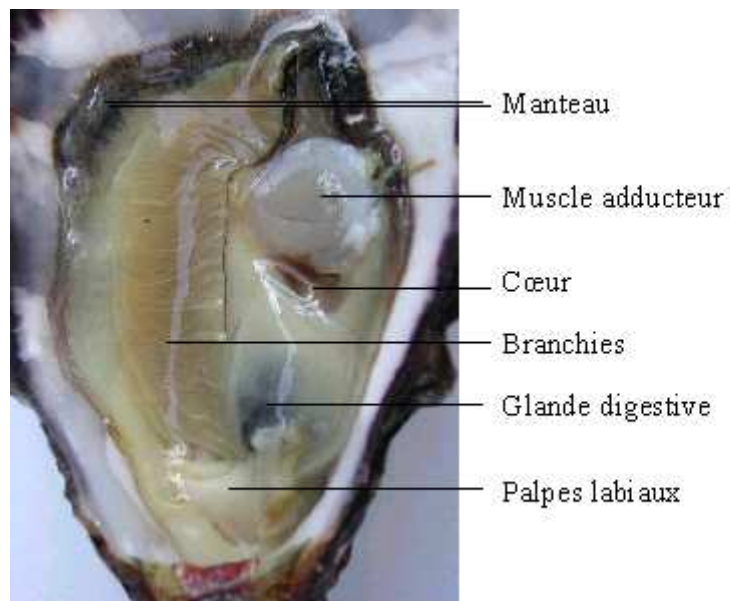


Figure 18 : anatomie d'une huître non mature.

La croissance de la coquille est un phénomène continu. Dans des conditions normales, la coquille montre des fines stries d'accroissement concentriques qui se forment en toutes saisons. Toute perturbation externe (température, apports trophiques) ou interne (reproduction) entraîne un arrêt de la croissance qui se manifeste par une discontinuité de la coquille. La coquille de l'huître est asymétrique, avec une valve supérieure plate et une inférieure creuse. Les deux valves sont reliées entre elles par la charnière et par le ligament interne qui prolonge la charnière. La fonction du ligament est mécanique : il permet la séparation des deux valves quand le muscle adducteur se relâche et leur fermeture quand le muscle est contracté. La charnière est de type dysodonte (absence de dents).

II.2.2. Manteau et cavité palléale

Le manteau est une formation tégumentaire qui adhère étroitement au corps dans les régions dorsale et latéro-dorsale, et se dilate à la base des branchies en deux lobes minces élargis qui délimitent la cavité palléale. Il enveloppe tous les organes auxquels il est rattaché au niveau du muscle adducteur, de la masse viscérale et des branchies. Il est composé de deux lobes palléaux. Sa fonction première est la sécrétion de la coquille. Il assure également des fonctions sensorielles tactiles (terminaisons nerveuses) et visuelles (ocelles et osphradies). Il intervient également dans la nutrition en participant au premier tri des particules extérieures. Il participe au stockage de matériaux de réserve (lipides, glycogène), à la fonction respiratoire, à la dissémination des gamètes et à la défense par la formation de mucus. Il représente l'une des premières barrières à l'agression par des facteurs externes.

II.2.3. Masse viscérale

II.2.3.1. Branchies

L'huître possède deux branchies ou cténidies. La branchie existe de chaque côté du corps sous forme de deux lames branchiales (externe et interne) suspendues à un axe pouvant s'étendre de la bouche à l'anus, vers le haut de la cavité palléale. En coupe transversale, les deux lames forment un W. Chaque lame est constituée d'un feuillet descendant (ou interne, direct) en regard de la masse viscérale et d'un feuillet ascendant (ou externe, réfléchi) situé du côté du manteau (**Figures 17 et 18**).

Les branchies sont le site de l'absorption de l'oxygène. L'huître ne possédant pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine, l'oxygène est transporté des branchies vers les organes dissous dans l'hémolymphe.

Les branchies assurent également la capture des particules alimentaires. La ciliation complexe des feuillets détermine les courants d'eau, la filtration de cette eau (qui est rejetée par un orifice

exhalant postérieur) et assure la capture puis le triage des particules alimentaires qui sont dirigées vers la bouche. L'intensité de l'activité dépend de nombreux facteurs extérieurs (température, salinité) et intérieurs (régulation) déclencheurs.

II.2.3.2. Muscle adducteur

Par sa contraction, le muscle adducteur provoque la fermeture des valves ; inversement, son relâchement, faisant cesser toute activité de résistance, permet l'ouverture de la coquille (**Figures 17 et 18**). Le muscle est composé de deux parties : les deux tiers correspondent à une partie translucide et ovale, appelée partie vitreuse ou noire. Les fibres de cette partie du muscle ressembleraient à celles du muscle strié squelettique chez les vertébrés. Le tiers restant est en forme de croissant blanc opaque. Les fibres de cette partie sont plus résistantes que celles de la partie vitreuse et sont lisses. Le muscle entier est approvisionné en hémolymphe. De plus, il existe un sinus veineux entre les deux parties du muscle dans lequel l'hémolymphe est abondante. La larve d'huître possède un autre muscle adducteur (antérieur) qui disparaît durant la métamorphose.

II.2.3.3. Palpes labiaux

Ils sont constitués de quatre lèvres de forme triangulaire qui encadrent la bouche. Les palpes labiaux interviennent dans la nutrition lors des phases de tri et de guidage des éléments nutritionnels vers le système digestif et dans l'élimination des pseudo-fécès (**Figures 17 et 18**).

II.2.4. Système digestif

La partie antérieure comporte la bouche s'ouvrant dans un court œsophage. Il n'y a pas de tentacules céphaliques ni de mâchoires, de radula ou de pharynx. L'estomac est une poche de structure complexe. Le bouclier gastrique est une aire cuticulaire sur laquelle vient buter le stylet cristallin et où débouchent les diverticules digestifs par un nombre variable de canaux. Le stylet cristallin est animé de mouvements de rotation et libère des enzymes digestifs. L'estomac se prolonge par l'intestin moyen (sac du stylet), postérieur et terminal (rectum) qui débouche par l'anus dans la cavité palléale. La glande digestive entoure complètement l'estomac et une partie de l'intestin (**Figures 17 et 18**).

II.2.5. Système excréteur

Le système excréteur n'est pas visible à l'œil nu. Il est constitué de deux parties, l'une située au niveau du péricarde, l'autre localisée sous le manteau et formant le rein. Un canal réno-péricardique relie les deux parties entre elles. Le rein comporte deux lobes néphridiens. La glande péricardiale intervient dans la filtration et l'épuration du sang lors de son transit par le cœur. Les reins sont pairs et s'ouvrent dans le péricarde par un entonnoir cilié auquel fait suite un canal excréteur (**Figure 17**).

II.2.6. Système nerveux

Le système nerveux est symétrique par rapport au plan sagittal. Les cellules neurosécrétrices sont localisées dans les ganglions cérébro-pleuraux supra-oesophagiens, pédieux (à la base de la masse viscérale) et viscéraux (ventralement au tube digestif). Des ganglions moins importants existent en divers endroits du corps. Les sécrétions sont de type aminergique (sérotonine, dopamine) et peptidergique (**Figure 17**).

II.2.7. Système circulatoire

Le système cardio-vasculaire est qualifié de semi-ouvert en raison de la collecte du liquide sanguin veineux par des sinus. Il existe cependant des vaisseaux capillaires assurant une micro-circulation fermée de l'hémolymphe. Le cœur dorsal est enfermé dans un péricarde qui correspond avec le système excréteur par des canaux réno-péricardiques.

Le cœur est formé d'un ventricule et de deux oreillettes latérales. Le ventricule correspond avec les oreillettes par une valve auriculo-ventriculaire. La circulation sanguine s'effectue à partir du ventricule qui propulse l'hémolymphe dans les aortes antérieures et postérieures, puis dans les artères et enfin dans les artérioles. L'aorte antérieure, la plus importante, sort du péricarde et alimente l'artère stomacale, viscérale et palléale. Elle irrigue les viscères, le muscle adducteur, la bouche, les palpes labiaux et la partie antérieure du manteau. L'aorte postérieure irrigue le rectum, la partie postérieure du manteau et le muscle adducteur postérieur.

Les artères déversent l'hémolymphe venue du cœur par les aortes dans le tissu conjonctif voisin de divers organes. L'hémolymphe, à partir de ce moment, n'est plus endiguée. Les échanges se font entre les cellules et le liquide hémolympatique contenu dans les lacunes. L'hémolymphe peut s'infiltrer dans les espaces libres du tissu conjonctif et circuler librement dans les diverses régions du corps, mais elle est peu à peu poussée par l'hémolymphe hématosée que déversent les artères et elle finit par pénétrer dans les veines, qui sont des cavités affectant la forme de canaux, orientées dans le tissu conjonctif. Les lacunes consistent en des espaces parfois très fins ménagés dans le tissu conjonctif et elles ne sont pas revêtues d'endothélium. Leur ensemble constitue un réseau de cavités. Certaines d'entre elles sont de grande taille et l'hémolymphe peut s'y accumuler : ce sont les sinus palléaux et le sinus veineux.

L'hémolymphe est ensuite épurée par le rein, puis circule dans les branchies par les vaisseaux afférents et en repart, après hématoèse, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes (**Figure 19**).

Le cœur fonctionne comme une pompe puissante. Les deux oreillettes se contractent simultanément et l'hémolymphe qu'elles contiennent passe seulement dans le ventricule. La cause qui empêche le sang de refluer dans les veines est inconnue, de même que la cause du remplissage des oreillettes. L'hémolymphe a une faible teneur en substances organiques et inorganiques. Elle est incolore.

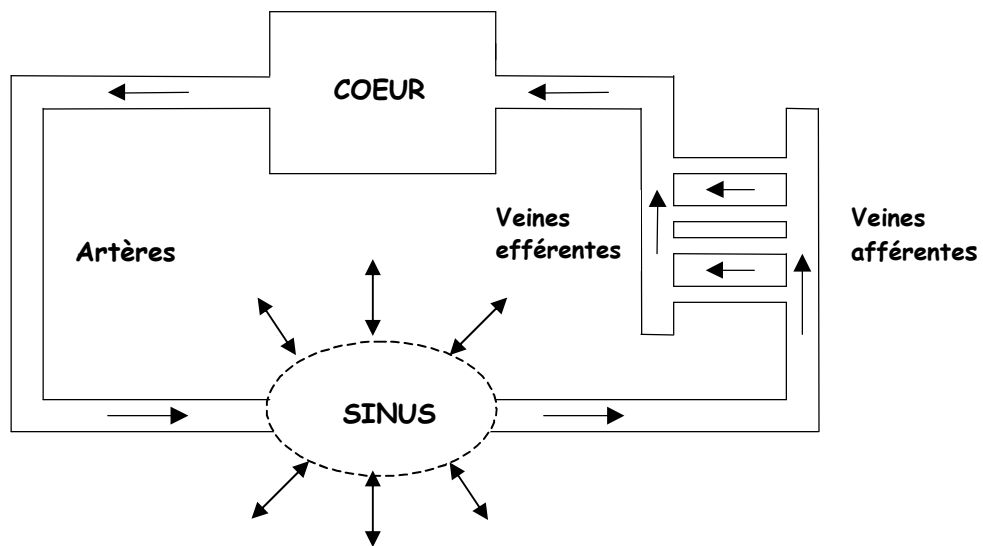


Figure 19 : système circulatoire simplifié chez les mollusques bivalves (modifié d'après Cheng, 1981).

La teneur de l'hémolymphe en substances dissoutes, minérales ou organiques est un peu inférieure à celle de l'eau de mer. L'hémolymphe peut contenir des pigments, tels que les pigments verts des Diatomées.

II.3. Mode de vie et nutrition

L'huître creuse peut coloniser tout le domaine intertidal, zone d'oscillation des marées, à partir de niveaux découverts à faibles coefficients (40). Elle peut être cultivée à des niveaux plus profonds (10-20 m). L'adulte vit fixé sur un substrat dur, attaché aux rochers, débris ou autres coquilles d'huîtres à des profondeurs comprises entre 5 et 40 m. La densité peut dépasser 250 individus par m² sur les gisements naturels. Cependant, les huîtres peuvent également être trouvées sur les fonds de sable et de vase.

Les huîtres sont des filtreurs microphages, se nourrissant de particules inférieures à 4 µm (bactéries, phytoplancton). L'huître présente deux voies d'assimilation de la nourriture, soit sous forme directe par absorption des substances dissoutes présentes dans l'eau de mer (lipides), soit par ingestion des particules en suspension (Héral & Deslous-Paoli, 1991). Dans ce cas, les particules sont filtrées et retenues à la surface des branchies ou enrobées de mucus, puis orientées vers les palpes labiaux.

II.4. Reproduction

II.4.1. Appareil reproducteur et gamétogénèse

Les sexes sont séparés, mais l'huître creuse présente un hermaphrodisme successif : la sexualité est alternative irrégulière, traversant de longues périodes au cours desquelles les individus sont soit en phase mâle, soit en phase femelle et ne montrent que les éléments d'un seul sexe. Le changement de sexe a lieu en période hivernale (Quyale, 1969). Le pourcentage de formes hermaphrodites est de 0.35 %. Chez l'huître creuse, l'hermaphrodisme successif est dit protandrique (mâle en premier) (Buroker, 1983).

La gonade est non différenciée de la glande digestive. Le volume et l'aspect extérieur de la gonade varient au cours de la gamétogénèse. Sur la base de ces critères, plusieurs auteurs ont proposé des classifications permettant de qualifier macroscopiquement des stades de maturation correspondant aux évolutions histologiques de la gonade (Galtsoff, 1964). La gonade est constituée d'un ensemble de follicules au sein desquels vont évoluer les cellules germinales lors de la gamétogénèse. Celle-ci débute au printemps lorsque les conditions environnementales sont favorables ; la maturation sexuelle est atteinte au cours de l'été. D'un point de vue biochimique, le cycle reproducteur se caractérise par une phase de stockage en glycogène dès le réchauffement thermique printanier, qui sera rapidement métabolisé en lipides dans le mois qui précède la ponte (Maurer & Borel, 1986).

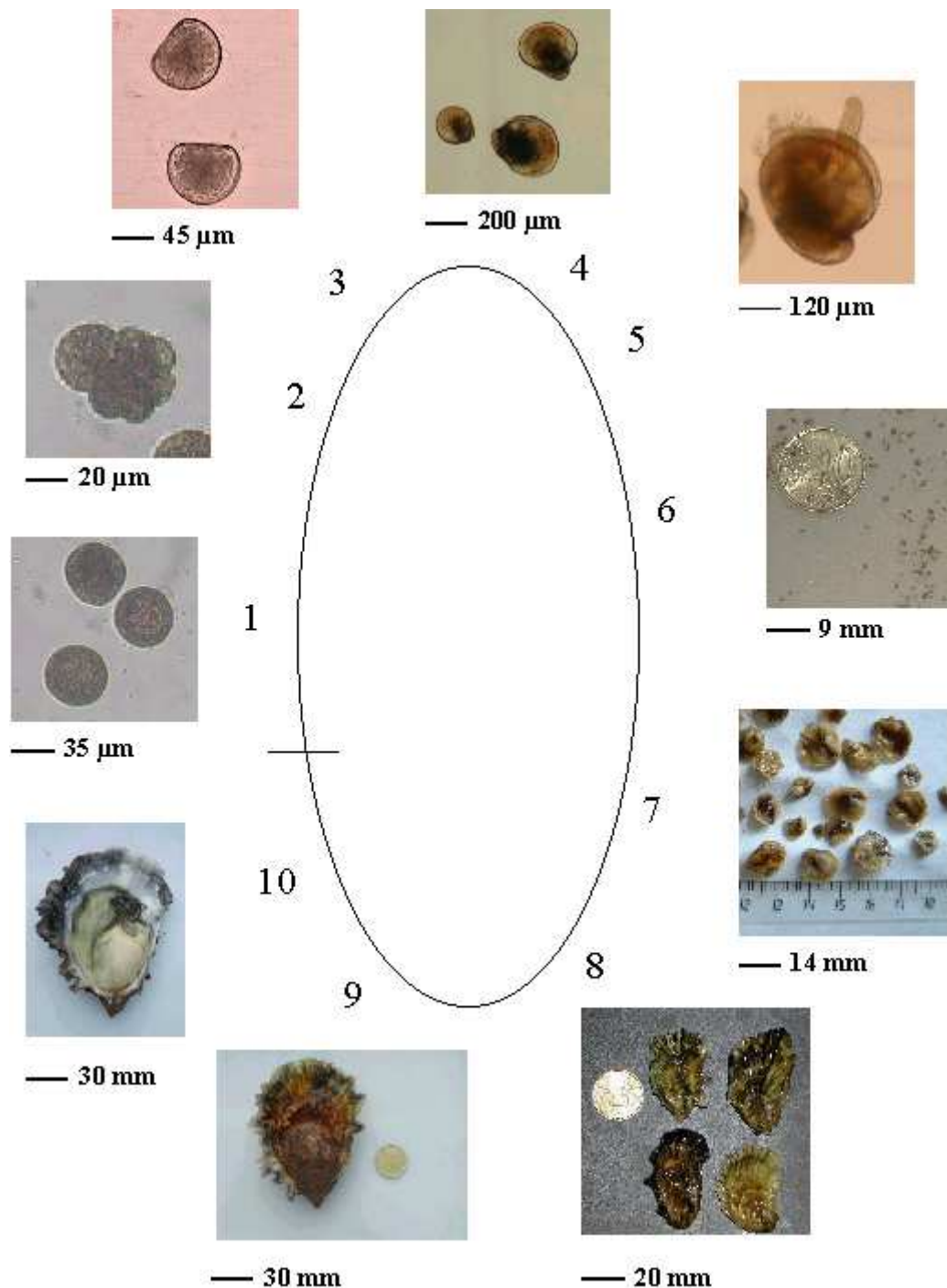


Figure 20 : cycle de vie de l'huître creuse. 1-fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). 2-embryon stade morula (2-3 heures). 3-larves D (24 heures). 4-larves véligères umbonées (14 jours). 5-larve pédivéligère (18 jours). 6-naissains post-fixation (1 mois). 7-naissains (2 mois). 8-naissains (6 mois). 9-adulte (10 mois). 10-géniteur mature (10 mois). *Nb : l'âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d'huîtres élevées en nurserie, mais pas pour des huîtres du milieu naturel.*

II.4.2. Ponte et fécondation

La maturation des gamètes et leur émission n'ont lieu que si un seuil de température dit « température critique de ponte » est atteint ou dépassé. En France, la ponte a lieu en période estivale. Dans le bassin de Marennes-Oléron, une ponte principale est enregistrée, alors que dans le bassin d'Arcachon, plusieurs événements de ponte sont possibles pendant l'été (Héral & Deslous-Paoli, 1991). Les gamètes des deux sexes sont expulsés dans l'eau ambiante ; la fécondation est externe et ovipare. Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes, en compensation de la forte mortalité larvaire. Dans des régions ostréicoles où la température de l'eau est plus froide (Bretagne ou Normandie), l'émission des gamètes n'est que partielle ou absente, et de nombreux produits génitaux sont observés après la période estivale dans la gonade. Les gamètes sont alors résorbés en automne par cytolysse (atrésie) et phagocytose (Lubet, 1991).

II.4.3. Vie larvaire

Le développement embryonnaire précoce de la fécondation (**Figure 20**, stade 1) au stade quatre cellules, est bien connu chez l'huître creuse (Gérard *et al.*, 1995). Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula (**Figure 20**, stade 2), puis trochophore pour donner 24 heures après fécondation une larve véligère en forme de D dont la taille est alors de 70 µm (**Figure 20**, stade 3). A ce stade, la larve possède une coquille (Prodissochouque I) et un velum, organe de nutrition et de locomotion. La forme des larves évolue parallèlement à leur croissance avec l'apparition d'une extension en forme de crochet qui correspond à l'umbo (**Figure 20**, stade 4). Quelques jours avant la fin de la vie larvaire, l'organe sensoriel principal apparaît sous forme d'un point noir donnant à ce stade le nom de larve oeuillée. Lorsque la larve atteint une taille comprise entre 300 et 380 µm, elle développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation (**Figure 20**, stade 5). Elle porte donc le nom de larve pédivéligère. Une fois fixée, la larve débute sa métamorphose liée à de nombreux remaniements : disparition du pied et du vélum, apparition du manteau et des branchies. L'huître atteint alors le stade de naissain (ou juvénile) (**Figure 20**, stade 6). Elle passera le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation de taille. Le stade adulte est considéré comme atteint après la première saison de reproduction. La phase larvaire dure de 15 à 28 jours pour des températures comprises entre 20 et 26°C (Héral & Deslous-Paoli, 1991).

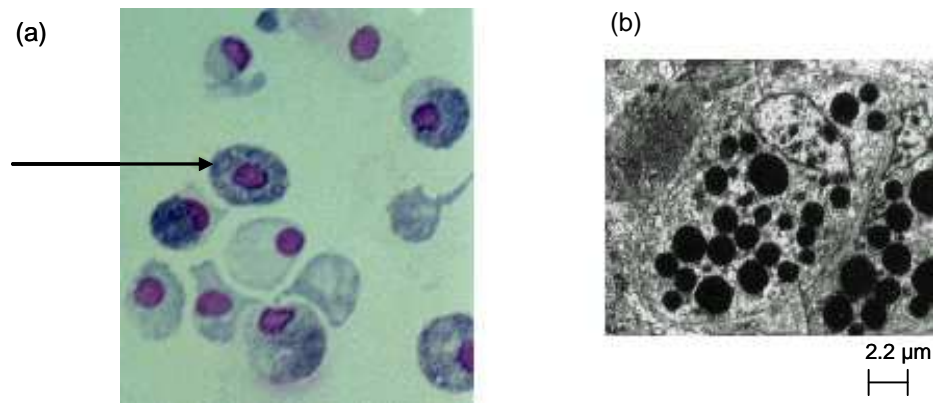


Figure 21 : granulocyte de l'huître creuse, *C. gigas* : observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) ($G \times 600$) (a) (le granulocyte est indiqué par la flèche) ; observation au microscope électronique à transmission (b).

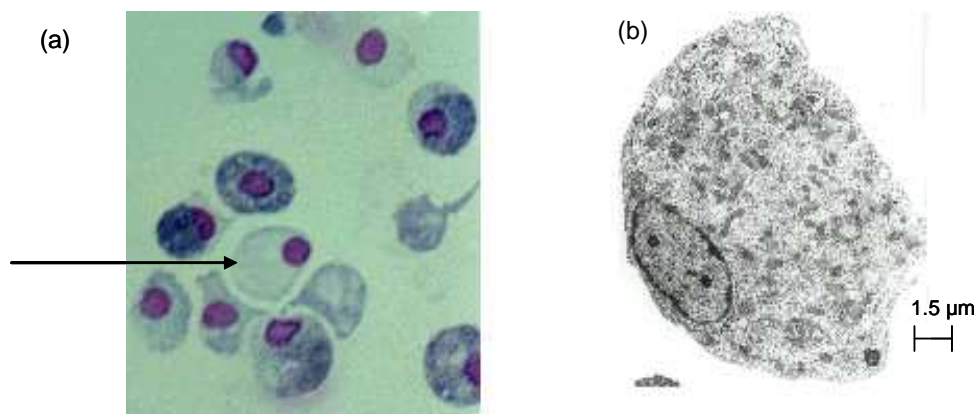


Figure 22 : hyalinocyte de l'huître creuse, *C. gigas* : observation au microscope photonique après coloration au kit Hemacolor (Merck) ($G \times 600$) (a) (le hyalinocyte est indiqué par la flèche) ; observation au microscope électronique à transmission (b).

III Les hémocytes, des cellules à activités multiples

A l'exception des formes les plus primitives (éponges), qui présentent peu de différenciation des organes et des fonctions, la plupart des invertébrés, y compris les mollusques bivalves, possèdent des cellules « sanguines », hémocytes ou cœlomocytes, de grande diversité et souvent d'origine incertaine. Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert où circule l'hémolymphe contenant les hémocytes (**Figure 19**) (Cheng, 1981). Les hémocytes peuvent présenter différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et sinus), mais également dans les tissus (hémocytes fixés : glande digestive, manteau, branchies, gonades) (Lorteau *et al.*, 1995b; Xue & Renault, 2001). Les mécanismes de défense connus à ce jour chez les mollusques bivalves reposent essentiellement sur les hémocytes.

III.1. Les différents types hémocytaires

Une hétérogénéité morphologique et fonctionnelle a été observée au sein des hémocytes chez les mollusques bivalves. De nombreux travaux ont été réalisés pour tenter d'établir une classification des différents types observés. L'hétérogénéité des résultats obtenus rend la classification encore plus complexe. Une première classification a été proposée par Cheng en 1981. Pour classer les hémocytes, différents critères peuvent être utilisés : morphologiques, cytochimiques, fonctionnels et moléculaires (antigènes ou récepteurs) (Xue, 1998). Les critères les plus utilisés sont les caractères morphologiques. Ils correspondent à la taille, la forme, le rapport nucléoplasmique, les affinités tinctoriales et la présence d'organites cellulaires observés en microscopie.

A ce jour, les études s'accordent sur l'existence de deux grandes catégories cellulaires (revue dans Hine, 1999) :

- Les hémocytes granuleux (granulocytes de différents types) sont des cellules présentant un petit noyau et un cytoplasme abondant caractérisé par de nombreuses granulations (rapport nucléo-cytoplasmique faible) (**Figure 21**). Les granules peuvent présenter différentes formes, tailles et affinités tinctoriales (Hine, 1999) ;
- Les hémocytes agranuleux (macrophages, « macrophage-like », hyalinocytes, « monocyte-like cells », agranulocytes) sont des cellules à rapport nucléo-cytoplasmique élevé, contenant peu ou pas de granulations et qui présentent les caractéristiques de cellules peu différenciées (**Figure 22**).

Ostréidés		Vénéridés	Pectinidés	
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Chlamys varia</i>	<i>Pecten maximus</i>
Cellules agranuleuses				
Hyalinocytes (10)	Hyalinocytes (12-40)	Hyalinocytes type I (6-8)	Hémocytes type I (6-10) Hémocytes type II (5-7) Hémocytes type III (5)	Hémocytes type I (5-10) Hémocytes type II (6)
Hémocytes agranuleux (10)	Hémocytes agranuleux (25-30)	Hyalinocytes type II (5-7)		
Cellules granuleuses				
Hémocytes granuleux (10)	Hémocytes granuleux basophiles (25-30) Hémocytes granuleux acidophile (15)s	Hémocytes granuleux (10)		

Tableau 3 : types hémocytaires selon la nomenclature chez 5 espèces de mollusques bivalves (Auffret, 1985). Les chiffres entre parenthèses indiquent la taille en μm .

Au sein de ces deux grandes catégories, le nombre de types cellulaires est très variable. Chez l'huître creuse, *C. gigas*, trois types de granulocytes et deux types de hyalinocytes sont généralement observés (Chagot, 1989; Auffret, 1989) (**Tableau 3**). Les hémocytes de l'huître plate, *O. edulis*, sont classifiés en un type de granulocytes et deux types de hyalinocytes (Chagot, 1989; Auffret, 1989) (**Tableau 3**). Chez la praire, *Mercenaria mercenaria*, un type de hyalinocytes et deux types de granulocytes peuvent être distingués (Moore & Eble, 1977). Une étude chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, rapporte l'existence de deux types de hyalinocytes et un type de granulocytes (Auffret, 1985) (**Tableau 3**). Cependant, une autre étude montre chez cette espèce l'existence de quatre types hémocytaires : granulocytes, hyalinocytes, hémoblastes et cellules séreuses (Cima *et al.*, 2000). Enfin, une étude ne rapporte la présence d'aucun granulocyte chez le pétoncle, *Chlamys varia*, et la coquille St-Jacques atlantique, *Pecten maximus* (Auffret, 1985) (**Tableau 3**).

Ainsi, les caractères morphologiques des cellules ne semblent pas suffisants pour établir une classification des hémocytes chez les mollusques. Certains auteurs ont donc tenté d'utiliser d'autres critères, tels que des critères fonctionnels (présence d'activités enzymatiques). Chez *R. philippinarum*, les granulocytes et les hyalinocytes possèdent certains enzymes en commun (phosphatase alcaline, estérase non spécifique, peroxydase et cytochrome C oxydase) alors que certaines activités ne sont détectées que dans les granulocytes (β -glucuronidase, estérase acide et arylsulphatase) (Cima *et al.*, 2000). La présence d'enzymes permet également de différencier les types hémocytaires de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), de la petite praire, *Chamelea gallina* (Pampanin *et al.*, 2002), de la moule commune, *Mytilus edulis* (Pipe, 1990a), et de *C. gigas* (Chagot, 1989; Xue & Renault, 2000). Des études ont également tenté de différencier les sous-populations hémocytaires en utilisant des lectines marquées. Ainsi, les différentes sous-populations hémocytaires de *M. edulis* (Pipe, 1990b; Wootton *et al.*, 2003b) et de la coque commune, *Cerastoderma edule*, et du couteau-silique, *Ensis siliqua*, fixent différentes lectines (Wootton *et al.*, 2003b).

La cytométrie de flux est un outil permettant également de différencier les populations hémocytaires chez les mollusques bivalves sur des critères de taille et de complexité (Fisher & Ford, 1988; Ford *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 2001; Soares-da-Silva *et al.*, 2002; Hégaret *et al.*, 2003a, b; Gagnaire *et al.*, 2003, 2004; Goedken & De Guise, 2004). Cet outil s'avère utilisable pour analyser des hémocytes marqués par un anticorps monoclonal spécifique, chez *O. edulis* (Renault *et al.*, 2001; Xue & Renault, 2001).

Des études ont également réussi à séparer les différentes populations hémocytaires sur un gradient de centrifugation chez *O. edulis* (Xue *et al.*, 2000) et par élutriation centrifuge chez *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1988).

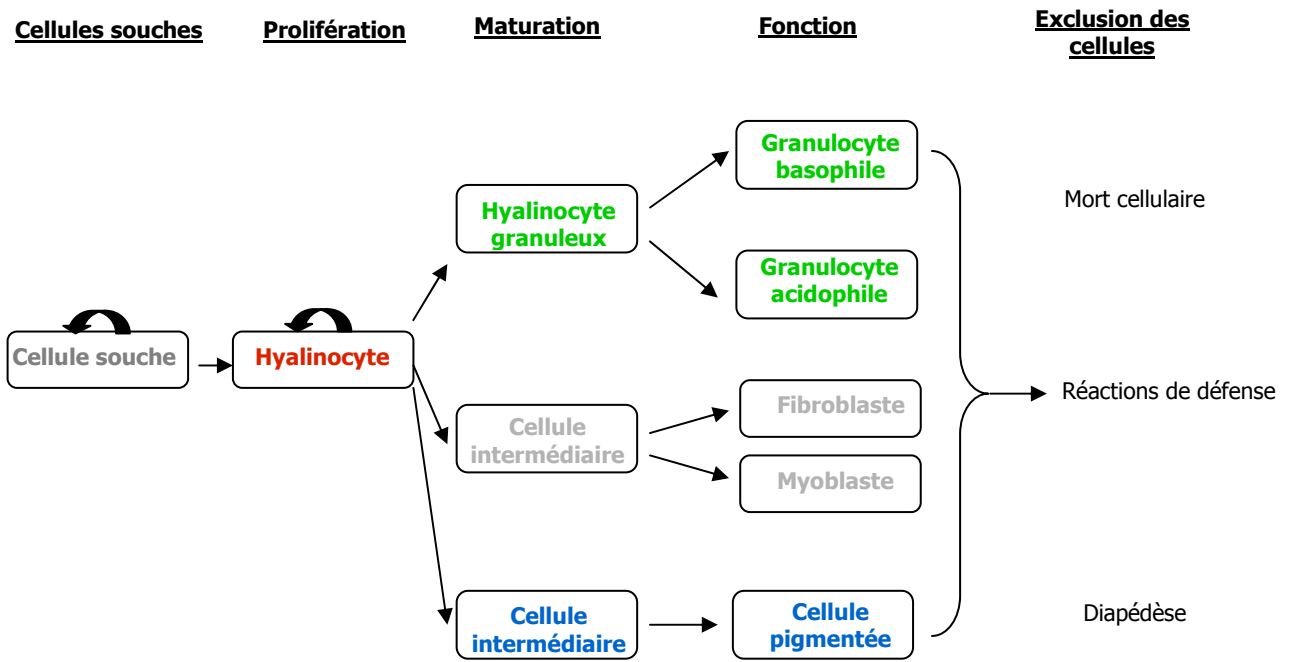


Figure 23 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Mix (1976).

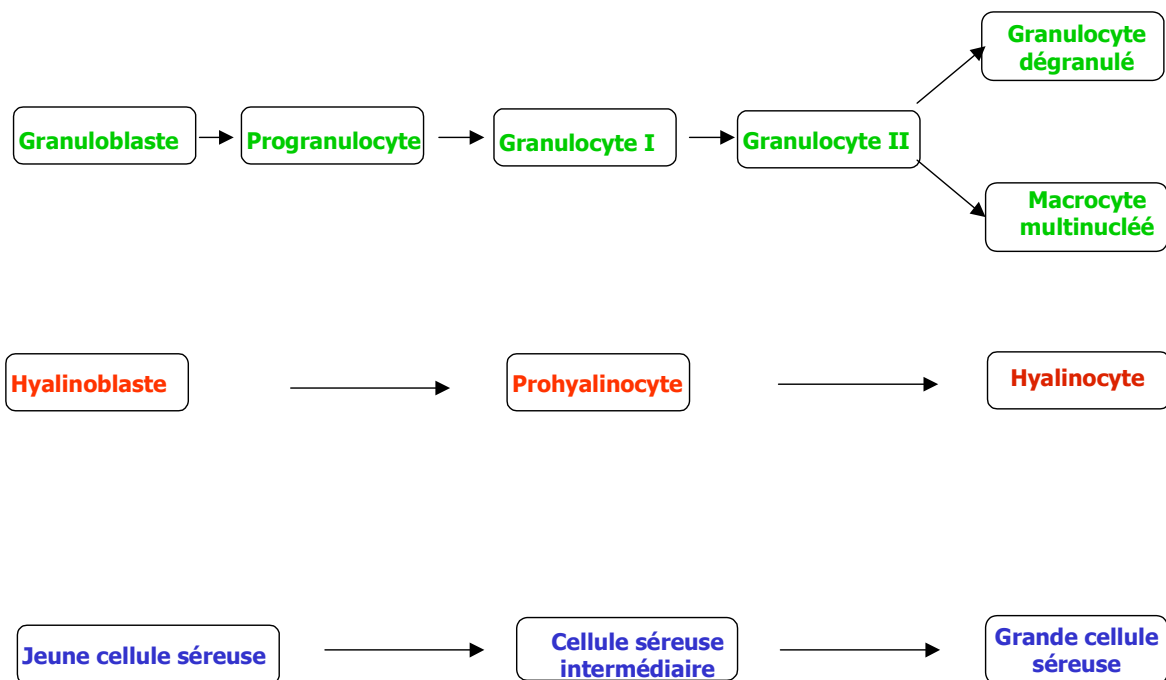


Figure 24 : modèle général d'ontogénèse hémocytaire chez les mollusques bivalves proposé par Cheng (1981).

Il faut noter que les différents types hémocytaires n'existent pas à tous les stades du développement : ainsi, aucun granulocyte n'a été observé chez les larves de *O. edulis*, alors qu'ils existent chez le naissain et l'adulte (Xue *et al.*, 2001).

III.2. Origine et ontogénie des hémocytes

L'absence de multiplication des hémocytes circulants permet de poser l'hypothèse de l'existence d'un ou de plusieurs sites d'hématopoïèse chez les bivalves. Il est généralement accepté que les hémocytes proviennent d'une différenciation de cellules du tissu conjonctif. Certains auteurs supposent l'existence d'un organe hématopoïétique particulier, d'autres considèrent que le tractus digestif pourrait intervenir comme centre d'hématopoïèse (Cheng, 1981; Lorteau *et al.*, 1995b).

Certains auteurs ont posé l'hypothèse que les différents types hémocytaires pourraient représenter différents stades de développement d'un même type cellulaire (Cheng, 1981). Le premier modèle d'ontogénèse fait intervenir quatre étapes (Mix, 1976). La première phase correspond à une prolifération des cellules à partir d'une cellule souche (leucoblaste) qui forme les hyalinocytes. Dans une deuxième phase de maturation, ces hyalinocytes se différencient en hyalinocytes granuleux ou en deux classes de cellules intermédiaires. Dans une troisième phase, la différenciation des hyalinocytes granuleux conduit à la formation de granulocytes basophiles et acidophiles, celle des cellules intermédiaires conduit à la formation de fibroblastes, myoblastes et cellules pigmentaires. Enfin, la dernière phase correspond à l'exclusion des cellules : toutes ces cellules interviennent dans les processus de défense, et certaines d'entre elles sont perdues par sénescence ou diapédèse (

Figure 23).

Un deuxième modèle d'ontogénèse a été proposé (Cheng, 1981). Les hémocytes dériveraient de trois types différents de cellules souches : les granuloblastes, les hyalinoblastes et les jeunes cellules séreuses. Les granuloblastes subissent plusieurs étapes de maturation pour donner naissance aux granulocytes. Après trois étapes, les granulocytes perdent leurs granules et sont éliminés. Dans certaines conditions pathologiques, quelques granulocytes peuvent donner naissance à des cellules géantes multinuclées après fusion cellulaire. Le développement des hyalinoblastes et des jeunes cellules séreuses est moins compliqué que celui des granuloblastes : après deux étapes de maturation, les cellules obtenues sont des hyalinocytes et des cellules séreuses rencontrées chez certains bivalves, respectivement (**Figure 24).**

Cependant, aucune des hypothèses sur l'origine et l'ontogénie des hémocytes n'a été vérifiée à ce jour. Une meilleure connaissance du processus d'ontogénèse chez les bivalves permettrait de mieux appréhender les différentes fonctions des hémocytes.

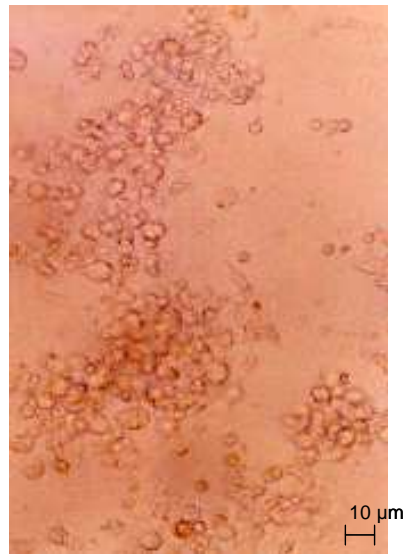


Figure 25 : hémocytes agrégés d'huître creuse, *C. gigas*, observé sur cellule de Malassez.



Figure 26 : hémocyte d'huître creuse, *C. gigas*, observé sur cellule de Malassez, montrant la plasticité des cellules.

III.3. Propriétés des hémocytes

III.3.1. Agrégation hémocytaire

Quand l'hémolymphe est ponctionnée à l'aide d'une seringue, les cellules tendent à s'agréger (Fisher, 1986). L'agrégation des hémocytes est dite spontanée (en absence de pathogène) et a lieu lorsque des conditions stressantes apparaissent, particulièrement *in vitro*. En général, le contact avec des objets ou l'agitation mécanique peuvent servir de stimulus (Auffret & Oubella, 1997). La formation d'amas hémocytaires peut se rapprocher du phénomène de coagulation sanguine chez les cellules immunitaires de vertébrés (**Figure 25**). Cependant, à l'inverse des vertébrés, ce processus est réversible. La plupart des cellules présentes dans les amas peuvent se dissocier et retourner dans la circulation générale (Feng, 1988). L'agrégation permet la cicatrisation de plaies ou l'immobilisation de corps étrangers.

Deux phases se distinguent dans le déroulement du phénomène d'agrégation chez la moule californienne, *Mytilus californianus* (Chen & Bayne, 1995) : lors de la première étape (agrégation dite faible), les hémocytes changent de forme et s'agrègent très rapidement (moins d'une minute) après le prélèvement. Cette phase est indépendante des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les amas formés sont peu denses et facilement dissociables. La seconde phase (agrégation dite cohésive) apparaît environ dix minutes après la première phase. Elle dépend des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les amas formés sont beaucoup plus denses que lors de la première phase. La seconde phase (agrégation dite cohésive) apparaît environ dix minutes après la première phase. Elle dépend des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les amas formés sont beaucoup plus denses que lors de la première phase. Ce phénomène est lié à la formation de « filopodes », prolongations cytoplasmiques à la surface des hémocytes différentes des pseudopodes. Certaines substances permettent d'inhiber ce phénomène chez *C. gigas* (EDTA (éthylène diamine tétraacetic acid, un chélateur de cations divalents), caféine) (Auffret & Oubella, 1997).

III.3.2. Plasticité

La forme des hémocytes circulants chez les mollusques est généralement sphérique. Cependant, lorsque les hémocytes rentrent en contact avec un support, ils prennent une forme amoéboïde et émettent des filopodes (**Figure 26**). Dans des conditions normales, le processus de dispersion est réalisé en 10-15 minutes et les cellules deviennent alors mobiles (Fisher, 1986). Les hémocytes, lorsqu'ils présentent des tumeurs, peuvent perdre cette plasticité (Beckmann *et al.*, 1992).

III.3.3. Mobilité

Après étalement, les hémocytes peuvent présenter la capacité de se déplacer par la formation de prolongements cytoplasmiques (pseudopodes). La locomotion cellulaire ne se produit pas tant que les hémocytes n'ont pas pris leur forme amoéboïde. Il apparaît que les microtubules et les microfilaments sont nécessaires pour la locomotion, étant donné que la colchicine et la cytochalasine B, inhibiteur de la formation des microtubules, inhibent cette migration (Fisher, 1986).

III.3.4. Chimiotactisme

L'orientation du déplacement cellulaire est primordiale dans les phénomènes de défense, notamment pour la localisation et la capture de particules étrangères. Les hémocytes de mollusques, à l'instar des leucocytes de vertébrés, peuvent être attirés par des substances produites par les organismes étrangers ou par le mollusque lui-même. Les particules attractives pourraient être des molécules trouvées dans la paroi des bactéries (Fisher, 1986). Le chimiotactisme pourrait être assimilé à un phénomène empêchant la dissémination des infections. En effet, il n'existe chez l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*, qu'en présence de bactéries vivantes (Cheng & Rudo, 1976).

III.3.5. Adhésion

Ce phénomène correspond à une interaction entre la surface des cellules et les substrats, notamment les bactéries. L'adhésion est distincte de l'agrégation et ces deux phénomènes n'interviennent pas simultanément. L'adhésion est due à des molécules présentes à la surface des cellules. Ces molécules pourraient être des lectines chez certaines espèces (cf IV.2.2).

III.4. Fonctions des hémocytes

III.4.1. Réparation des blessures

Les phénomènes d'agrégation et d'adhésion des hémocytes chez les bivalves sont considérés comme essentiels dans les phénomènes de réparation des blessures. La première étape de la réparation des blessures est l'infiltration hémocytaire (cf IV.1.1) sur le site de la blessure. Les hémocytes forment un « bouchon hémocytaire » ou clou hémostatique qui permet de limiter les pertes d'hémolymphe et la pénétration de germes (Cheng, 1988b). Les cellules lésées sont ensuite remplacées par des hémocytes qui se différencient en cellules fusiformes (Sparks & Morado, 1988). Du collagène est ensuite déposé entre les cellules du clou hémostatique. Enfin, les débris de tissus nécrotiques sont éliminés par les hémocytes. La dernière étape est la restauration de l'architecture du tissu (Cheng, 1981; Feng, 1988).

III.4.2. Réparation de la coquille

Les hémocytes jouent un rôle dans la réparation de la coquille. Les hémocytes migrent à la surface du manteau dès les premiers stades de la réparation (Fisher, 1986). Ils transportent du calcium et des protéines sur le site de la blessure, indispensables à la réparation de la coquille (Cheng, 1996).

III.4.3. Excrétion

La fonction excrétoire des hémocytes est liée aux glandes péricardiques, qui se trouvent au niveau des oreillettes et du manteau. Ces glandes sont le site de production des cellules brunes ou séreuses. Ces cellules pigmentaires doivent leur coloration à des globules cytoplasmiques bruns. Elles sont de forme amoéboïde et sont capables de phagocytose, ce qui laisse suspecter qu'elles pourraient être des hémocytes modifiés. La fonction la plus importante des cellules brunes est leur rôle dans l'élimination des produits de dégradation. Le nombre des cellules séreuses augmente lors d'une infection parasitaire chez *C. virginica* (Cheng, 1981).

III.4.4. Digestion et transports de nutriments

Le rôle des hémocytes dans la digestion et le transport de nutriments est difficilement dissociable des activités de défense (Cheng, 1996). Les hémocytes sont capables d'endocytose (internalisation de fluides et de particules à l'intérieur de la cellule). Les hémocytes peuvent migrer dans le tube digestif pour internaliser les particules nutritives et relarguer ensuite les nutriments dans les tissus. Les hémocytes sont également capables de réaliser le phénomène inverse, *ie* capturer du matériel indésirable dans l'hémolymphe et le transporter vers le tube digestif pour l'évacuation sous forme de fécès. L'endocytose est un phénomène général qui regroupe la phagocytose (=« cell-eating ») et la pinocytose (=« cell-drinking »), ces deux phénomènes existant chez les hémocytes d'huître (Fisher, 1986).

III.4.5. Détoxification des polluants

Les hémocytes des mollusques bivalves jouent un rôle important dans la détoxification des polluants, notamment des métaux lourds (Lorteau *et al.*, 1995b). Les métaux lourds tels que le zinc, le cuivre, le fer et le plomb peuvent être piégés dans les hémocytes chez *O. edulis* (Coombs & George, 1977). Chez *M. edulis*, les métaux sont piégés dans les granules des cellules des branchies et du rein, qui sont des lysosomes (George *et al.*, 1982). Les métallothionéines interviennent dans ce phénomène (cf IV.1.5.2). Ensuite, les métaux sont relargués dans la circulation, réabsorbés par les hémocytes et finalement excrétés (Coombs & George, 1977; George & Pirie, 1980). Le cuivre et le zinc s'accumulent également dans les lysosomes des hémocytes de *C. gigas* (Thomson *et al.*, 1985). Les hémocytes débarrasseraient donc l'hémolymphe des particules et substances dissoutes étrangères et les transporteraient vers le rein pour excrétion.

IV Les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves

Note liminaire : dans ce chapitre, la réponse aux xénobiotiques est incluse dans les mécanismes de défense des mollusques bivalves.

La fonction principale du système immunitaire chez tous les animaux est de fournir une protection contre les agents infectieux (parasites, bactéries, virus et champignons) et les tumeurs et de rejeter les composants du non-soi. Chez les vertébrés, un ensemble de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes communiquent entre elles *via* des molécules messagers pour créer un système immunitaire multi-fonctionnel. Les fonctions de ce système permettent d'une part des réponses rapides (défense innée) et d'autre part des réponses spécifiques (défense acquise) par le biais d'un mécanisme de mémorisation des rencontres précédentes avec des antigènes étrangers. Ce second type de réponse possède une efficacité accrue en ciblant un agent infectieux particulier (Feng, 1988). Le phénomène de mémoire immunitaire fait intervenir les lymphocytes. Ce mécanisme est possible du fait de la présence de récepteurs spécifiques portés à la surface de cette catégorie de cellules. Les réponses immunitaires innées sont réalisées par les cellules spécialisées (phagocytes mononucléaires, granulocytes, etc), qui peuvent reconnaître le corps étranger et répondre par la phagocytose et l'inflammation.

Le système immunitaire chez les invertébrés repose sur les défenses innées. Les défenses innées sont manifestées par les traits inhérents anatomiques, physiologiques, biochimiques et comportementaux d'un individu qui le protègent contre les infections. Cependant, il existe un mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi (Galloway & Depledge, 2001). Il est également caractérisé par une absence du phénomène de mémoire immunitaire (Cheng, 1981). Par ailleurs, des barrières physico-chimiques telles que la cuticule, la coquille, les couches de mucus et le manteau représentent une première ligne de défense contre les agresseurs chez la majorité des invertébrés. Les invertébrés comptent un grand nombre de phyla ayant des origines ancestrales et des évolutions différentes. Les composants immunitaires varient non seulement d'une espèce à l'autre, mais également au sein de la même espèce, en fonction du stade de développement.

IV.1. Mécanismes à médiation cellulaire

IV.1.1. « Inflammation » et infiltration hémocytaire

Comme pour la plupart des animaux, chez les mollusques l'« inflammation » est une réponse immédiate d'un tissu à une blessure ou après infection par des organismes pathogènes, qui regroupe la constriction des vaisseaux sanguins et des sinus (Feng, 1988), et la leucocytose (ou hémocytose). La leucocytose correspond à l'élévation de la densité hémocytaire dans le système circulatoire et l'infiltration hémocytaire sur le site de la blessure (Fisher, 1986). Cette étape est la première étape de la phagocytose et/ou de l'encapsulation car l'augmentation du nombre de cellules contribuent à ces processus actifs (cf IV.1.2 et IV.1.6). Il est possible d'induire la leucocytose en introduisant des substances étrangères telles que du talc (Sparks & Morado, 1988). Le facteur le plus important induisant une leucocytose chez les mollusques correspond à l'infection par des organismes pathogènes. En effet, 72 h après l'injection de *Vibrio tapetis* chez *Ruditapes philippinarum* et la palourde croisée d'Europe, *Ruditapes decussatus*, le nombre d'hémocytes circulants augmente de manière importante. Cependant, l'injection de bactéries mortes du genre *Vibrio* ne provoque pas de réaction (Oubella *et al.*, 1993). De la même façon, l'augmentation de la densité des hémocytes circulants chez l'huître américaine, *C. virginica*, est corrélée positivement au niveau d'infection à *Perkinsus marinus* (Anderson *et al.*, 1995).

IV.1.2. Encapsulation

Ce phénomène se produit lorsque des hémocytes encerclent une particule de grande taille ne pouvant pas être phagocytée, comme un parasite. Les hémocytes ne sont pas prédestinés à réaliser la phagocytose ou l'encapsulation, car les premiers hémocytes atteignant le parasite tentent de réaliser la phagocytose. En étant incapables, les hémocytes se différencient en cellules de type fibroblastique. Ces cellules produisent des fibres qui interviennent dans le processus d'encapsulation en formant une capsule fine autour du parasite (Fisher, 1986).

L'encapsulation et la phagocytose sont deux phénomènes présentant des dénominateurs communs, tels que le chimiotactisme, le contact et l'attachement entre le phagocyte et le corps étranger.

IV.1.3. Formation de nacre

La nacrésation, ou formation de perle, est une forme spécialisée de réaction de l'hôte. Elle intervient lorsqu'une particule étrangère (biotique ou abiotique) se trouve à la surface du manteau sécrétant la nacre. Ce phénomène peut être induit par des stimuli physiques (Cheng & Combes, 1990).

IV.1.4. Apoptose ou mort cellulaire programmée

Au cours de la multiplication cellulaire et de la différenciation, de nombreuses cellules sont produites en excès ou de façon anormale. La mort cellulaire programmée intervient alors en détruisant et en éliminant ces cellules afin de maintenir un équilibre dans l'organisme. Ses caractéristiques correspondent à l'arrondissement des cellules, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN cellulaire et des transformations comme le bourgeonnement des membranes au niveau cellulaire (Kim & Sharma, 2004). Le contenu cellulaire est finalement détruit pour être phagocyté. L'apoptose est un processus cellulaire actif et se différencie ainsi de la nécrose ou de la cytolyse.

Ce phénomène, fondamental chez les vertébrés, a été largement étudié chez les invertébrés. Divers travaux ont permis de démontrer son existence chez *R. philippinarum*, *O. edulis* et *C. gigas* (Renault *et al.*, 2000a; Lacoste *et al.*, 2001a). L'apoptose est une des principales réponses face à une infection virale (Renault *et al.*, 2000a), en empêchant ainsi la dissémination des pathogènes dans l'organisme. De nombreux facteurs externes tels que les pathogènes et le risque environnemental (Hamada *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 2001; Araragi *et al.*, 2003) sont susceptibles de déclencher ce phénomène apoptotique.

IV.1.5. Réponses aux xénobiotiques

IV.1.5.1. Enzymes de phase I, II et III

Afin de se protéger face aux agressions cellulaires par des composés organiques toxiques, des réactions enzymatiques se mettent en place pour modifier le xénobiotique (enzymes de phase I, II et III) (Parant, 1998).

Les enzymes de phase I fonctionnalisent le xénobiotique par une réaction de monooxygénation (introduction d'un atome d'oxygène) de manière à le rendre plus réactif, ce qui facilite la suite du métabolisme. Cette phase fait intervenir les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) et à flavine (FMO) ainsi que d'autres composants (cytochrome b5, cytochrome b5 réductase, cytochrome c réductase, NADPH, NADH). Tous ces composés ont été détectés dans la glande digestive, les branchies ou les hémocytes de bivalves (Schlenk & Buhler, 1989; Livingstone *et al.*, 1989). Le système MFO (Mixed-function oxidase) (cyt P-450, cytochrome b5, NADPH-cytochrome c reductase) a été trouvé chez *M. galloprovincialis* (Porte *et al.*, 1991).

Les enzymes de phase II rendent le xénobiotique plus soluble en formant un composé hydroxylé ayant une propriété hydrosoluble. Ces enzymes sont les glutathion-S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT), les sulphotransférases (ST) et les époxydes hydrolases (EH). Ces systèmes enzymatiques interviennent à la fois sur des xénobiotiques entrant dans la cellule et

sur des molécules préalablement modifiées par les enzymes de phase I. Ces enzymes ont été identifiées dans la glande digestive mais pas dans les hémocytes de *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* et la moule zébrée, *Dreissena polymorpha* (Parant, 1998).

Les enzymes de phase III regroupent les protéines membranaires capables d'expulser hors de la cellule un xénobiotique modifié par les enzymes de phase I et/ou de phase II. La protéine la plus étudiée chez les mammifères est la protéine MRP (Multidrug Resistance related Protein). En ce qui concerne l'expulsion des xénobiotiques non modifiés, la glycoprotéine P-170, produit du gène *mdr-1* chez les mammifères, est la plus référencée. Aucune enzyme de phase III n'a été mise en évidence chez les bivalves à ce jour. Cependant, la présence d'une protéine membranaire similaire à la Gp170 (Gp170-like) agissant sur les xénobiotiques non modifiés a été mise en évidence chez *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, le clam d'Asie, *Corbicula fluminea*, et l'anodonte des cygnes, *Anodonta cygnea* (Parant, 1998). Le mécanisme qu'elle représente est appelé MXRM (Mutli Xenobiotic Resistance Mechanism). Une étude a mis en évidence l'existence d'un phénotype de type MXR (Mutli Xenobiotic Resistance) dans les hémocytes de *M. edulis* (Minier & Moore, 1996) bien qu'une autre étude n'ait pas pu reproduire ces résultats (Svensson *et al.*, 2003). L'amplification du gène *mdr-1* a pu être réalisée chez la larve véligère et le naissain de *C. gigas* et pas chez les oocytes et la larve trochophore (Minier *et al.*, 2002). L'activité MXRM existe chez des animaux n'ayant jamais été confrontés à de fortes pollutions dans le milieu (Pain & Parant, 2003).

IV.1.5.2. Métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont des protéines intervenant dans les processus de détoxification intracellulaire. Elles se lient principalement aux métaux afin de prévenir leur diffusion vers l'extérieur (Simkiss *et al.*, 1982). Les MT sont des protéines de faible poids moléculaire (environ 10 kDa), très stables à la chaleur, présentant une proportion inhabituelle de cystéine et une forte absorbance à 250 nm (Bebianno & Serafim, 1998). Depuis, ces protéines ont été bien étudiées chez les mammifères. Le cadmium induisant la synthèse des MT (Viarengo *et al.*, 1985), cette propriété a conduit à leur attribuer un rôle de protecteur des cations divalents toxiques (Cd^{2+} et Hg^{2+}).

L'ARNm de MT a été détecté dans les hémocytes de *C. virginica* (Butler & Roesijadi, 2000) par cytométrie de flux dans les hémocytes d'*O. edulis* (Corporeau & Auffret, 2003). Cependant, chez *O. edulis*, les MT jouent un rôle mineur dans la séquestration du métal (Tanguy *et al.*, 2003).

IV.1.6. Phagocytose

La phagocytose est un mécanisme de défense interne existant chez les vertébrés et les invertébrés. Les hémocytes des mollusques bivalves peuvent phagocyter différents corps étrangers (bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines) (Auffret, 1985) (**Annexe 1b**).

IV.1.6.1. Processus général

Le processus général de la phagocytose peut être divisé en quatre étapes (Cheng & Rodrick, 1975; Cheng, 1983; Fisher, 1986) :

- Reconnaissance de particules étrangères : la rencontre entre les cellules phagocytaires et les particules étrangères peut être réalisée passivement par rencontres aléatoires, ou activement par chimiotactisme : les hémocytes peuvent être dirigés sur le site de l'infection par des substances vraisemblablement produites par la particule étrangère (Feng, 1988). Les cellules phagocytaires reconnaissent alors les particules à phagocyter à l'aide de récepteurs spécifiques et de lectines.
- Attachement des particules à la surface des cellules.
- Internalisation : la membrane cytoplasmique englobe les particules étrangères (phagosome) grâce à des modifications du cytosquelette. Les particules sont alors internalisées dans le cytoplasme des cellules à activité phagocytaire. Les phagosomes fusionnent alors avec les lysosomes pour donner des phagolysosomes. Les enzymes lysosomales contenues dans les lysosomes sont alors libérées dans les phagosomes.
- Destruction des particules internalisées : il existe deux mécanismes principaux pour détruire les produits phagocytés. Le premier est dépendant de l'oxygène (« flambée oxydative ») ; le second fait intervenir principalement les enzymes lysosomales (**Annexe 1c**).

IV.1.6.2. Types cellulaires impliqués

Différents travaux ont cherché à déterminer si la capacité de phagocytose était liée à un type cellulaire particulier chez les bivalves (granulocyte ou hyalinocyte). En effet, les granulocytes possèdent des granules (lysosomes) contenant des enzymes hydrolytiques (Cheng, 1981, 1983; Moore & Gelder, 1985; Pipe, 1990a). Il apparaît que la capacité de phagocytose n'est pas la même pour tous les types hémocytaires chez les bivalves suivant les espèces. Chez *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000) et chez la mye des sables, *Mya arenaria* (Beckmann *et al.*, 1992), les deux types cellulaires sont doués de phagocytose. Cependant, la phagocytose est plus importante pour les granulocytes de *C. virginica* (Cheng, 1981, 1983; Fisher, 1986) et les granulocytes sont capables de se déplacer plus vite que les hyalinocytes chez cette même espèce (McCormick-Ray & Howard, 1991). Chez *M. galloprovincialis*, seuls les granulocytes apparaissent capables de phagocyter le zymosan et des bactéries (*Vibrio tapetis*) (Carballal *et al.*, 1997b).

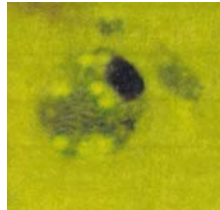


Figure 27 : observation de l'internalisation de billes fluorescentes dans un hémocyte au microscope à épifluorescence. G * 600.

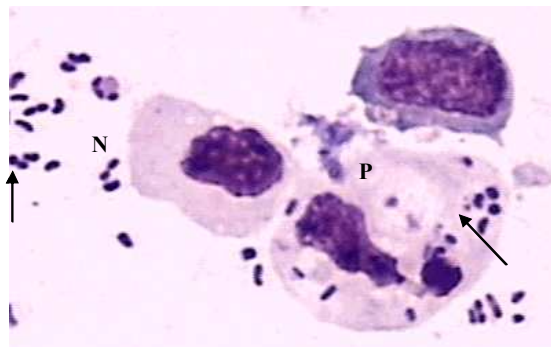


Figure 28 : cytocentrifugation d'hémocytes colorés avec le kit Hémacolor montrant l'internalisation de bactéries. P : cellule ayant phagocyté des bactéries (→), N : cellule n'ayant pas phagocyté de bactéries (G * 1000) (Gay, 2004).

IV.1.6.3. Internalisation

L'internalisation peut être suivie *in vivo* en injectant des substances colorées (encre ou billes) (**Figure 27**) ou *in vitro* en mettant des hémocytes au contact de particules étrangères (bactéries, zymosan, érythrocytes de vertébrés, billes fluorescentes) (**Figure 28**). La phagocytose démarre immédiatement après le contact entre les cellules phagocytaires et la particule étrangère (Cheng *et al.*, 1975; Cheng, 1983; Alvarez *et al.*, 1989). Trois modèles d'internalisation ont été proposés chez les mollusques bivalves. Dans le premier modèle, les particules étrangères seraient attachées à la surface des hémocytes au niveau des filopodes, englobées dans le cytoplasme, puis dans le phagosome. Dans le second modèle, les particules seraient attachées à la surface des hémocytes, puis englobées dans des vacuoles d'endocytose par des invaginations de la surface cellulaire, sans filopodes. Enfin, dans le troisième modèle, les particules entreraient dans les phagosomes par l'intermédiaire de pseudopodes « entonnoirs » (Cheng, 1981).

IV.1.6.4. Dégradation intracellulaire des particules internalisées

La destruction après internalisation est assurée par deux types de processus : (1) un mécanisme faisant intervenir des composés hautement réactifs de l'oxygène (« respiratory burst », « oxidative burst », ou flambée oxydative) et (2) un mécanisme faisant intervenir les enzymes lysosomales (**Annexe 1c**).

(1) La production de formes intermédiaires réactives de l'oxygène (EOR (Espèces Oxygénées Réactives), ROS (Reactive Oxygen Species) ou ROI (Reactive Oxygen Intermediates)) est un phénomène qui existe chez les vertébrés et les invertébrés. Ces réactifs sont le radical anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (OH^\cdot) et l'anion hypochloride (OCl^-) (Torreilles *et al.*, 1996). La production de ces réactifs est initiée par l'attachement du corps étranger à la surface de la membrane cytoplasmique des hémocytes, ce qui active la NADPH-oxydase catalysant la réduction univalente de l'oxygène moléculaire en O_2^- . Ces réactions conduisent à une augmentation de la consommation d'oxygène. Les ions O_2^- peuvent se transformer spontanément ou sous l'action catalytique d'une superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 , l'excès de H_2O_2 étant ensuite réduit en H_2O et O_2 par une catalase ou transformé en acide hypochloreux (HOCl) par une myéloperoxydase (MPO). Ce système joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne des cellules phagocytaires. Il peut être stimulé par du zymosan, des composants de la paroi bactérienne, ou des agents solubles tel que le phorbol myristate acétate (PMA) (Torreilles *et al.*, 1996).

La présence de formes intermédiaires réactives de l'oxygène a été démontrée chez différentes espèces de mollusques bivalves : *M. edulis* (Pipe, 1990a, 1992), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a) *O. edulis* (Chagot, 1989; Bachère *et al.*, 1991), *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991),

C. virginica (Larson *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1992a, b, 1994, 1995; Anderson, 1994) et la moule côtelée, *Geukensia demissa* (Anderson, 1994), mais pas chez *Mya arenaria* et *M. mercenaria* (Anderson, 1994). La myéloperoxydase a été retrouvée chez *M. edulis* (Schlenk *et al.*, 1991) et chez *M. galloprovincialis* (Torreilles *et al.*, 1997).

(2) En parallèle à la réaction de flambée oxydative, le contact entre les hémocytes et les particules étrangères peut stimuler la synthèse d'enzymes hydrolytiques et leur accumulation dans les lysosomes (Cheng, 1983). Différentes enzymes contenues dans les lysosomes des hémocytes sont relarguées à l'intérieur du phagolysosome pour détruire les particules étrangères (cf IV.2.1).

IV.1.6.5. Système de protection des bivalves contre les EOR

Chez les mammifères, de nombreux systèmes anti-oxydants protègent les cellules des EOR toxiques produits par les tissus. Ce sont des enzymes tels que la superoxyde dismutase (SOD) qui dismute les O_2^- en H_2O_2 , la catalase et la glutathion peroxydase (GPX) qui réduisent l' H_2O_2 en eau, la glutathion réductase (GRED) qui régénère le glutathion réduit (GSH), la GST qui catalyse la conjugaison du GSH, la glyoxalase et des composés piègeurs de radicaux de faible poids moléculaire (vitamines A, C et E, caroténoïdes, etc) (Torreilles *et al.*, 1996). Certains de ces systèmes antioxydants ont été mis en évidence chez les bivalves marins : SOD, catalase, GPX et glutathion réductase dans la glande digestive (Livingstone *et al.*, 1992) et dans les hémocytes de *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1993), SOD, catalase et GPX dans la glande digestive de *M. galloprovincialis* (Porte *et al.*, 1991). Cet ensemble de molécules porte le nom de « total oxyradical scavenging capacity » (TOSC).

Lorsque la production d'EOR est amplifiée à la suite d'infections ou d'intoxications, ces systèmes de défense peuvent être dépassés et provoquer chez les bivalves comme chez les mammifères une peroxydation lipidique accrue et des modifications de l'ADN (Torreilles *et al.*, 1996). Les membranes peroxydées deviennent rigides et perdent leur perméabilité et leur intégrité (Valavanidis *et al.*, sous presse).

IV.1.6.6. Devenir des particules étrangères phagocytées dans les hémocytes

La plupart des particules étrangères sont détruites par les hémocytes après la phagocytose. Une étude a décrit l'évolution des matériaux phagocytés dans les phagolysosomes chez *C. virginica* (Cheng, 1981). Pendant les processus de dégradation de l'organisme phagocyté, un grand nombre de granules de glycogène s'accumulent dans le phagolysosome. La membrane de ce dernier se désagrège et les granules de glycogène sont libérés dans le cytoplasme, et peuvent sortir de la cellule par l'intermédiaire de vésicules. Dans l'hémolymph, la membrane des vésicules peut être détruite et le glycogène contenu dedans peut alors être dégradé en glucose. Certains parasites peuvent résister à ces phénomènes de destruction post-phagocytaires (cf V.3.1.3).

IV.1.6.7. Facteurs intervenants dans le phénomène de phagocytose chez les mollusques

La reconnaissance semble être facilitée par des lectines (cf IV.2.2) qui ont un effet opsonisant (Canesi *et al.*, 2002b). Ces opsonines ou agglutinines stimulent la phagocytose lorsqu'elles se lient simultanément à la cellule cible et à la cellule effectrice. Elles sont retrouvées dans l'hémolymphe de nombreux bivalves. Il apparaît que la phagocytose est favorisée lorsque les particules étrangères sont « traitées » avec du sérum de bivalve (Anderson & Good, 1976). Cependant, la phagocytose existe en absence d'hémolymphe, mais son activité est moins importante (Anderson & Good, 1976; Alvarez *et al.*, 1989).

L'endocytose et la digestion intra-cellulaire sont des phénomènes qui nécessitent de l'énergie. Chez *M. mercenaria*, l'énergie nécessaire est produite par la glycolyse et non par la consommation d'oxygène contrairement aux phagocytes mammaliens. En effet, l'ajout de cyanure de potassium n'inhibe pas la phagocytose (Cheng, 1981). La cytochlalazine B inhibe la phagocytose (Chagot, 1989; Bachère *et al.*, 1991). La polymérisation de l'actine est impliquée dans ce mécanisme (Allen & Aderem, 1996; May & Machesky, 2001).

IV.2. Substances solubles présentes dans l'hémolymphe

IV.2.1. Enzymes hydrolytiques lysosomales

L'activité enzymatique de plusieurs hydrolases lysosomales a été détectée dans les cellules et dans le sérum chez les mollusques bivalves. Chez les bivalves, l'hydrolyse de substances peut être réalisées à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. L'effet hydrolytique de ces différentes enzymes, impliquées dans la dégradation des agents infectieux, est un des mécanismes les plus importants rencontrés chez les bivalves marins (Xue & Renault, 2000). Ces activités enzymatiques, étudiées chez plusieurs espèces de bivalves (Moore & Gelder, 1985; Beckmann *et al.*, 1992; Torreilles *et al.*, 1997), proviendraient d'une dégranulation des granulocytes (Cheng, 1981) (**Annexe 1d**).

Le lysozyme est une enzyme à activité bactéricide retrouvée dans le sérum comme dans les hémocytes de nombreuses espèces de bivalves (Cheng *et al.*, 1975). Des taux élevés d'activité du lysozyme ont été mesurés dans le sérum et dans les hémocytes de *M. edulis* (Pipe, 1990a), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), *C. virginica* (Rodrick & Cheng, 1974), *C. gigas* (Mon *et al.*, 1984) et *M. mercenaria* (Cheng & Rodrick, 1975). Cependant, le niveau d'activité en lysozyme peut être plus élevé dans le sérum comparé aux hémocytes, comme chez *C. virginica* (Cheng, 1983).

La β -glucuronidase peut hydrolyser les acides mucopolysaccharidiques qui sont des composants de la paroi bactérienne (Cheng, 1983). Elle est retrouvée dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe

chez *C. virginica* (Cheng & Rodrick, 1975), *M. mercenaria* (Cheng & Rodrick, 1975; Moore & Gelder, 1985), *M. edulis*, *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), *Mya arenaria* (Beckmann *et al.*, 1992), *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000) et dans la fraction acellulaire et les hémocytes de *O. edulis* et *C. gigas* (Xue & Renault, 2000).

Les phosphatases acides ont été trouvées chez *Mya arenaria* (Beckmann *et al.*, 1992) *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), *C. virginica* (Cheng & Downs, 1988), *O. edulis* et *C. gigas* (Xue & Renault, 2000). Des phosphatases acides et alcalines existent chez *C. virginica*, *M. mercenaria* (Cheng & Rodrick, 1975), *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000) et le lavignon poivre, *Scrobicularia plana* (Mazorra *et al.*, 2002).

Les aminopeptidases catalysent l'hydrolyse du peptide N-terminal des protéines sont capables de dégrader des protéines de surface des parasites (Cheng *et al.*, 1978). Cette activité a été détectée chez *C. virginica* et *M. mercenaria* (Cheng & Rodrick, 1975). La leucine aminopeptidase existe chez *R. philippinarum* (Oubella *et al.*, 1994).

Les estérases participent à la dégradation intracellulaire des corps étrangers et au métabolisme des lipides (Auffret, 1985). Elles sont retrouvées chez de nombreuses espèces de bivalves, *O. edulis* et *C. gigas* (hémocytes et sérum) (Xue & Renault, 2000), *Mya arenaria* (Beckmann *et al.*, 1992), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000), *M. edulis* (Galloway *et al.*, 2002) et *M. mercenaria* (Moore & Eble, 1977).

Des inhibiteurs de protéases ont également été détectés dans la partie acellulaire de l'hémolymphe de *C. virginica* et *C. gigas* (Faisal *et al.*, 1998). Ils interviennent dans la digestion des nutriments et dans la régulation de nombreux processus extracellulaires (**Annexe 1d**).

Enfin, l'amylase, la lipase, la β -galactosidase, d'autres enzymes lysosomales, ont également été recensées dans les cellules et le sérum de plusieurs bivalves, notamment *O. edulis* et *C. gigas* (Xue & Renault, 2000). Les peroxydases interviennent dans la flambée oxydative lors de la phagocytose (cf IV.1.6). L'hémolymphe de *C. gigas* possède une sérine protéinase qui pourrait neutraliser les bactériophages d'*Escherichia coli* (Bachère *et al.*, 1990) (**Annexe 1d**).

Les enzymes lysosomales présentes dans le sérum pourraient détruire directement les organismes pathogènes, mais également modifier la configuration moléculaire des surfaces des particules étrangères et favoriser ainsi la reconnaissance et l'attachement des cellules à activité phagocytaire. Elles peuvent également intervenir dans le phénomène d'autolyse sur le site de l'« inflammation » (Cheng, 1983).

Les enzymes hydrolytiques détectées dans l'hémolymphe chez les bivalves proviendraient des hémocytes. La dégranulation des granules (= lysosomes) des granulocytes peut représenter le mécanisme de libération des enzymes hydrolytiques lysosomales (Cheng, 1983). Ce type de phénomène est observé chez les vertébrés. Une étude a en effet démontré que chez *M. mercenaria*,

lors de la dégranulation, les lysosomes migrent vers la surface des granulocytes sous la membrane cytoplasmique. Des lysosomes intacts avec deux membranes (lysosomale et cytoplasmique) peuvent être ainsi libérés par les granulocytes (Mohandas & Cheng, 1985).

IV.2.2. Lectines

Les lectines sont des protéines dépourvues d'activité enzymatique qui ont la propriété de se lier spécifiquement à des oligosaccharides (sucres) sans les modifier. Elles sont détectées dans la quasi-totalité des organismes vivants. Chez les invertébrés, les lectines sont sous forme libre dans le liquide tissulaire et dans l'hémolymphe. Elles peuvent reconnaître des ligands endogènes (sélectines) et exogènes (revue dans Xue, 1998). Dans le cas de la reconnaissance des ligands exogènes tels que des agents pathogènes (virus, bactéries, champignons et parasites), les lectines interviennent du fait de leur spécificité pour certains sucres (mannose, fructose) qui sont normalement présents sur les saccharides terminaux des glycoprotéines observées à la surface des agents pathogènes (Pipe, 1990b). Les rôles supposés des lectines sont les suivants : (1) agglutination conduisant à l'immobilisation des cellules étrangères, évitant la dissémination dans les tissus et diminuant le nombre de cibles, d'où une optimisation de la défense cellulaire ; (2) inactivation des bactéries et parasites par agglutination qui conduirait à la lyse bactérienne par des enzymes et/ou la phagocytose ; (3) opsonisation par la liaison entre des récepteurs présents à la surface des particules et des hémocytes ; (4) fixation sur les hémocytes pour constituer des facteurs de reconnaissance capables de fixer des particules présentant des récepteurs appropriés (Chu, 1988).

IV.2.3. Protéines de stress

La plupart des organismes vivants, des bactéries aux mammifères, peuvent produire des protéines particulières lors de facteurs de stress (blessures, infections, exposition à des polluants). La conservation génétique de ces protéines de stress est un caractère important. Ce sont des protéines de poids moléculaires compris entre 29 et 80 kDa, mais plus généralement les protéines de stress induites par la température (HSP : heat shock proteins) ont un poids de 70 kDa (Karlin & Brocchieri, 1998). Ces protéines sont des protéines chaperons et permettent l'élimination des molécules dégradées. Elles ont été trouvées chez les bivalves marins (Boutet *et al.*, 2003) et participent à leurs mécanismes de défense (Tirard *et al.*, 1997; Lacoste *et al.*, 2001b) : leur expression a été démontrée chez les bivalves après une augmentation de la température (Buckley *et al.*, 2001), une variation de la salinité (un choc osmotique) (Tirard *et al.*, 1997) ou une exposition à des polluants (Werner & Nagel, 1997; Ait-Aissa *et al.*, 2000; Cruz-Rodriguez *et al.*, 2000; Cruz-Rodriguez & Chu, 2002; Corporeau & Auffret, 2003). La synthèse de ces protéines permet aux cellules de supporter les variations environnementales. Ces protéines existent chez *C. gigas* dans la branchie et la glande digestive (Boutet *et al.*, 2003).

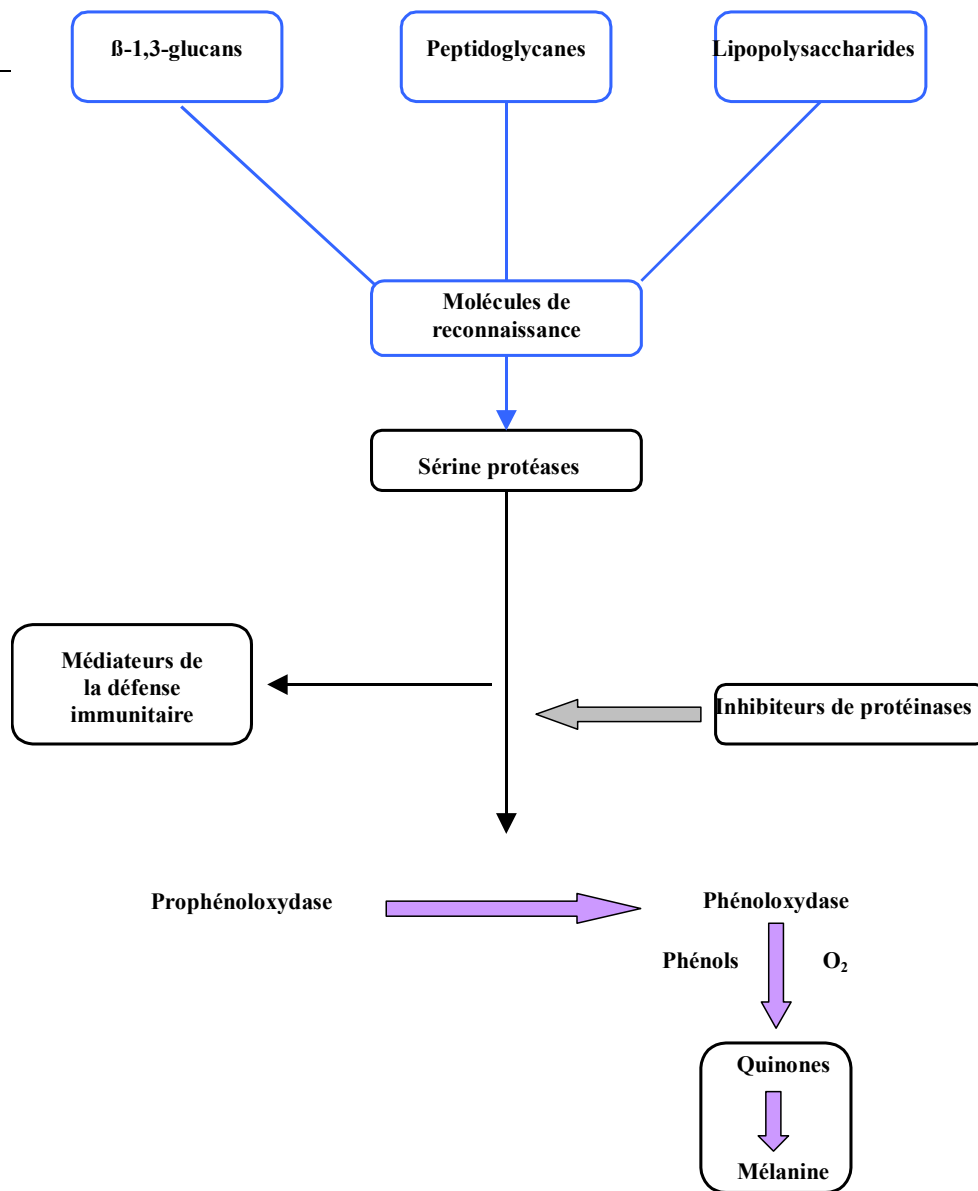


Figure 29 : activation de la cascade phénoloxydase (Modifié d'après Söderhäll & Cerenius, 1998).

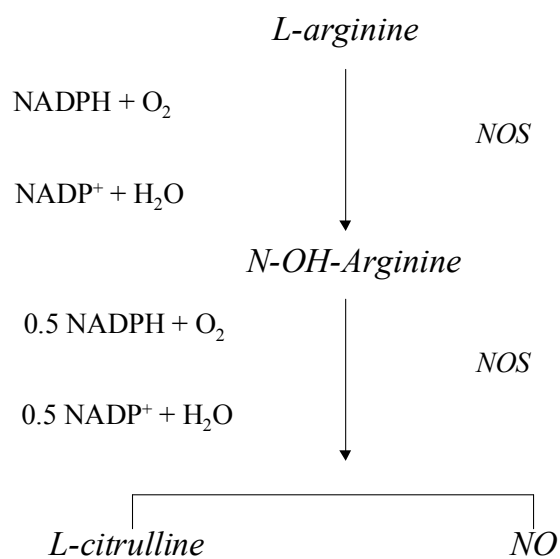


Figure 30 : processus de production de l'oxyde nitrique ou peroxynitrite (NO). NOS : nitrite oxyde synthétase.

IV.2.4. Système pro-phénoloxydase - phénoloxydase

La phénoloxydase (PO) est une enzyme cuivre-dépendante (Coles & 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 L-dihydrophénylalanine (L-dopa) et de la dopamine en dopaquinone. Cette molécule peut à son tour être polymérisée en mélanine en produisant différents intermédiaires à propriétés bactéricides (Coles & Pipe, 1994; Söderhäll & 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 & 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 & Cerenius, 1998; Sritunyalucksana *et al.*, 1999) provoque le clivage de la pro-PO par des digestions protéolytiques et donne la PO, molécule active (Smith & Söderhäll, 1991). Les inhibiteurs de sérine protéase répriment les processus d'activation (**Figure 29**).

Ce système enzymatique est principalement observé chez les arthropodes (Söderhäll & 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 & Smith, 1983). Il semble que le système pro-PO-PO existe également dans l'hémolymphe des mollusques tels que le pecten d'Amérique, *Placopecten magellanicus*, le peigne baie, *Argopecten irradians*, *Geukensia demissa*, *Mya arenaria* (Deaton *et al.*, 1999), *M. edulis* (Coles & Pipe, 1994), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997a), la moule verte asiatique, *Perna viridis* (Asokan *et al.*, 1997), l'huître de roche de Nouvelle-Zélande, *Saccostrea glomerata* (Newton *et al.*, 2004), *Anodonta cygnea* (Soares-da-Silva *et al.*, 2002) et *C. gigas* (Luna-Gonzalez *et al.*, 2003; Gagnaire *et al.*, 2004; Raftos *et al.*, 2004). Cependant, le rôle joué par le système de la proPO-PO dans les mécanismes de défense reste à définir de manière précise chez les bivalves.

IV.2.5. Oxydes nitriques synthétases

Les oxydes nitriques synthétases (NOS) catalysent la production d'oxyde nitrique à partir de la L-arginine en utilisant le NADPH comme cofacteur (**Figure 30**). Ces NOS sont des radicalaires qui peuvent réagir avec d'autres radicaux comme les superoxydes et former un oxydant fort, le peroxyde nitrique (NO) qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien (Torreilles *et al.*, 1999). La production de NO a été démontrée chez les mollusques bivalves et pourrait intervenir comme une voie d'élimination des bactéries parallèle à la phagocytose (Regoli, 2000).

IV.2.6. Cytokines

Les cytokines sont des petites protéines solubles qui constituent des messages que s'échangent différentes catégories de cellules d'un organisme animal, notamment dans des situations d'agression par un agent infectieux. Ces communications intercellulaires permettent la coordination des défenses. Les cytokines forment un groupe très diversifié de molécules ayant de multiples activités sur différents types de cellules. L'effet des cytokines varie en fonction de la cellule cible. L'action d'une cytokine est généralement dépendante de celle d'une ou de plusieurs autres. Cette famille de molécules comporte notamment les interleukines (IL), les molécules de la famille du TNF (Tumor Necrosing Factor), les interférons (IFN) et de nombreuses autres substances apparentées.

Des molécules présentant des activités similaires à celle des IL-1 (anti-tumoral, modulateur de l'apoptose) et IL-6 (facteur hématopoïétique) et du TNF α ont été détectées dans l'hémolymphe et les hémocytes de *M. edulis* et peuvent stimuler les réponses de la même manière que les monocytes/macrophages humains (Hughes *et al.*, 1991). Une molécule de type cytokine a également été découverte dans les hémocytes de *C. gigas* (Peatman *et al.*, non publié).

IV.2.7. Substances impliquées dans la cytotoxicité

IV.2.7.1. Substances cytotoxiques

Il peut exister des substances cytotoxiques dans l'hémolymphe de certains bivalves. Chez *M. galloprovincialis*, une protéine cytotoxique de 320 kDa présente dans l'hémolymphe peut détruire des cellules tumorales de vertébrés ainsi que des protozoaires par des processus de polymérisation après attachement à la membrane cellulaire (Hubert *et al.*, 1996). Cependant, cette protéine n'affecte pas les bactéries. Des activités anti-bactériennes probablement liées à des peptides ont été démontrées chez *O. edulis*, *C. gigas* (Hubert *et al.*, 1996) et dans les protéines du plasma de *C. virginica*. Une activité anti-protiste a été démontrée dans le plasma de *M. edulis* et *Geukensia demissa* (Anderson & Beaven, 2001). Le lysozyme est également connu pour ses propriétés bactéricides (cf IV.2.1). Ces propriétés des hémocytes de bivalves rappellent celles des cellules NK (« Natural Killer ») de vertébrés.

IV.2.7.2. Peptides anti-bactériens

Plus de 700 peptides anti-microbiens ont été découverts chez les plantes, les vertébrés et les invertébrés, en particulier chez les insectes (Bachère *et al.*, 2004). L'existence de peptides anti-microbiens est relativement bien définie chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Des travaux ont démontré la présence dans les hémocytes circulants des moules de substances ayant des propriétés anti-microbiennes (défensines, mytilines et myticines) (Mitta *et al.*, 2000a, b, c, d). Ces peptides sont de nature cationique et riches en cystéine. Ils semblent être présents dans des sous-populations

hémocytaires spécifiques. Les peptides anti-microbiens sont synthétisés dans les granules des granulocytes ou des leucocytes polymorphonucléaires pour intervenir dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagocytes, puis sont ensuite libérés dans l'hémolymphe pour prendre part aux réponses systémiques. Ce type d'action est unique et se rapproche davantage des phagocytes mammaliens que de ceux des insectes. Une étude récente démontre la présence d'une défensine chez *C. gigas* (Gueguen *et al.*, communication personnelle).

IV.2.7.3. Molécules antivirales

Peu de recherches ont été effectuées sur les potentielles molécules antivirales chez les mollusques bivalves. D'anciens travaux rapportent une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac dans des extraits de *M. edulis*, *M. mercenaria* et *C. gigas* (Limasset, 1961). Une activité dirigée contre un virus oncogène a également été détectée dans des extraits de la glande digestive de *M. mercenaria* (Li *et al.*, 1968). La molécule, correspondant à une activité intracellulaire, a été nommée Paolin. Des travaux plus récents ont mis en évidence *in vitro* une substance issue du sérum d'hémolymphe de *C. gigas* adultes capables de neutraliser l'activité de coliphage T3 ; cette activité serait due à une sérine protéase (Bachère *et al.*, 1990). Chez cette même espèce, un peptide issu d'un hydrolysat protéique intervenant en tant qu'inhibiteur de la protéase du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) a été isolé (Lee & Maruyama, 1998). Ces travaux ont été complétés par une étude récente qui a démontré un effet antiviral de l'hémolymphe de *C. gigas* sur le virus HSV-1 (Herpes simplex virus type 1) et NPI (Necrose pancreatic infection) (Olicard *et al.*, 2005).

V Facteurs affectant les mécanismes de défense chez les mollusques bivalves

V.1. Origine génétique

De nombreux travaux chez les invertébrés marins indiquent que la résistance vis-à-vis de maladies infectieuses pourrait être contrôlée génétiquement. Chez les bivalves, des études relèvent l'existence de variations individuelles, au sein d'une même espèce, de certains paramètres hématologiques : phagocytose, activités enzymatiques, quantité de lectines. Ces travaux laissent penser que l'état physiologique et l'origine génétique affectent la défense de ces animaux contre un pathogène.

Les variations physiologiques liées aux conditions environnementales ou à l'hérédité peuvent influencer à la fois l'installation de la maladie et son développement (Gaffney & Bushek, 1996). Cependant, bien que l'on puisse la suspecter, aucune relation directe entre le génotype de l'hôte et le taux d'infection n'a été démontrée chez les bivalves.

Des bivalves appartenant à une même espèce ou à des espèces différentes peuvent présenter des susceptibilités différentes vis-à-vis d'organismes pathogènes. Ceci permet d'envisager un développement des activités conchylicoles par le biais d'obtention de souches résistantes (Grizel & Héral, 1991). Une sélection de populations de *C. virginica* résistantes au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) a ainsi été réalisée aux Etats-Unis à partir des années 70 dans la Baie de Delaware. Les animaux résistants présentaient une plus faible prévalence (51 %) et une faible mortalité (7 %) en comparaison aux animaux sensibles (99 % et 71 %, respectivement) (Ford, 1986).

L'huître plate, *O. edulis*, est naturellement infectée par le parasite *B. ostreae*. Cependant, certaines populations semblent y être résistantes (Elston *et al.*, 1987). Dans ce contexte, l'IFREMER a initié en 1985 un programme de sélection d'huîtres plates, *O. edulis*, tolérantes à la bonamiose (Hervio *et al.*, 1995; Launey, 1998). La survie des populations sélectionnées s'est avérée meilleure que celle de populations naturelles, ce résultat étant conservé après plusieurs générations (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Il est intéressant de constater que les huîtres creuses, *C. gigas*, ne sont pas infectées par ce parasite, tant en milieu naturel que dans des conditions expérimentales (Renault *et al.*, 1995a). Les huîtres creuses semblent posséder une résistance naturelle vis-à-vis de *B. ostreae* (Renault *et al.*, 1995a).

Le parasite *Perkinsus marinus* est un agent pathogène majeur de *C. virginica* (Andrews, 1984). Une étude rapporte que la plupart des huîtres creuses, *C. gigas*, infectées par ce parasite développe une

infection légère et aucune mortalité ne lui est directement liée chez cette espèce (Meyers *et al.*, 1991). Cette différence de tolérance proviendrait de la production par *C. gigas* d'inhibiteurs de protéases et d'hémagglutinines.

Les paramètres hématocytaires peuvent varier en fonction de l'origine génétique. Des populations de *C. virginica* indemnes de mortalité présentent une densité d'hémocytes, un pourcentage de granulocytes et une concentration en lysozyme plus élevée que des populations subissant des mortalités liées à *P. marinus* (Chu & La Peyre, 1993).

Enfin, les différences de ploïdie pourraient être à l'origine de sensibilités différentes à des infections. Chez *C. virginica*, les triploïdes présentent moins de mortalités liées à *Haplosporidium nelsoni* (MSX) bien que la prévalence soit supérieure à celles observées chez les diploïdes (Matthiessen & Davis, 1992). Cependant, aucune différence de résistance n'a été démontrée entre les triploïdes et les diploïdes lors d'infection à *P. marinus* (Meyers *et al.*, 1991; Barber & Mann, 1991).

V.2. Facteurs environnementaux

Chez les mollusques bivalves, les mécanismes de défense sont modulés selon les conditions environnementales. Ces modifications sont liées à des caractéristiques fondamentales des bivalves : poïkilothermie, pluralité des fonctions hématocytaires et système circulatoire semi-ouvert (Cheng, 1981). De plus, ils sont osmo- et thermoconformes (Galtsoff, 1964) et ne possèdent pas de système de régulation. Ils sont donc directement exposés aux fluctuations de l'environnement (température, salinité, polluants, etc).

V.2.1. Facteurs physico-chimiques

Sur l'estran, les bivalves peuvent être soumis à des variations de température élevées (Soletchnik *et al.*, 1998a). Une élévation de la température accroît l'étalement, la mobilité et la fixation de billes chez les hémocytes (Fisher, 1988), le nombre d'hémocytes circulants chez *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998), le nombre d'hémocytes totaux et le pourcentage de granulocytes de *C. virginica* (Chu & La Peyre, 1993). Elle augmente le nombre total d'hémocytes, le pourcentage de cellules viables et l'activité de la leucine aminopeptidase dans les hémocytes de *R. philippinarum* (Paillard *et al.*, 2004). Cependant, certaines activités peuvent être diminuées par une augmentation de la température, comme la phagocytose, chez *O. edulis* (Fisher *et al.*, 1987) et *C. virginica* (Alvarez *et al.*, 1989; Hégarret *et al.*, 2003a, b). La stabilité des membranes lysosomales est également altérée après une augmentation de température chez *Perna viridis* (Nicholson, 2001). Enfin, l'expression de l'ARNm de HSP 70 dans les hémocytes d'*O. edulis* est augmentée après un choc thermique (Corporeau & Auffret, 2003). A l'identique, une faible température peut provoquer

des effets néfastes sur les hémocytes, comme ralentir le processus d'agrégation chez *M. californianus* (Chen & Bayne, 1995), déstabiliser *in vivo* les membranes des cellules et des lysosomes des hémocytes de *M. edulis* (Camus *et al.*, 2000) et diminuer *in vitro* la phagocytose des hémocytes de *C. virginica* (Alvarez *et al.*, 1989). Il a également été démontré que la température influence la membrane hémocytaire, affectant sa structure et sa perméabilité (Fisher, 1988).

Les bivalves peuvent être exposés dans le milieu à de grandes variations de salinité (6-36 ‰) (Galtsoff, 1964). La salinité est négativement corrélée avec le taux de locomotion et le temps d'étalement des hémocytes chez *C. virginica* (Fisher & Newell, 1986) et est positivement corrélée à la stabilité de la membrane lysosomale chez *P. viridis* (Nicholson, 2001). De faibles salinités (4 ‰) déstabilisent la membrane des hémocytes (Hauton *et al.*, 1998) et diminuent la phagocytose chez *O. edulis* (Fisher *et al.*, 1987) et induisent *in vitro* une baisse de la synthèse de protéines chez les hémocytes de *C. virginica* (Tirard *et al.*, 1997). Une salinité élevée augmente le pourcentage de granulocytes (Fisher, 1988) et diminue la concentration en lysozyme chez *C. virginica* (Chu *et al.*, 1993).

Un effet saisonnier est observé sur la concentration en hémocytes et l'activité des lysozymes chez *C. gigas* (Auffret & Oubella, 1994) et la concentration en hémocytes circulants chez *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998). Le pourcentage de granulocytes de *C. virginica* est plus élevé en hiver qu'en été alors que la vitesse de déplacement des hémocytes est plus élevée en été qu'en hiver (McCormick-Ray & Howard, 1991). La saison peut avoir une influence sur l'agrégation des cellules : lors d'un été chaud où la salinité était faible, ce phénomène était inexistant chez *C. virginica* (Fisher, 1988). Certaines activités sont plus élevées en été, comme les activités antioxydantes chez *C. gigas* et *M. galloprovincialis* échantillonnées dans la baie de Biscay (Orbea *et al.*, 2002b) et le nombre d'hémocytes et l'activité bactéricide de *C. virginica* à Pensacola Bay (Fisher *et al.*, 2003). Cependant, une étude chez *M. galloprovincialis* dans le lagon de Venise rapporte des activités PO et peroxydase minimales en juin alors que la phagocytose est maximale (Pipe *et al.*, 1995b).

Un autre facteur de l'environnement pouvant avoir des effets sur les paramètres hémocytaires est le cycle tidal. Les hémocytes de *Mercenaria mercenaria* produisent moins d' H_2O_2 à marée basse, quand l'hypoxie et les mécanismes anaérobies prennent le relais (Hawkins *et al.*, 1993). A marée haute, l'activité du lysozyme est la plus forte. L'émersion affecte la stabilité de la membrane des hémocytes de *P. viridis* (Nicholson, 2001). Enfin, la nourriture est un facteur important. La densité hémocytaire dans l'hémolymphe de *R. decussatus* et *R. philippinarum* diminue après quelques jours de jeûne (Oubella *et al.*, 1993).

V.2.2. Contaminants

De nombreux contaminants peuvent se retrouver dans les estuaires du fait des activités humaines (agriculture, industrie). De nombreuses études ont évalué les effets de ces substances sur les bivalves. Différents contaminants ou différentes concentrations du même contaminant peuvent provoquer des réponses hémoctaires diverses (Cajaraville *et al.*, 1996).

V.2.2.1. Pesticides

L'atrazine (herbicide) seule n'induit pas d'effet sur les paramètres hémoctaires chez *C. gigas* (Gagnaire *et al.*, 2003). L'exposition de *C. gigas* à un mélange de pesticides (100 µg.L⁻¹ d'atrazine, 1 µg.L⁻¹ de diuron et 1 µg.L⁻¹ d'isoproturon) diminue l'agrégation hémoctaire spontanée (Auffret & Oubella, 1997). Les études menées chez les invertébrés ont conclu à des effets génotoxiques pour le glyphosate (Lioi *et al.*, 1998b) et l'atrazine (Bouilly *et al.*, 2003).

Les insecticides organophosphorés et les carbamates comme le paraoxon et le carbaryl sont des inhibiteurs des acétylcholinestérases (AChE) et des carboxylestérases (CE) chez les vertébrés (Cooreman *et al.*, 1993). Les activités acétylcholinestérases et carboxylestérases existent dans l'hémolymph de *M. edulis* et elles sont plus ou moins fortement inhibées après un contact *in vitro* avec l'ésérine, le paraoxon, le chlorpyrifos et le DFP (di-isopropylfluorophosphate) et après un contact *in vivo* avec le paraoxon, l'ésérine ou le DFP (Galloway *et al.*, 2002). Cependant, les cholinestérases des branchies de *C. gigas* apparaissent insensibles aux insecticides (Bocquené *et al.*, 1997).

Une même activité cholinestérase a été trouvée dans les branchies de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* et dans la totalité de l'animal chez *Corbicula fluminea* ; cette activité est faiblement inhibée par des composés organophosphorés comme le malaoxon, l'azaméthiphos et le méthylparaoxon (Mora *et al.*, 1999a). Le carbaryl semble inhiber davantage cette activité (Mora *et al.*, 1999b). Une étude a identifié sept isoformes pour les estérases de l'hépatopancréas de *M. galloprovincialis*, présentant des sensibilités différentes à neuf organophosphatés testés : tous les composés agissent sur au moins une isoforme en l'inhibant (Ozretic, 1992).

Les insecticides peuvent avoir des effets sur d'autres activités que les estérases chez les bivalves. Une étude a montré que la dieldrine et le chlordane diminuent *in vitro* la phagocytose chez *C. virginica* (Larson *et al.*, 1989). Le lindane augmente *in vivo* la production de lysozyme chez *M. mercenaria* (Anderson *et al.*, 1981). Les activités antioxydantes peuvent être modulées par les insecticides : le furadan, un insecticide carbamate, induit une augmentation de l'activité catalase et une diminution de la cholinestérase dans les cellules de branchies de la moule de roche sudaméricaine, *Perna perna*, et de l'huître creuse des Caraïbes, *Crassostrea rhizophorae* (Alves *et al.*, 2002) et le fénitrothion, insecticide organophosphoré, diminue la quantité de glutathion réduit et

oxydé dans la glande digestive, le manteau et les branchies de *M. galloprovincialis* et du pétoncle onde, *Flexopecten flexuosus* (Pena-Llopis *et al.*, 2002).

Le chlorothalonil, un fongicide, diminue *in vitro* la production d'EOR et de NADPH (Baier-Anderson & Anderson, 2000), la viabilité cellulaire et l'activité de phagocytose des hémocytes de *C. virginica* (Alvarez & Friedl, 1992).

Enfin, le pentachlorophénol diminue la production d'EOR chez l'ormeau rouge (*Haliotis rufescens*) et noir (*Haliotis cracherodii*) (Martello & Tjeerdema, 2001) et *in vitro* chez *C. virginica* (Anderson, 1981; Baier-Anderson & Anderson, 1996). Il augmente *in vivo* la production de lysozyme chez *M. mercenaria* (Anderson *et al.*, 1981).

V.2.2.2. HAPs

Certaines études ont porté sur l'influence des HAPs sur le nombre d'hémocytes circulants : une étude chez des huîtres américaines, *C. virginica*, exposées à des sédiments contaminés n'a pas révélé d'effet sur la concentration en hémocytes circulants (Chu *et al.*, 2002). A l'inverse, plusieurs travaux sur des animaux dans le milieu naturel ont démontré un effet de sédiments contaminés sur le nombre d'hémocytes circulants, la locomotion et l'activité bactéricide (Fisher *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). Chez *C. virginica*, les hémocytes prélevés chez des huîtres provenant de sites contaminés présentent une phagocytose réduite par rapport à des huître provenant de sites témoins (Sami *et al.*, 1992). De plus, une exposition des animaux à un sédiment riche en HAPs induit une diminution du nombre de sites d'attachement de la concavoline A (lectine) à la surface des hémocytes (Sami *et al.*, 1993).

Des corrélations ont également été rapportées entre HAPs et lysozyme (*C. virginica*) (Fisher *et al.*, 2003), SOD, cytochrome P450 et catalase (*M. galloprovincialis*) (Porte *et al.*, 1991) et NADPH-P450 réductase (*M. galloprovincialis*, *O. edulis*, *C. gigas*, le manila clam, *Ruditapes semidecussatus*) (Sole *et al.*, 1994).

Le benzo(a)pyrène (BaP) diminue la capacité à se protéger des oxyradicaux chez le peigne islandais, *Chlamys islandica* (Camus *et al.*, 2002) et augmente des activités antioxydantes telles que la SOD et la GPX (Orbea *et al.*, 2002a) et la catalase dans la glande digestive de *M. edulis* (Akcha *et al.*, 2000) mais diminue la GST et l'AChE dans les branchies de *M. edulis* (Akcha *et al.*, 2000). Le BaP augmente la sécrétion d'O₂⁻ et altère la distribution des filaments d'actine chez *M. galloprovincialis* (Gomez-Mendikute *et al.*, 2002). Il augmente également la production de lysozyme chez *M. mercenaria* (Anderson *et al.*, 1981) et provoque des adduits à l'ADN chez *M. edulis* (Akcha *et al.*, 1999).

Plusieurs études rapportent les effets des HAPs sur les lysosomes chez les bivalves *M. edulis* et *C. virginica* (Moore *et al.*, 1978; Lowe *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2002).

Le phénanthrène provoque une diminution de la phosphatase acide et de la liaison aux lectines chez *M. edulis* et une diminution de la phagocytose et de la production d'O₂⁻ chez *C. edule* (Wootton *et al.*, 2003a). Le naphthalène diminue également la production d'EOR par les hémocytes de *C. virginica* (Larson *et al.*, 1989). Cependant, la production d'O₂⁻ peut également être augmentée en présence de HAPs. Le fluoranthène augmente *in vivo* la production d'O₂⁻, la peroxydase, la PO et le nombre d'hémocytes circulants chez *M. edulis* (Coles *et al.*, 1994) La production d'O₂⁻ est également supérieure chez *M. galloprovincialis* provenant de sites contaminés aux HAPs (Cajaraville *et al.*, 1996). Un mélange de trois HAPs (anthracène, fluoranthène et phénanthrène) entraîne la diminution de la phagocytose et de la stabilité de la membrane lysosomale chez *M. edulis* (Grundy *et al.*, 1996b). Ces mêmes composés peuvent avoir les mêmes effets lorsqu'ils sont testés *in vitro* (Grundy *et al.*, 1996a). Enfin, les HAPs provoquent l'augmentation de la production de protéines Hsp 70 dans les branchies de *C. virginica* (Cruz-Rodriguez & Chu, 2002).

V.2.2.3. PCBs

Il existe 209 congénères des PCBs (cf VII.5), mais tous ne sont pas aussi toxiques. Chez *M. galloprovincialis*, le PCB 47 diminue l'activité microbicide, le PCB 153 diminue le relargage d'enzymes lysosomales et les PCB 47, 153 et 77 diminuent la stabilité de la membrane lysosomale ainsi que différents composés de la cascade de signalisation des tyrosines kinases (Canesi *et al.*, 2003). Il semble que les effets des PCBs soient spécifiques du congénère considéré (Coteur *et al.*, 2001). L'exposition à un sédiment contaminé en PCBs induit une suppression de la phagocytose et une diminution du nombre de cellules circulantes chez *Mya arenaria* et la mactre de Stimpson, *Mactromeris polynyma* (Fournier *et al.*, 2002). Les PCBs augmentent la production de protéines hsp 70 dans les branchies et le manteau de *C. virginica* (Cruz-Rodriguez *et al.*, 2000) et augmentent également la quantité de cytochrome P450 chez le flion tronqué, *Donax trunculus* (Arochlor 1254) (Yawetz *et al.*, 1992), et chez *M. edulis* (Shaw *et al.*, 2002).

Des études sur le terrain rapportent des corrélations négatives entre présence de PCBs, densité d'hémocytes et lysozyme (*C. virginica*) (Fisher *et al.*, 2000) alors qu'une autre étude rapporte une corrélation positive entre PCBs et densité hémocytaire (Oliver *et al.*, 2001) et activité bactéricide chez cette même espèce (Oliver *et al.*, 2003). Les PCBs sont également corrélés positivement à la β -glucuronidase (*M. galloprovincialis*) (Lowe & Fossato, 2000), la déstabilisation de la membrane des lysosomes (*C. virginica*) (Hwang *et al.*, 2002) et le contenu en GPX (*M. galloprovincialis*, *O. edulis*, *C. gigas*, *R. semidecussatus*) (Sole *et al.*, 1994).

V.2.2.4. Métaux lourds

Des études sur le terrain ont montré la relation entre présence de métaux lourds et paramètres hémocytaires chez les bivalves : corrélation positive avec le nombre d'hémocytes et la phagocytose

chez *M. galloprovincialis* (Pipe *et al.*, 1995b), avec le nombre d'hémocytes, la capacité de locomotion et la quantité de protéines dans l'hémolymphe et corrélation négative avec le lysozyme chez *C. virginica* (Fisher *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2003).

Cadmium

Les effets du cadmium sur les paramètres hématologiques sont largement décrits. Le cadmium provoque *in vivo* l'augmentation de la densité hématologique (leucocytose) dans l'hémolymphe de *C. virginica* (Cheng, 1988a, b), de *C. gigas* (Auffret & Oubella, 1994) et de *M. edulis* (Coles *et al.*, 1995). L'exposition *in vitro* au cadmium diminue l'agrégation hématologique spontanée chez *C. gigas* (Auffret & Oubella, 1997). Le cadmium peut également inhiber *in vivo* le relargage du lysozyme et d'autres enzymes lysosomales à partir des granulocytes chez *C. virginica* (Cheng, 1990) et chez *M. edulis* (Coles *et al.*, 1995). Le cadmium augmente *in vivo* la phagocytose de *C. virginica* (Cheng *et al.*, 1987; Cheng, 1988a, b) et *in vitro* chez *C. gigas* (Cheng & Sullivan, 1984). La phagocytose des hémocytes de *Mya arenaria* est activée *in vitro* par de faibles doses (10^{-9} et 10^{-8} M) et inhibée par de fortes doses (10^{-4} M) (Brousseau *et al.*, 2000). Ceci a également été démontré pour la production d'EOR : les faibles doses de cadmium l'activent, tandis que les fortes doses l'inhibent chez *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2002) et chez *C. virginica* (Larson *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1992b). Le cadmium peut également altérer *in vivo* la membrane lysosomale chez *M. edulis* (Coles *et al.*, 1995), *R. philippinarum* (Matozzo *et al.*, 2001) et chez *M. edulis* (Marchi *et al.*, 2004). La viabilité des hémocytes peut être diminuée *in vitro* chez *M. galloprovincialis* (Olabarrieta *et al.*, 2001). Le cadmium peut également affecter les anti-oxydants : il provoque une peroxydation lipidique chez *C. gigas* et *M. edulis* (Géret *et al.*, 2002) et il induit une diminution de la SOD dans la glande digestive de *M. edulis* (Orbea *et al.*, 2002a). Cependant, lors d'une contamination *in vivo* de *C. gigas* au cadmium, peu de variations des paramètres hématologiques ont été rapportées (Bouilly *et al.*, soumis b).

Le cadmium est connu pour être un stimulant de la production de métallothionéines (MT) chez les bivalves. Une exposition d'*O. edulis* pendant cinq jours à 4 μ M de cadmium provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm de MT dans les hémocytes (Corporeau & Auffret, 2003). Les MT des branchies de *M. galloprovincialis* sont augmentées de manière plus importante que chez *R. decussatus* par le cadmium (Bebiano & Serafim, 1998).

Mercure

Le mercure est un métal très toxique et ses effets sur les hémocytes de bivalves ont été largement décrits. Deux formes sont principalement étudiées : le chlorure de mercure (HgCl_2) et le

méthylmercure (CH₃HgCl), forme beaucoup plus toxique du fait de sa bioaccumulation plus importante par les organismes (Cossa *et al.*, 1990).

La phagocytose des hémocytes de *Mya arenaria* est activée *in vitro* par de faibles doses de HgCl₂ et de CH₃HgCl (10⁻⁹ et 10⁻⁸ M) et inhibée par de fortes doses (10⁻⁶ M pour CH₃HgCl et 10⁻³ M pour HgCl₂) (Brousseau *et al.*, 2000). Ceci a également été démontré pour *C. virginica* : deux heures de contact *in vitro* à 0.1 mg.L⁻¹ de HgCl₂ stimule la phagocytose alors que des concentrations de 0.5, 1 et 5 mg.L⁻¹ l'inhibent et augmentent la mortalité cellulaire (Cheng & Sullivan, 1984). Chez plusieurs espèces de bivalves (l'elliption maigre de l'Est, *Elliptio complanata*, *Mya arenaria*, la mye tronquée, *Mya truncata*, *M. edulis*, *Mactromeris polynyma*), de fortes concentrations en mercure (10⁻⁴ M pour CH₃HgCl et 10⁻³ M pour HgCl₂) augmentent *in vitro* la mortalité des hémocytes et de plus faibles concentrations (10⁻⁷ M pour CH₃HgCl et 10⁻⁶ M pour HgCl₂) diminuent la phagocytose (Sauvé *et al.*, 2002). Une étude *in vivo* chez *Mya arenaria* a démontré une augmentation de la mortalité des hémocytes et une diminution de la phagocytose (Fournier *et al.*, 2001). Le mercure augmente *in vitro* la mortalité cellulaire et des activités aminopeptidases chez *C. gigas* (Gagnaire *et al.*, 2004) et la déstabilisation de la membrane des lysosomes chez *M. edulis* (Marchi *et al.*, 2004).

Le mercure peut augmenter dans les hémocytes de *M. edulis* la quantité de Ca²⁺ cytosolique à 50 µM en agissant sur les canaux Ca²⁺-voltage dépendants, mais aussi en interférant avec d'autres mécanismes de transport de calcium au travers des membranes, comme les Ca²⁺-ATPases (Viarengo *et al.*, 1994; Marchi *et al.*, 2004).

Cuivre

Comme le cadmium, le cuivre est capable d'induire une leucocytose lors d'exposition *in vivo* de *C. gigas* (Oubella & Auffret, 1995; Boutet *et al.*, 2002) et chez *M. edulis* à de faibles concentrations (Pipe *et al.*, 1999). L'exposition *in vitro* à 10 µg.L⁻¹ de cuivre diminue l'agrégation hémocytaire spontanée chez *C. gigas* (Auffret & Oubella, 1997). La phagocytose peut être modulée en présence de cuivre : de fortes concentrations (0.05 mg.L⁻¹) la diminuent alors que de faibles concentrations (0.2 µg.L⁻¹) l'augmentent chez *M. edulis* et *C. virginica* (Cheng & Sullivan, 1984; Cheng, 1988a, b, 1990; Pipe *et al.*, 1999; Parry & Pipe, 2004).

La stabilité de la membrane lysosomale est également affectée *in vivo* par le cuivre chez *P. viridis* (Nicholson, 2001), *C. virginica* (Ringwood *et al.*, 1998) et *R. philippinarum* (Matozzo *et al.*, 2001). Après un contact de sept jours avec 110 mg.L⁻¹ de cuivre, la phagocytose et la production de SOD sont diminuées (Matozzo *et al.*, 2001). Le cuivre diminue la production d'EOR chez *C. virginica*, *in vitro* (Larson *et al.*, 1989) et *in vivo* (Larson *et al.*, 1989). La production d'anion superoxyde est également diminuée en présence de cet élément chez *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1999). Enfin, le cuivre

(5 à 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$) peut augmenter la peroxydation lipidique et les métallothionéines chez *C. virginica* (Ringwood *et al.*, 1998) et induire des perturbations de l'organisation de l'actine et de la fibronectine en présence de cuivre dans les hémocytes de *M. galloprovincialis* (Fagotti *et al.*, 1996).

V.2.2.5. Organoétains

Le tributylétain (TBT) entraine dans la composition des peintures anti-salissures de bateaux. Il est actuellement interdit mais est encore utilisé illégalement. L'exposition *in vivo* d'huîtres *C. gigas* à 50 ng.L^{-1} de TBT augmente l'agrégation hémocytaire spontanée. Lors de contact *in vitro* avec 40 et 400 ppb de TBT, cette activité est diminuée (Auffret & Oubella, 1997). Le TBT inhibe *in vitro* la production d'EOR à 80 ppb mais l'active à 2 ppb chez *C. virginica* (Anderson *et al.*, 1997). Il diminue l'activité de locomotion et la production d'EOR des hémocytes chez *C. virginica* et *C. gigas* (Fisher *et al.*, 1990). Le TBT et le dibutylétain (DBT) inhibent *in vitro* la phagocytose des hémocytes de *M. edulis*, *Mya arenaria* et *M. polynyma* contrairement au monobutylétain (MBT) (Bouchard *et al.*, 1999). La phagocytose de *R. philippinarum* est également diminuée *in vitro* dès 0.05 μM de TBT ou DBT, et pour 0.1 μM de MBT (Cima *et al.*, 1998). Le TBT et le DBT provoquent chez *M. edulis* une leucocytose, une augmentation de la rétention lysosomale, des modulations de la phagocytose (St-Jean *et al.*, 2002a, b) et une incapacité à détruire *Vibrio anguillarum* (St-Jean *et al.*, 2002b).

V.3. Agents infectieux

V.3.1. Effet des maladies sur les activités hémocytaires

La destruction des agents infectieux résulte d'une action combinée des hémocytes et des facteurs de la défense humorale. Cependant, les agents pathogènes possèdent différentes stratégies afin de limiter les effets du système de défense.

V.3.1.1. Modulation des propriétés des hémocytes

La présence du parasite *B. ostreae* chez *O. edulis* induit une diminution du nombre de granulocytes circulants ainsi que de certaines activités lysosomales comme l' α -naphtyl butyrate estérase (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003) et une augmentation d'autres enzymes telles que les phosphatases alcaline et acide et les estérases (Xue & Renault, 2000). La présence de *Martelia refringens* augmente le nombre d'hémocytes circulants chez *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1998). Le nombre des hémocytes circulants et la leucine aminopeptidase de *R. decussatus* et de *R. philippinarum* augmente après l'injection de *Vibrio tapetis* (Oubella *et al.*, 1993, 1994). *R. philippinarum* infectée par *V. tapetis* présente une augmentation de la mortalité hémocytaire et du lysozyme (Allam *et al.*, 2000; Allam & Ford, 2006; Allam *et al.*, 2006).

V.3.1.2. Inhibition de la phagocytose

Les hémocytes de *C. virginica* et de *C. gigas* ne phagocytent pas les plasmodes d'*Haplosporidium nelsoni* (MSX), ce qui semble être dû à la production de facteurs inhibiteurs par le parasite (Ford *et al.*, 1993). Dans le cas d'un phénomène néoplasique chez *Mya arenaria*, la phagocytose peut également être modifiée (Beckmann *et al.*, 1992). Les produits extracellulaires de *V. tapetis* et *V. anguillarum* diminuent la phagocytose des hémocytes de *R. philippinarum* (Allam & Ford, 2006).

V.3.1.3. Modulation des réactions de dégradation post-phagocytaire

Après phagocytose, certains agents pathogènes sont capables de résister aux processus de dégradation mis en jeu par l'hôte. *P. marinus* produit une sérine protéase qui inhibe la capacité des hémocytes de *C. virginica* de phagocyter *V. vulnificus*, permettant ainsi d'augmenter le nombre de *Vibrios* dans les tissus (Tall *et al.*, 1999). Une étude d'huîtres de *C. virginica* infectées *in vivo* par *P. marinus* a mis en évidence une augmentation significative du nombre de phagocytes et de la production d'EOR chez les sujets les plus infectés (Anderson *et al.*, 1992c, 1995), tandis qu'une autre étude a montré une inhibition *in vitro* de la production d'EOR (Volety & Chu, 1995). La présence de fortes activités de phosphatase acide chez *P. marinus* pourrait intervenir dans la diminution de la production d'EOR (Volety & Chu, 1995). La production d'EOR des hémocytes de *P. maximus* et *C. gigas* peut être inhibée par certaines bactéries (*Alteromonas* spp., *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Vibrio* sp.) (Lambert & Nicolas, 1998; Lambert *et al.*, 2003).

Après phagocytose, une structure de type vacuole parasitophore contient les parasites du genre *Bonamia*, ce qui est une voie d'échappement aux phénomènes de dégradation post-phagocytaire (Chagot, 1989). Les phosphatases acides détectées chez *B. ostreae* pourraient agir sur les hémocytes comme des facteurs toxiques ou des inhibiteurs de la flambée oxydative (Hervio *et al.*, 1991). Les hémocytes d'*O. edulis* montrent un niveau de chimioluminescence plus élevé que ceux de *C. gigas* après une stimulation avec du zymosan ou du parasite *B. ostreae* purifié (Bachère *et al.*, 1991), alors que *C. gigas* est naturellement réfractaire à l'infection par ce parasite *in vivo*.

V. vulnificus peut également résister à l'ingestion et à la dégradation par les hémocytes chez *C. virginica* grâce à une capsule qui l'entoure (Harris-Young *et al.*, 1995).

La synthèse des enzymes lysosomales augmente après un contact avec des bactéries (Cheng, 1981). Le lysozyme augmente après infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis* (Allam *et al.*, 2000, 2006; Allam & Ford, 2006).

V.3.1.4. Dysfonctionnement des cascades de signalisation

Une autre stratégie utilisée par les bactéries afin d'échapper ou de survivre aux mécanismes de défense est de dérégler les cascades de signalisation impliquées dans l'activation des cellules

immunitaires. Une étude a montré que l'activité bactéricide de l'hémolymphe de *M. edulis* s'avérait moins efficace contre *Vibrio cholerae* en comparaison à *E. coli*, car ce *Vibrio* ne stimule pas les cascades de signalisation impliquées dans l'activation de la réponse de l'hôte à l'infection (Pruzzo *et al.*, 2005).

V.3.2. Relations entre facteurs physico-chimiques et sensibilité aux maladies infectieuses

La virulence de certains agents infectieux est corrélée à de fortes températures et de fortes salinités (Chu & Hale, 1994). Ainsi, des études ont montré que la prévalence de *P. marinus* et l'intensité de l'infection sont positivement corrélées à la salinité (Chu *et al.*, 1993) et à la température (Chu & La Peyre, 1993). La virulence du parasite peut être augmentée ou que la résistance des huîtres peut être diminuée à de fortes salinités (Anderson *et al.*, 1995) et de fortes températures. La salinité est directement corrélée à l'infection par *P. marinus* chez *C. virginica* : les fortes infections ne sont retrouvées que pour les salinités moyennes (10 et 20 ‰) et pas pour les très faibles salinités (3 ‰) (Chu *et al.*, 1993). L'intensité de la maladie est plus importante aux fortes températures (25°C et 20°C) (Chu & La Peyre, 1993). La prévalence de *P. marinus* chez *C. virginica* dans la Baie de Chesapeake (USA) augmente en été quand les températures sont supérieures à 20°C, atteint un maximum en septembre et diminue au cours du printemps et de l'automne (Burreson & Ragone Calvo, 1996). L'effet de la saison est prépondérant pour le développement de l'infection à *H. nelsoni* chez *C. virginica* (Ford *et al.*, 1993).

Les fortes salinités peuvent avoir différents effets sur la croissance et la survie d'une bactérie suivant l'espèce considérée. Ainsi, *Vibrio anguillarum* induit une diminution de la production de peroxyde d'hydrogène chez *O. edulis* quand la salinité est de 32 ‰ et n'induit aucun effet à de plus faibles salinités (Hauton *et al.*, 2000). Par ailleurs, la stabilité lysosomale des hémocytes de *C. gigas*, *P. maximus* et *O. edulis* est réduite en présence de *V. anguillarum* à 15°C (Hauton *et al.*, 2001). La prévalence et l'intensité de la maladie de l'anneau brun causée par *Vibrio tapetis* chez *R. philippinarum* diminue quand la salinité augmente (Reid *et al.*, 2003) et quand la température augmente (Paillard *et al.*, 2004). La sensibilité de l'ormeau différemment coloré, *Haliotis diverticolor*, à *V. parahaemolyticus* augmente et ses réponses hémocytaires diminuent quand la concentration en azote ou en nitrite augmente (Cheng *et al.*, 2004a, b).

Le birnavirus à l'origine de phénomènes de mortalité chez la cythérée du Japon, *Meretrix lusoria*, présente un pouvoir pathogène exacerbé envers les stades précoces quand la température de l'eau augmente rapidement (Chou *et al.*, 1994). Le virus de type herpès qui affecte *C. gigas* semble pouvoir persister chez les animaux en absence de signes cliniques et une élévation de température

peut conduire à l'expression de la maladie chez les larves et le naissain (Renault *et al.*, 1994b; Le Deuff *et al.*, 1996).

V.3.3. Relations entre polluants et sensibilité aux maladies infectieuses

Dans l'environnement, les huîtres peuvent être soumises à de nombreux facteurs, notamment les polluants qui peuvent être présents en grande quantité dans les eaux estuariennes. De nombreuses études ont montré que l'exposition à des polluants peut réduire les activités hématocytaires des huîtres telles que la phagocytose ou l'activité anti-microbienne (cf V.2.2). Cette réduction est associée à une augmentation de leur sensibilité à des maladies (Anderson *et al.*, 1981; Cheng, 1988b; Alvarez & Friedl, 1992; Sami *et al.*, 1993; Chu & Hale, 1994).

Le TBT favorise *in vitro* l'infection pré-existante de *C. virginica* par *P. marinus* (Anderson *et al.*, 1996). La mortalité est également augmentée chez les huîtres à la fois contaminées au TBT et infectées par *P. marinus* (Anderson *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent des effets de ces polluants soit sur la multiplication de l'agent pathogène, soit sur les capacités de l'hôte à se défendre. Ce phénomène a également été démontré pour des contaminants organiques : la mise en contact de *C. virginica* avec un sédiment contaminé en HAPs augmente le développement de la maladie et la mortalité liée à *P. marinus* (Chu & Hale, 1994) sans pour autant modifier les paramètres cellulaires et humoraux (Chu *et al.*, 2002). Il peut également exister une interaction entre les différents facteurs abiotiques : une exposition de *C. virginica* à de fortes salinités et à des produits chlorés augmente la mortalité liée à *P. marinus* (Scott *et al.*, 1985).

Après une exposition au BaP, au PCP ou au lindane, la capacité de phagocytose de *Flavobacterium* sp. par les hémocytes chez *M. mercenaria* est diminuée, et certains individus sont totalement incapables de contrôler l'infection, le nombre de bactéries vivantes retrouvées dans l'hémolymphe étant supérieur au nombre injecté (Anderson *et al.*, 1981). Chez *M. edulis*, une exposition au cuivre suivie d'une exposition à *V. tubiashii* augmente le nombre d'hémocytes circulants et diminue la production d'O₂⁻ en comparaison aux animaux non exposés à la bactérie, et la proportion d'éosinophiles est diminuée (Pipe & Coles, 1995). La même expérience impliquant du cadmium induit une leucocytose (Pipe & Coles, 1995). L'augmentation rapide du nombre de cellules suggère un re-largage d'hémocytes depuis les tissus plutôt qu'une prolifération cellulaire. Le même résultat est obtenu chez la même espèce en augmentant la température de 5°C après l'exposition successive au cuivre et à *V. tubiashii* : le nombre d'hémocytes circulants, le pourcentage de basophiles ainsi que la phagocytose augmentent (Parry & Pipe, 2004).

La mortalité de *Meretrix luriosa* augmente après une exposition au cuivre, au cadmium, au zinc ou au mercure survenant après l'inoculation d'un birnavirus en comparaison aux animaux ne recevant pas de virus (Chou *et al.*, 1998).

La plupart du temps, dans ces travaux, aucune relation claire entre une modulation de paramètres hématocytaires et une augmentation de la sensibilité aux maladies infectieuses n'a été établie.

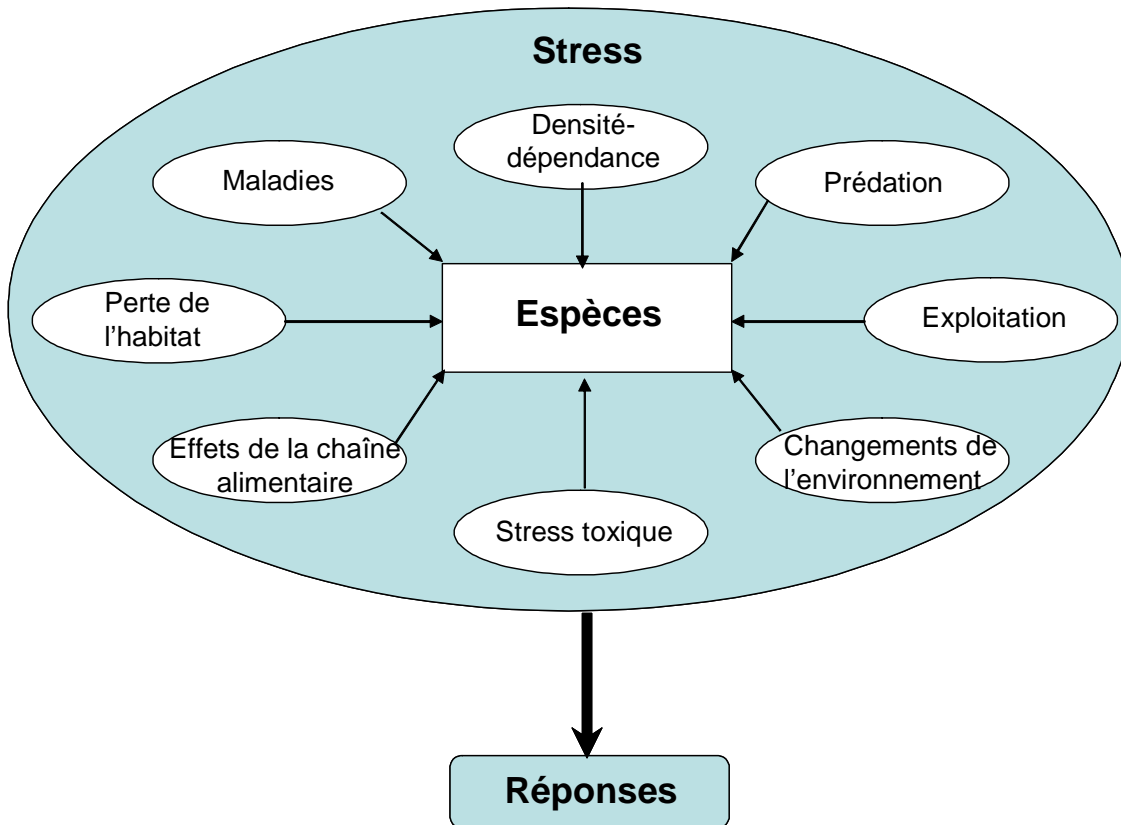


Figure 31 : représentation des différents facteurs des stress pouvant être subis par les organismes vivants dans les estuaires (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003).

VI Risque environnemental

VI.1. Définition du risque

La plupart des ressources vivantes de la Terre se situent dans des zones géographiques spécifiques telles que l'environnement côtier et les systèmes fluviaux (Moore *et al.*, 2004). Ces écosystèmes et les organismes qui y vivent sont de plus en plus soumis à de nombreux facteurs de stress. Les conditions stressantes sont définies comme un état dans lequel l'équilibre dynamique des organismes animaux, appelé homéostasie, est menacé ou perturbé par les actions de stimuli intrinsèques et extrinsèques, communément définis comme des facteurs stressants. En plus de la perturbation de l'équilibre homéostatique, ces facteurs stressants provoquent un ensemble coordonné de réponses génétiques, métaboliques, physiologiques et comportementales devant être compensatoires et/ou adaptatives, permettant à l'animal de surmonter la menace et de maintenir son intégrité. Si un animal subit un facteur de stress intense, la réponse peut perdre sa valeur adaptative et devenir dysfonctionnelle, ce qui peut résulter en l'inhibition de la croissance, un échec reproductif, et une résistance réduite aux agents pathogènes (Wendelaar Bonga, 1997). Les réponses aux facteurs de stress peuvent être observées à différents niveaux d'organisation : cellule, organe, organisme, population et écosystème, l'ensemble étant appelé la réponse intégrée aux facteurs de stress (Wendelaar Bonga, 1997).

Les facteurs stressants à l'origine du risque sont de natures multiples : facteurs naturels (radiations UV, augmentation du niveau de la mer, changements climatiques, érosion du sol, variations de la température, de la salinité, de la quantité d'O₂ dissous, de la turbidité) ; industrialisation et déforestation ; diminution des ressources (sur-pêche) ; interactions entre animaux (prédation, parasites, compétition pour l'espace, la nourriture ou les partenaires sexuels) ; pratiques aquaculturelles (transport, manutention) ; perturbations de l'habitat ; pollution ; maladies induites par les pathogènes (**Figure 31**). Parmi ces facteurs de stress, les contaminations d'origine anthropique, telles que les métaux lourds et les hydrocarbures issus des rejets régulés et non régulés des activités industrielle ou des rejets urbains, apparaissent importantes. De plus, les pollutions agricoles peuvent poser des problèmes majeurs en affectant l'écologie des rivières et des estuaires, en réduisant la qualité des eaux de boisson et la santé des écosystèmes côtiers. L'impact des polluants sur l'écosystème et la santé humaine est un problème international qui devient de plus en plus préoccupant avec l'augmentation constante du nombre de molécules rejetées dans l'environnement (Moore, 2002).

En réalité, les perturbations environnementales comprennent des combinaisons variées de tous ces facteurs de stress (Moore *et al.*, 2004). L'évaluation des impacts du risque environnemental sur les animaux et les plantes est donc un défi majeur étant donnée la complexité des facteurs potentiellement impliqués, mais requiert la détermination effective des effets néfastes sur la santé des individus, tout comme l'identification de la cause (Moore, 2002).

L'évaluation du risque environnemental est définie comme la procédure par laquelle les effets adverses réels des polluants ou d'autres activités anthropogéniques sur les écosystèmes sont estimés avec un degré connu de certitude en utilisant des méthodes scientifiques. Le processus d'évaluation du risque environnemental comprend une analyse du risque et un aspect plus politique de management du risque. L'analyse du risque est un processus comprenant les éléments suivants : identification des dangers, évaluation des effets, évaluation des expositions et caractérisation du risque ; il s'agit d'un processus scientifique d'estimation de l'importance et de la probabilité des effets. Le management du risque environnemental s'occupe des mesures régulatrices basées sur l'évaluation du risque ; il évalue et il choisit les alternatives pour gérer le risque (van der Oost *et al.*, 2003).

L'évaluation du risque environnemental fait intervenir plusieurs étapes :

- Identification des dangers ;
- Evaluation des effets : relation entre dose d'exposition et incidence d'un effet ;
- Evaluation de l'exposition : doses auxquelles les populations humaines ou les écosystèmes peuvent être exposées ;
- Caractérisation du risque : intégration des trois étapes précédentes : estimer l'incidence des effets délétères de pollutions présentes ou prédictives ;
- Classification du risque : savoir si une réduction du risque est nécessaire ;
- Analyse du risque : équilibre entre les aspects positifs et négatifs de l'action proposée pour réduire ce risque ;
- Réduction du risque : mesures prises pour protéger l'écosystème de ce risque ;
- Surveillance : observation répétée du risque et des mesures prise.

L'évaluation du risque environnemental fait intervenir des études écotoxicologiques. L'écotoxicologie est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leur action sur l'environnement. Elle regroupe des études physico-chimiques, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination, ainsi que des études biologiques, afin de déterminer la qualité du milieu.

Il est de plus en plus reconnu que l'évaluation des impacts des polluants sur les organismes requiert la compréhension des effets au travers de la hiérarchie de l'organisation biologique, depuis les

niveaux moléculaire et cellulaire jusqu'à ceux de l'organisme et de la population, de la communauté et de l'écosystème (Moore *et al.*, 2004). Cependant, bien que les changements induits par les polluants aux niveaux de la population/communauté/écosystème/santé humaine soient les plus importants à étudier, ces niveaux sont généralement trop complexes pour servir au développement d'outils pour la détection précoce et la prédiction des conséquences du risque environnemental (Moore *et al.*, 2004). Il faut donc tenter de détecter des signaux de détresse aux niveaux moléculaire et cellulaire et de les lier aux conséquences possibles aux niveaux d'organisation plus élevés (Moore, 2002).

VI.2. Biomarqueurs

VI.2.1. Généralités

L'évaluation du risque environnemental et l'écotoxicologie font intervenir l'utilisation de biomarqueurs ayant pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution (van der Oost *et al.*, 2003). En effet, la présence d'un xénobiotique dans une partie d'un écosystème aquatique ne signifie pas automatiquement l'apparition d'effets nuisibles. Des relations doivent être établies entre les niveaux externes d'exposition, les niveaux internes de contamination des tissus et les effets défavorables précoces (van der Oost *et al.*, 2003). Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, cellulaire, de l'organisme (physiologie, comportement), de la population et de l'écosystème qui peut être relié à une exposition ou à des effets toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic *et al.*, 1997; Galloway & Depledge, 2001; van der Oost *et al.*, 2003). Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce. Les toxiques présents dans l'environnement sont absorbés par les organismes vivants et se répartissent dans les tissus où ils interagissent avec différentes molécules biologiques. Les interactions moléculaires se traduisent par une (ou des) variation(s) de paramètres biochimiques, qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition de l'organisme aux toxiques. Au-delà d'un certain seuil (dans la dose du polluant ou la durée d'exposition), les signaux de réponses au polluant dévient de l'état normal, ce qui se traduit par la manifestation de nombreux effets à des niveaux hiérarchiques élevés de l'organisation biologique (**Figure 32**). Les changements biochimiques induits par la présence du toxique peuvent avoir des effets physiologiques sur les individus. Lorsque ces modifications physiologiques affectent un grand nombre d'individus, les effets des toxiques sont décelables au sein des populations dont les performances écologiques (taux de croissance, expansion, efficacité d'utilisation des ressources, adaptabilité, etc) peuvent être perturbées. A terme, les déséquilibres

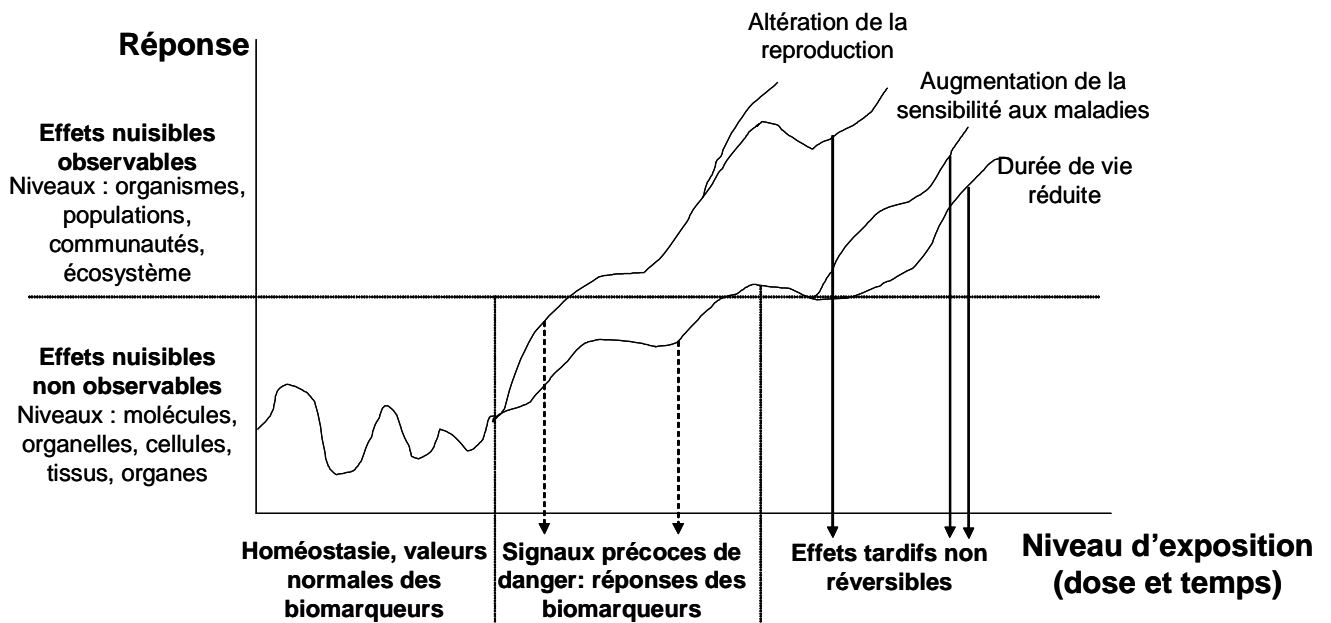


Figure 32 : schéma des réponses des organismes aux effets délétères de l'exposition à des polluants (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003).

provoqués par la disparition ou, au contraire, l'expansion excessive de populations de certaines espèces (espèces bioindicatrices) peuvent se répercuter au niveau des communautés, modifiant ainsi la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble (**Figure 33**).

Des études sur ces biomarqueurs d'alerte précoce se développent depuis plusieurs années. Les biomarqueurs peuvent être regroupés en trois catégories :

- Biomarqueurs d'exposition : ils indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Ils sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans les liquides biologiques (exemple : adduits à l'ADN).
- Biomarqueurs d'effet : ils permettent de montrer qu'après être entré dans l'organisme et après avoir été distribué entre les différents tissus, le xénobiotique a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Les biomarqueurs d'effet non spécifiques (changement de poids de l'organisme) décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress (polluants, facteurs physico-chimiques). Les biomarqueurs d'effet spécifiques sont les réponses de l'organisme entier ou de tissus qui peuvent être associées à une classe particulière de xénobiotiques ; ce sont des paramètres biochimiques, des altérations histopathologiques et cellulaires, des réponses immunologiques.
- Biomarqueur de sensibilité : ils indiquent la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique, incluant les facteurs génétiques et les changements des récepteurs qui altèrent la susceptibilité d'un organisme à cette exposition.

De bons biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité d'un polluant et des réponses biologiques précoces. Les biomarqueurs peuvent donner un aperçu du mécanisme d'action potentiel des contaminants. Un polluant induit une cascade de réponses biologiques, qui peuvent servir de biomarqueurs.

Les biomarqueurs peuvent être utilisés pour définir l'état de santé des organismes et pour obtenir des signaux précoces d'alerte de risques environnementaux. Etant donné que de nombreux biomarqueurs sont des indicateurs à court terme d'effets néfastes à long terme, ces connaissances pourraient permettre d'intervenir avant que des effets nuisibles irréversibles ne se soient produits.

Chez les organismes marins, les biomarqueurs actuellement utilisés sont regroupés en différentes catégories :

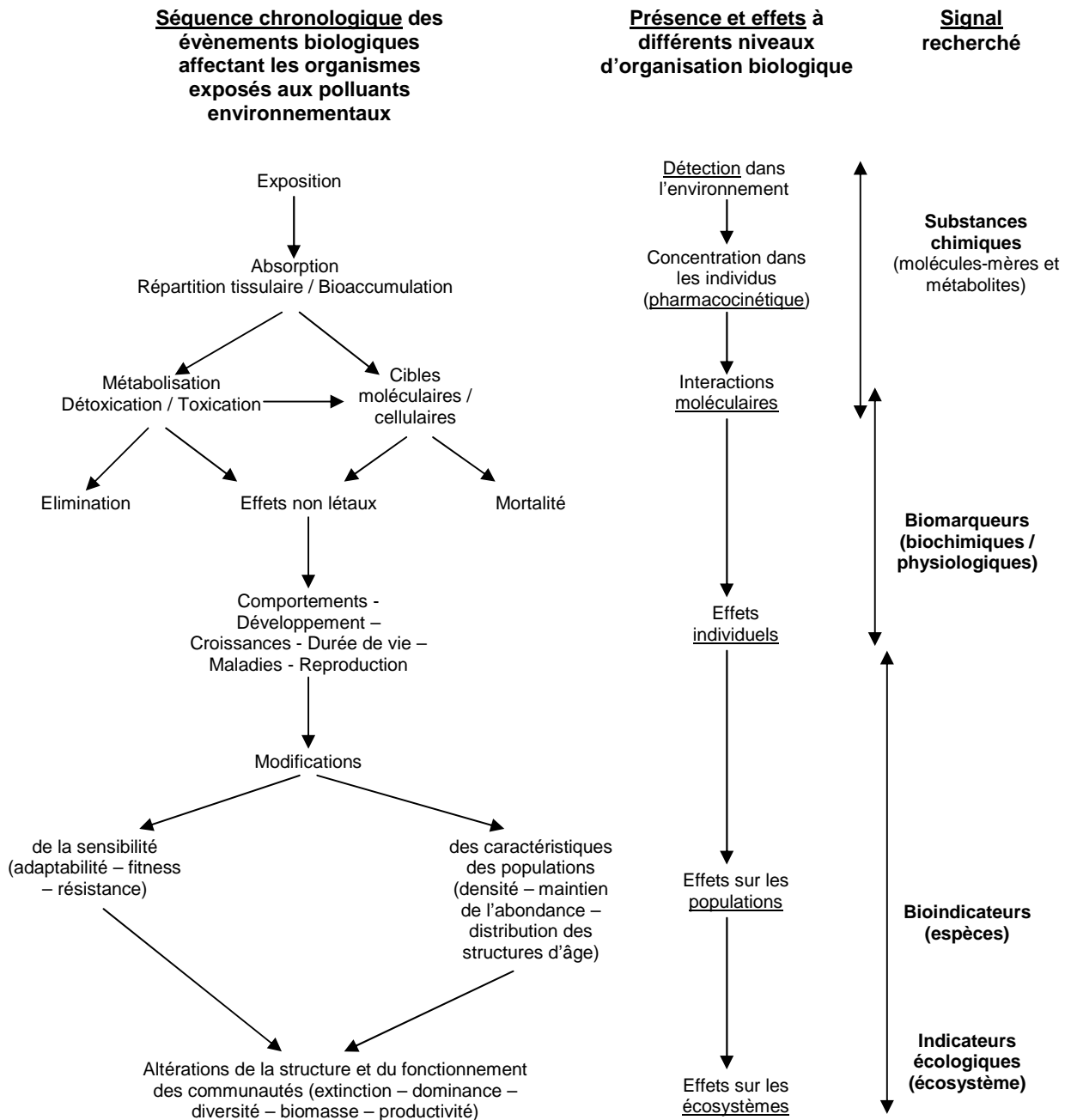


Figure 33 : enchaînement des effets toxiques sur les différents niveaux d’organisation biologique (modifié d’après Lagadic *et al.*, 1997).

- Enzymes de biotransformation : enzymes de phase I (cytochromes b5, P450 et P450 1A, EROD (Ethoxyrésorufine-O-dééthylase), AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase)) et de phase II (GSH, GSSG (glutathion oxydé), GST, UDPGT);
- Paramètres du stress oxydatif (SOD, catalase, GPX, GRED, peroxydation lipidique) ;
- Produits de la biotransformation (métabolites de HAPs) ;
- MT, HSP et mécanisme de résistance aux xénobiotiques (MXR) ;
- Paramètres hématologiques (transaminases, hématocrite, hémoglobine, albumine, lipides) ;
- Paramètres immunologiques (anticorps, nombre de lymphocytes, hormones) ;
- Paramètres reproducteurs (vitellogénine) et endocriniens ;
- Paramètres neuromusculaires (CHE (cholinestérases) et AChE) ;
- Paramètres génotoxiques (adduits à l'ADN, modifications secondaires de l'ADN, effets génotoxiques irréversibles) ;
- Paramètres physiologiques et morphologiques (histopathologie, indice de condition).

Afin d'évaluer la robustesse des biomarqueurs, six points doivent être considérés (Bayne *et al.*, 1979; van der Oost *et al.*, 2003) :

- L'évaluation du biomarqueur doit être sous assurance qualité, coût peu élevé et facile ;
- La réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition au polluant et doit pouvoir servir de marqueur précoce d'alerte ;
- Les données de bases sur les biomarqueurs doivent être connues pour faire la différence entre les variations naturelles et celles liées à un risque environnemental ;
- Les impacts de plusieurs facteurs sur le biomarqueur doivent être établis ;
- Les mécanismes sous-jacents des relations entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant (dose et temps) doivent être établis ;
- La signification toxicologique du biomarqueur, *i.e.* les relations entre sa réponse et l'impact à long terme sur l'organisme, doit être établie.

Dans l'évaluation du risque environnemental, il doit pouvoir exister des relations entre les réponses à différents niveaux d'organisation : les réponses à chaque niveau d'organisation fournissent des informations qui peuvent aider à comprendre et à interpréter la relation entre l'exposition et les effets adverses (van der Oost *et al.*, 2003). Outre l'observation directe des effets des facteurs de stress sur les individus des populations naturelles, l'utilisation de tests réalisés dans des conditions contrôlées plus ou moins complexes (tests de laboratoire, expérimentations en microcosmes, études en mésocosmes) peut permettre de révéler et de valider le rôle prédictif de certains biomarqueurs (Lagadic *et al.*, 1997; Moore, 2002).

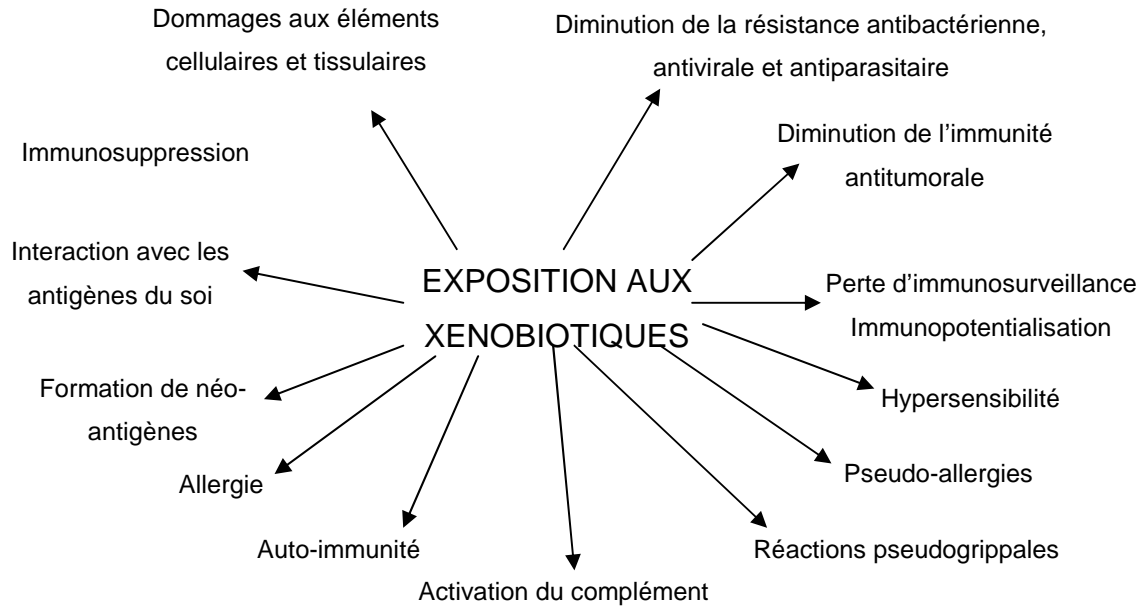


Figure 34 : effets immunotoxiques potentiels des xénobiotiques (Wong *et al.*, 1992).

Niveau fonctionnel	Biomarqueurs
Structure du système immunitaire	Organes lymphoïdes (rate, thymus) Leucocytes circulants (nombre total ou relatif) Protéines plasmatiques (totales ou spécifiques)
Immunité non spécifique	Phagocytose Réponse inflammatoire Cellules tueuses (NK)
Immunité spécifique	Réponse anticorps (taux d'anticorps circulants, nombre de cellules sécrétrices) Réponse cellulaire (rejet de greffets, mitogénèse)
Fonctions régulées par le système immunitaire	Sensibilité à des infections ou à des maladies Apparition de tumeurs

Tableau 4 : niveaux auxquels peuvent être déterminés des biomarqueurs (Lagadic *et al.*, 1997).

La masse des données collectées pourrait permettre de faire intervenir des modèles de simulation de l'effet d'un facteur de stress tel qu'un polluant (Moore, 2002).

L'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs pris à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique) chez diverses espèces apparaît comme l'approche la plus satisfaisante pour le diagnostic des effets des polluants sur les individus (Lagadic *et al.*, 1997). Il convient d'associer des biomarqueurs dont la réponse rapide traduit l'exposition des individus aux polluants, les effets au niveau de l'individu et des biomarqueurs annonçant les effets potentiels au niveau des populations et des communautés (Lagadic *et al.*, 1997).

VI.2.2. Biomarqueurs immunologiques

Le système immunitaire assure la protection de l'animal contre les agents pathogènes et, plus généralement, contre tous les éléments du « non-soi ». Ce système est extrêmement vulnérable aux atteintes dues aux polluants. Bien que des altérations profondes du système immunitaire se traduisent rapidement par une morbidité (voire une mortalité) importante chez les organismes concernés, elles sont souvent précédées de changements dans certains de ses composants, pouvant être utilisés comme biomarqueurs. Ceci est d'autant plus intéressant que ces effets surviennent en général pour des niveaux d'intoxication très inférieurs à ceux qui causent l'apparition d'une toxicité aiguë (Brousseau *et al.*, 1997).

L'immunotoxicité est définie comme les effets adverses que peuvent avoir les substances chimiques sur le système immunitaire. Une substance chimique est considérée comme immunotoxique quand elle induit des événements non désirés, tels qu'une action directe ou indirecte sur le système immunitaire, une réponse immunologique de l'hôte au composé ou une modification des structures de l'hôte en du « non-soi » (Wong *et al.*, 1992). Différentes substances chimiques sont connues pour altérer les fonctions immunitaires en créant, selon les cas, une immunodépression ou une immunostimulation. Une immunodépression se traduit par une baisse de résistance vis-à-vis des infections et par l'augmentation de l'incidence de certains cancers. De plus, l'interaction du système immunitaire avec les réactions de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques entraîne une diminution de l'élimination des substances chimiques chez les individus immunodéficients. Les conséquences d'une immunostimulation chimique sont plus complexes, généralement caractérisées par l'induction d'une réponse qualitativement anormale. Plusieurs réactions d'hypersensibilité ont été ainsi signalées chez l'homme et les animaux de laboratoire : augmentation de la fréquence de phénomènes allergiques, réactions pseudo-allergiques, manifestations pulmonaires de type asthme, réactions pseudo-grippales, anémies hémolytiques auto-immunes et autres maladies auto-immunes (Wong *et al.*, 1992; Krzystyniak *et al.*, 1995; Brousseau *et al.*, 1997) (**Figure 34**).

Les substances immunotoxiques agissent au niveau des cellules et des organes du système immunitaire (métaux lourds, HAPs, pesticides) (Brousseau *et al.*, 1997). Lorsque le système immunitaire est altéré par des composés immunotoxiques, l'hôte peut tenter de restaurer ses fonctions immunitaires ou d'éliminer l'altération en utilisant des mécanismes compensatoires. Cette activité compensatoire peut créer des déséquilibres plus importants, résultant en une perte de la tolérance du soi, de la régulation immunitaire normale et en une augmentation de la sensibilité aux maladies infectieuses (Voccia *et al.*, 1999; Colosio *et al.*, 2005). L'augmentation de la sensibilité aux infections virales, bactériennes et parasitaires et aux tumeurs est l'un des effets les plus dangereux induits par les composés immunotoxiques (Wong *et al.*, 1992).

Chez les vertébrés, les biomarqueurs de l'altération du système immunitaire sont bien définis et peuvent être recherchés à plusieurs niveaux (**Tableau 4**). Chez les invertébrés, la majeure partie des travaux concerne les mollusques bivalves. Des biomarqueurs intéressants semblent être l'agrégation hémocytaire spontanée (Oubella, 1996), la phagocytose (Cheng & Sullivan, 1984; Cheng, 1988a; Sauvé *et al.*, 2002), la production de radicaux libres de l'oxygène (Larson *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1992b; Coles *et al.*, 1995), les enzymes lysosomales (Coles *et al.*, 1994, 1995). La phagocytose est fortement conservée à travers l'évolution et est présente chez toutes les espèces vivantes. Elle semble être un très bon biomarqueur immunologique pour sa capacité à démontrer une immunomodulation dans de nombreuses circonstances (Fournier *et al.*, 2000).

Malgré une certaine diversité, il existe un certain nombre d'analogies entre les systèmes immunitaires des différents groupes d'animaux (Brousseau *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 2000). Comme d'autres biomarqueurs, les biomarqueurs immunologiques peuvent permettre de détecter des effets liés à l'exposition simultanée à des contaminants multiples. Toutefois, il n'est pas possible d'identifier le contaminant responsable de l'effet, car aucune réponse immunitaire spécifique d'un contaminant n'a été déterminée jusqu'à présent (Brousseau *et al.*, 1997). Du fait de la complexité du système immunitaire, il n'existe pas une fonction unique qui permettrait d'évaluer les effets néfastes d'un xénobiotique donné (Wong *et al.*, 1992).

Les réponses des biomarqueurs immunologiques sont parfois contradictoires puisque, pour un même contaminant, les effets peuvent aller d'une immunodépression plus ou moins totale à une immunostimulation, en passant par une absence d'effet, selon l'espèce étudiée, le mode et la durée d'exposition, le protocole, etc. Cette variabilité de réponse est le résultat des caractéristiques de chaque espèce et de la complexité du système immunitaire, même si la standardisation des protocoles et la prise en compte des autres facteurs de stress permettent, dans une certaine mesure, de la limiter (Wendelaar Bonga, 1997; Brousseau *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 2000).

Les biomarqueurs immunologiques sont donc bien connus et faciles à mesurer en laboratoire. Ils doivent cependant être validés par la mise en œuvre d'expériences *in situ*. Des études récentes ont

montré l'intérêt d'une approche multi-marqueurs, tout en mettant en évidence l'intervention de facteurs immunomodulateurs autres que les contaminants susceptibles de modifier la réponse des biomarqueurs immunologiques et de gêner l'interprétation de cette réponse (Chevre *et al.*, 2003; McClain *et al.*, 2003). L'intérêt d'une approche multi-marqueurs est de faire intervenir des biomarqueurs généralistes qui permettent de caractériser rapidement un dysfonctionnement du système immunitaire et d'autres biomarqueurs plus précis, qui donnent des indications sur les mécanismes concernés (Brousseau *et al.*, 1997). Cette approche se développe aujourd'hui avec le développement d'outils permettant d'intégrer les réponses de plusieurs biomarqueurs (Beliaeff & Burgeot, 2002).

VI.2.3. Limites d'utilisation des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des outils puissants car ils intègrent une large gamme de facteurs environnementaux, toxicologiques et écologiques. Cependant, ces mêmes facteurs peuvent compliquer l'interprétation de la signification des réponses des biomarqueurs. Les écosystèmes répondent à un ensemble d'influences anthropogéniques et naturelles agissant sur eux. De plus, comme de nombreuses substances peuvent affecter les mêmes biomarqueurs, la plupart des réponses des biomarqueurs ne sont pas spécifiques des composés. Leur comportement de dose-réponse n'est que rarement prédictible du fait du manque de recherche sur les réponses de base des animaux (van der Oost *et al.*, 2003). En effet, il existe des variations des biomarqueurs indépendantes de la contamination (saison, cycle biologique) et les connaissances sur les valeurs de base des biomarqueurs en l'absence de contaminants sont faibles. De plus, la réponse des biomarqueurs peut évoluer au cours du temps d'exposition, de la vie d'un organisme ou au fil des générations (Lagadic *et al.*, 1997).

Une mise en place réussie de biomarqueurs dans la surveillance environnementale requiert une bonne compréhension des mécanismes sous-jacents des réponses. Cependant, les relations entre les réponses des biomarqueurs et les effets au niveau de la population ne sont pas bien définies. Le manque de connaissances sur la signification écotoxicologique des variations des biomarqueurs constitue un obstacle majeur à leur utilisation pour l'évaluation de l'impact des pollutions sur l'environnement (Lagadic *et al.*, 1997).

L'idéal serait de limiter le jeu des biomarqueurs spécifiques indiquant les effets de l'exposition de toutes les classes majeures de polluants, et des biomarqueurs non spécifiques qui peuvent évaluer les conditions de santé des organismes et de l'écosystème. De nombreux biomarqueurs s'avèrent être prometteurs, mais des travaux sont encore nécessaires avant de pouvoir arriver à une situation idéale (van der Oost *et al.*, 2003).

VII Polluants utilisés dans cette étude

VII.1. Généralités sur les polluants

Une substance d'origine anthropique rejetée dans le milieu est un contaminant, si elle exerce des effets défavorables sur le plan biologique, il s'agit alors d'un polluant ou d'un xénobiotique. Un polluant est donc un élément exogène qui se retrouve dans le milieu sous forme de matière organique ou minérale, soit dissoute, soit en suspension, soit plus rarement en émulsion. C'est un élément qui présente une concentration supérieure à la concentration naturelle dans un système non pollué, qu'il soit étranger au système (radio-éléments artificiels, détergents, pesticides, bactéries fécales, etc) ou au contraire, familier au système (éléments minéraux ou organiques). Un polluant se caractérise par sa toxicité, sa persistance dans le milieu, sa biodégradabilité et son action eutrophisante (Marteil, 1974).

Selon la définition donnée par le GESAMP¹ dans le cas de l'environnement marin, une pollution désigne l'introduction directe ou indirecte par l'homme de substances ou d'énergie dans le milieu marin qui a ou peut avoir des effets nuisibles. Le terme de polluant est donc associé à l'apparition dans le milieu d'effets délétères. La pollution aquatique est devenue une préoccupation du fait de l'observation de conséquences défavorables sur les écosystèmes et les organismes. Malgré cette prise de conscience, la dégradation de l'environnement marin s'intensifie. L'histoire de la pollution aquatique remonte au début de l'histoire de l'humanité. En effet, la production et les émissions de polluants sont souvent dérivées des activités humaines, telles que l'agriculture, l'industrie, l'urbanisme, le tourisme, etc. Les sources de pollution de l'environnement marin sont multiples. Elles englobent 1) les sédiments sur lesquels divers polluants peuvent s'adsorber, 2) l'eutrophisation qui peut entraîner d'importants changements dans la composition des communautés marines et les blooms algaux qui peuvent être toxiques vis-à-vis des autres organismes aquatiques et l'homme, 3) les activités aquacoles qui peuvent produire des effluents riches en agents polluants et 4) la pollution biologique (espèces introduites). Ces divers polluants et sources de pollution peuvent avoir des impacts sur la reproduction, le système immunitaire et le système endocrinien des organismes, mais aussi des effets tératogènes.

¹ Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution, des Nations Unies. Ce groupe établit des critères de détermination du profil de danger des substances, de la bioaccumulation, la biodégradation, la toxicité aiguë, la toxicité chronique, l'altération des produits de la mer et les effets physiques.

Log P	Bioaccumulation estimée	Classe GESAMP
$\log P < 1$ ou $\log P > 1$	Pas de bioaccumulation	0
$1 < \log P < 2$	Très faible capacité de bioaccumulation	1
$2 < \log P < 3$	Faible capacité de bioaccumulation	2
$3 < \log P < 4$	Capacité modérée de bioaccumulation (< 1 mois)	3
$4 < \log P < 5$	Forte capacité de bioaccumulation (> 1 mois)	4
$5 < \log P < 7$	Très forte capacité de bioaccumulation (plusieurs mois)	5

Source : Session 12 février 1997 du GESAMP

Tableau 5 : importance du coefficient de partage octanol-eau (log P) dans l'appréciation de la bioaccumulation d'un produit ; la classe GESAMP représente la classe de risque pour ce paramètre.

TOXICITE AIGUE		TOXICITE CHRONIQUE	
Classe GESAMP	Toxicité	Classe GESAMP	Toxicité
0	Produit non toxique ($> 1000 \text{ mg.L}^{-1}$)		
1	Produit quasiment non toxique (100 à 1000 mg.L^{-1})		
2	Produit peu toxique (10 à 100 mg.L^{-1})	2	Faible toxicité chronique (NOEC $> 1 \text{ mg.L}^{-1}$)
3	Produit modérément toxique (1 à 10 mg.L^{-1})	3	Toxicité chronique moyenne (NOEC de 0.1 à 1 mg.L^{-1})
4	Produit assez toxique (0.1 à 1 mg.L^{-1})	4	Forte toxicité chronique (NOEC de 0.01 à 0.1 mg.L^{-1})
5	Produit très toxique (0.01 à 0.1 mg.L^{-1})	5	Très forte toxicité chronique (NOEC de 0.001 à 0.01 mg.L^{-1})
6	Produit extrêmement toxique ($< 0.01 \text{ mg.L}^{-1}$)	6	Produit à toxicité chronique extrêmement forte (NOEC $< 0.001 \text{ mg.L}^{-1}$)

Source : Session 12 février 1997 du GESAMP

Tableau 6 : importance de la dose létale et du NOEC (No Observal Effect Concentration) dans l'appréciation de la toxicité directe d'un produit, qu'il s'agisse de toxicité aiguë ou chronique.

VII.2. Types de polluants

Les polluants sont classés en deux types principaux :

- Les polluants conservatifs qui ne sont pas éliminés du milieu, qu'ils soient dissous dans l'eau ou fixés sur le matériel particulaire ; ce sont les métaux et les polluants organiques non biodégradables. La classification de Polluants Organiques Persistants (POPs) regroupe tous ces polluants conservatifs (HAPs, PCBs, dioxines, furans, dieldrine, chlordane, DDT, HCH, HCB, lindane, endrine, aldrine, Mirex, toxaphène, chlordéone, heptachlore) (ADEME, 2004) ;
- Les polluants non conservatifs qui, à terme, disparaissent : ce sont la matière organique, les sels nutritifs, les bactéries, les virus, les polluants organiques biodégradables (certains hydrocarbures, détergents et produits phytosanitaires).

VII.2.1. Mode d'apport

Les polluants rejetés dans l'environnement peuvent parvenir au littoral de manière ponctuelle ou diffuse. Trois modes principaux d'apports existent (Marteil, 1974) :

- Les apports à partir de navires constitués des rejets de dragage et des rejets communs dus au fonctionnement même des bateaux (ordures, eaux usées, hydrocarbures) auxquels s'ajoutent les substances actives des peintures antisalissures diffusant dans le milieu ;
- Les apports à partir de la terre surtout véhiculés par l'eau douce par le biais des rivières, du ruissellement et de la nappe phréatique, par le biais des rejets directs d'eaux usées urbaines ou industrielles, des rejets d'effluents épurés et des écoulement des réseaux pluviaux ;
- Les apports d'origine atmosphérique constitués de retombées sèches ou d'éléments particuliers et dissous véhiculés par les pluies. La contamination de l'atmosphère provient de la mise en suspension de poussières et d'émissions gazeuses de diverses origines : installation de combustion industrielles ou particulières, procédés industriels, transport routier.

VII.2.2. Classement du risque des polluants

Certains paramètres ont été retenus pour établir un classement du risque potentiel des substances (Rostagno *et al.*, 1999) :

- La solubilité dans l'eau ;
- Le coefficient de partage carbone organique – eau (Koc) qui représente la capacité qu'a un produit à se fixer sur les particules organiques d'un sol ;
- La bioaccumulation : ce paramètre est évalué par le coefficient de partage n-octanol – eau (log KOW ou log P), qui caractérise la lipophilie de la substance (**Tableau 5**). C'est un

indicateur de la tendance du produit à s'accumuler dans les membranes biologiques puis dans les cellules. Il représente également l'aptitude d'une substance de se fixer sur les sédiments, qu'ils soient en suspension ou bien disposés sur le fond.

L'accumulation des polluants se fait d'abord par les membranes cytoplasmiques des organismes planctoniques : les concentrations des polluants sont alors plus élevées dans l'organisme que dans l'eau. Les bivalves filtreurs, en filtrant l'eau pour en retenir les particules nutritives, accumulent les polluants. Si la molécule est plus facilement retenue dans les tissus qu'elle n'en est éliminée, le bilan d'absorption du polluant est positif. Le facteur de bioconcentration sera d'autant plus élevé que l'élimination de la molécule est lente. De plus, pour certains polluants, il peut y avoir une concentration plus importante chez le prédateur par rapport à sa proie. Ainsi, des molécules telles que le mercure se retrouvent à des facteurs de bioconcentration très élevés pour les prédateurs supérieurs (oiseaux, mammifères marins) (Marteil, 1974) ;

- La toxicité : il existe deux types de toxicité :

la toxicité aiguë pour laquelle le polluant a un effet direct et immédiat sur la chaîne alimentaire ;

la toxicité chronique qui est une toxicité à long terme

Un corps est dit « toxique » lorsque, une fois introduit dans le milieu, il provoque la mort de nombreux individus. La notion de toxicité est liée à la quantité de produit nécessaire pour entraîner la mort. La quantité de polluant entraînant la mort de 50 % des individus d'une population en 96 h de contact est désignée dose létale 50 % 96 h ou DL50 96 h. La toxicité sera évaluée par la mesure de la DL50 96h pour les mammifères (exprimée en mg.kg⁻¹) et par la mesure de la LC50 96h (concentration) pour les organismes aquatiques (exprimée en mg.L⁻¹). La DL50 96 h d'un même produit varie suivant la durée de l'exposition et l'espèce testée ; plus sa valeur est faible, plus la toxicité est forte (Marteil, 1974). Un autre paramètre important est la NOEC, concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé (**Tableau 6**) ;

- Les effets insidieux : les matières actives peuvent être cancérigènes, tératogènes (malformations chez le fœtus), mutagènes (occasionnant une altération du patrimoine génétique de l'espèce), ou oestromimétiques (se comportant comme des hormones oestrogènes) (Rostagno *et al.*, 1999).

Les 23 polluants sélectionnés dans ce travail sont présentés dans les paragraphes suivants (**Annexes 1e, 1f**).

VII.3. Pesticides

Un pesticide (ou biocide) est un produit chimique organique ou minéral destiné à lutter contre les organismes « indésirables », tels que bactéries, les mauvaises herbes, les champignons, les insectes ou les rongeurs. Plus de 350 composés actifs qui rentrent dans la composition de 4 000 produits environ sont recensés. Ces produits regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifiques, tels que les herbicides, les insecticides et les fongicides, qui sont les trois types de pesticides utilisés.

D'un point de vue économique, l'utilisation de pesticides apparaît bénéfique : en l'absence de traitements, les rendements de production agricole seraient diminués. Les autres utilisations sont liées aux industries (bois, textile, agro-alimentaire) ou aux traitements des voies ferrées et des routes.

L'utilisation de substances de synthèse telles que les pesticides pose cependant des problèmes en termes de santé publique et de dommages sur les écosystèmes. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être considéré comme étant inoffensif. Les préoccupations concernant les effets de pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de nombreux organismes.

Comparée à la toxicité chez l'homme, la toxicité pour d'autres espèces passe souvent au second plan. Pourtant, il a été mis en évidence, par exemple, une corrélation entre l'activité acétylcholinestérase des poissons et l'épandage de pesticides organophosphorés en zones côtières (PAN, 2005).

Les données présentées ci-dessous correspondent à une synthèse de plusieurs sources d'informations (Marteil, 1974; Rostagno *et al.*, 1999; INRA, 2005; PAN, 2005; EPA, 2005) (**Annexes 1e, 1f**).

VII.3.1. Herbicides

L'opinion publique a été alertée au début des années 80 par le rôle de l'agriculture dans la détérioration de la qualité de l'eau, principalement par les pollutions diffuses à partir des terres agricoles, par ruissellement et infiltration. L'attention s'est surtout focalisée sur les engrais agricoles, notamment les nitrates. Le second motif de préoccupation concerne l'usage des produits phytosanitaires dont le volume a été multiplié par huit entre 1959 et 1990 sur l'ensemble du territoire national en relation avec l'augmentation des surfaces cultivées (Rostagno *et al.*, 1999). Les produits décrits ici peuvent avoir diverses utilisations (**Tableau 7**).

Le 2,4-D est un herbicide sélectif défoliant qui est utilisé dans le traitement de la chute des fruits et dans la régulation de la croissance.

Type de pesticide	Produit	Utilisation
Herbicides	2,4 D	Céréales, maïs, asperges, arbres fruitiers
	Atrazine	Maïs (mars à mai)
	Terbuthylazine	Vigne (mars à avril), maïs (avril à juin) Désherbant des allées, parcs et trottoirs
	Diuron	Luzerne, vigne, asperges, lentilles, poiriers, pommiers (janvier à juillet) Nautisme dans les peintures anti-salissures Désherbant pour les allées, jardins, parcs, trottoirs (février à octobre)
	Glyphosate	Tout type de culture (mars à décembre), vigne (avril à septembre)
	Alachlore	Maïs, soja (mars à mai)
	Métolachlore	Maïs, sorgho, soja, tournesol (mars à juin)
Insecticides	DDT	Lutte anti-paludique, contrôle de la malaria, insecticide de contact
	Chlordane	Fourmis, termites
	Dieldrine	Contrôle de la malaria, termites
	Paraoxon	Traitement des sols et des parties aériennes des végétaux
	Carbaryl	Acariens
	Carbofuran	Faune du sol
Fongicides	Chlorothalonil	Blé, pois, pomme de terre, fruits, vigne Peintures anti-salissures de bateaux
	Fosétyl aluminium	Tout type de culture (février à septembre), vigne (avril à septembre)
Autres	Pentachlorophénol	Préservation du bois, imprégnation de fibres et textiles, traitement des bâtiments

Tableau 7 : utilisations agricoles et non agricoles des pesticides étudiés.

	BaP	Phénanthrène	Anthracène	Pyrène	Fluoranthène	PCP	Atrazine	Diuron
Air	<10 pg/m ³	<0.1 ng/m ³	<0.1 ng/m ³	<1 ng/m ³	1 ng/m ³	1 ng/m ³		
Eau de surface mer	0.01 à 0.1 ng/L	10 ng/L		1 ng/L	<50 ng/L	<1 ng/L		
Eau de surface rivière	1 ng/L	10 ng/L		1 ng/L	<50 ng/L	0.1 à 1 µg/L		
Eau de pluie	10 ng/L	10 ng/L	<20 ng/L	<100 ng/L	<200 ng/L	<1 µg/L		
Eau souterraine			<0.1 ng/L			<1 µg/L		
Sols	2 µg/kg	<10 µg/kg	10 µg/kg	<20 µg/kg	<40 µg/kg			
Sédiments marins	1 µg/kg	<10 µg/kg		<500 µg/kg				
Sédiments de rivière		<10 µg/kg		<500 µg/kg	<1 mg/kg			
Norme qualité environnementale eaux côtière et de transitions			0.01 µg/L		0.09 µg/L	0.22 µg/L	0.6 µg/L	0.2 µg/L

Tableau 8 : concentrations couramment observées pour différentes molécules dans l'air, les eaux et les sols (INERIS, 2005).

L'atrazine est un herbicide sélectif utilisé comme régulateur de la croissance. Elle appartient à la famille des triazines dont les composés sont très persistants dans les sols car ils sont peu sensibles à l'hydrolyse et à la photolyse. Les triazines agissent sur la croissance algale par inhibition du photosystème II de la photosynthèse (fixation d'une quinone sur la protéine de transport d'électrons). La norme de qualité environnementale est de $0.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (**Tableau 8**).

La terbuthylazine est un algicide et un bactéricide appartenant également à la famille des triazines. La vente de la terbuthylazine et de l'atrazine est prohibée depuis le 1^{er} octobre 2002 et son utilisation est interdite depuis le 30 septembre 2003.

Le diuron, un herbicide non spécifique appartenant à la famille des urées substituées (organochloré), est également persistant dans les sols. Son mode d'action est le même que celui des triazines. Les préparations contenant du diuron comme seule substance active sont interdites à la vente depuis septembre 2002 et à l'utilisation depuis septembre 2003. La norme de qualité environnementale est de $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (**Tableau 8**).

Le glyphosate, un herbicide non sélectif et organophosphoré, est efficace contre les mauvaises herbes. C'est le produit actif du Roundup® et du Rodeo®. Il a été utilisé pour contrôler la croissance de macroalgues. Il inhibe la synthèse d'acides aminés et la glutamine synthétase (Tanguy *et al.*, 2005b).

L'alachlore et le métolachlore sont des herbicides sélectifs de la famille des chloroacétamides. L'alachlore est un organochloré et le métolachlore est un organophosphoré. Ils inhibent l'émergence des jeunes plants.

Les concentrations de plusieurs herbicides diffèrent selon les régions (**Figure 35**).

VII.3.2. Insecticides

VII.3.2.1. Organochlorés

Ce sont les premiers insecticides qui ont été commercialisés. Ce sont des hydrocarbures aromatiques chlorés (DDT, lindane et dieldrine). Le DDT était un insecticide couramment utilisé contre les moustiques dans le contrôle de la malaria comme insecticide de contact entre 1940 et 1960. Son utilisation a été fortement diminuée pendant les années 70 du fait de sa persistance dans l'environnement. Les organismes cibles ont développé une importante résistance. De plus, des effets nocifs ont été observés chez les poissons et les oiseaux. Les facteurs de bioconcentration (BCF) du DDT peuvent atteindre 50 000 et 150 000 pour ces animaux. Ce composé est aujourd'hui interdit à la vente. Il est néanmoins présent dans les eaux des estuaires ; les valeurs maximales sont trouvées dans certains étangs méditerranéens, notamment le bassin de Thau ($10\text{-}20 \mu\text{g.L}^{-1}$). Il reste

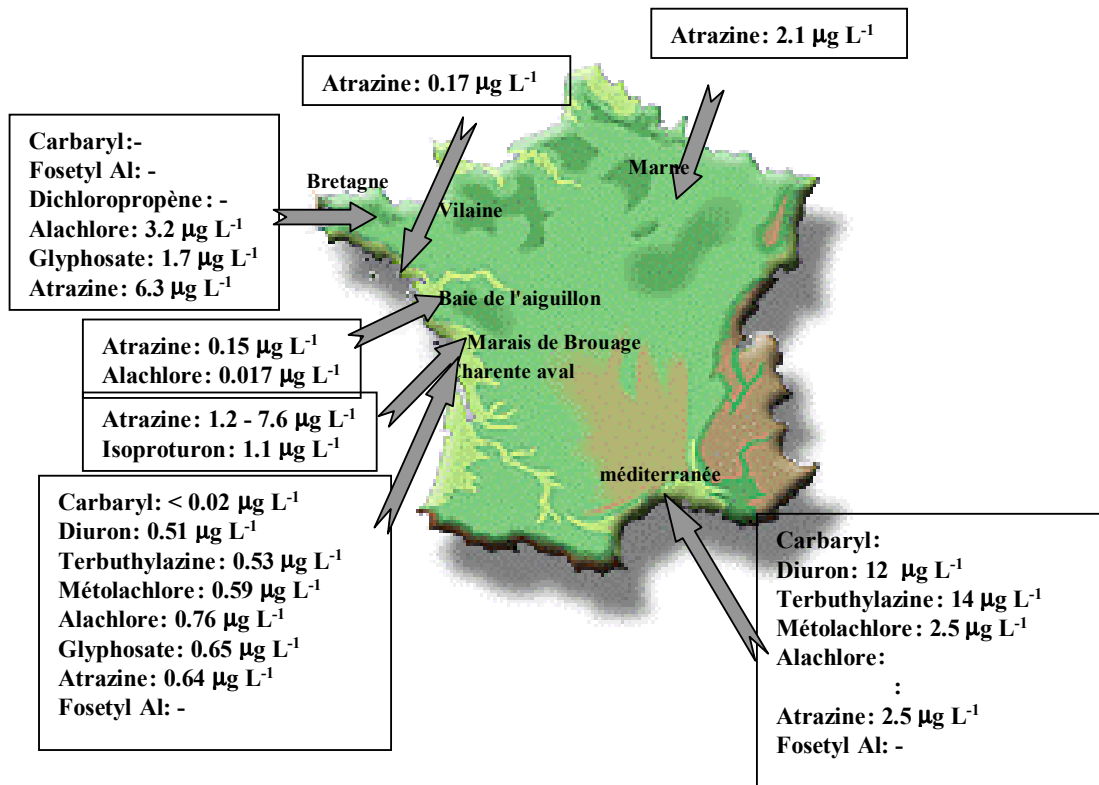


Figure 35 : concentrations en pesticides dans les eaux des rivières (Léonard, 2002; Géret, 2003).

également présent dans les huîtres de l'ensemble du littoral. Le DDT est toujours produit et utilisé dans certains pays.

Le chlordane est utilisé contre les termites. La dieldrine est un produit de métabolisation de l'aldrine.

VII.3.2.2. Organophosphorés

Les insecticides organophosphates agissent en inhibant l'acétylcholinestérase. Ces produits ont remplacé les organochlorés. Ils sont solubles dans l'eau. Le paraoxon provoque l'accumulation d'acétylcholine libérée par les terminaisons nerveuses. C'est un produit de dégradation du parathion, et il est plus toxique que la molécule-mère.

VII.3.2.3. Carbamates

Les insecticides carbamates inhibent également l'acétylcholinestérase. Le carbaryl et le carbofuran, carbamates à large spectre, sont beaucoup utilisés depuis l'interdiction du DDT. Ils sont également utilisés comme molluscicide.

VII.3.3. Fongicides

Le chlorothalonil est un fongicide à large spectre utilisé pour la protection d'une grande variété de légumes, de céréales et de fruits et sur la vigne. Il est également utilisé dans les peintures anti-salissures de bateaux. Le fosétyl aluminium est un fongicide-bactéricide organophosphoré à base de sels d'aluminium utilisé pour les cultures fruitières. Il inhibe la synthèse d'acides aminés (Ma *et al.*, 2002).

VII.3.4. Pentachlorophénol

Le PCP est un pesticide organochloré utilisé comme herbicide, insecticide, fongicide et molluscicide. Il est produit industriellement. Il est également employé dans les installations industrielles notamment pour la préservation du bois, l'imprégnation de fibres et textiles et pour le traitement des bâtiments. Le traitement du bois et le lessivage des sols contaminés contribuent à la contamination des eaux de surface, puis souterraines. Dans l'eau, le PCP se photolyse ou s'adsorbe à la phase particulaire. Il peut également être biodégradé en aérobie ou en anaérobie. Le facteur de bioaccumulation du PCP est de 45 000 chez *Dreissena polymorpha* (INERIS, 2005). Chez l'homme, le PCP est absorbé par la peau. Après passage dans le sang, il se combine aux protéines plasmatiques et est éliminé par l'urine. Il agit sur le découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la membrane mitochondriale et empêche à terme la croissance des cellules. L'intoxication accidentelle au PCP entraîne la mort dans 60 % des cas (INERIS, 2005). La norme de qualité environnementale est de $0.22 \mu\text{g.L}^{-1}$ (**Tableau 8**).

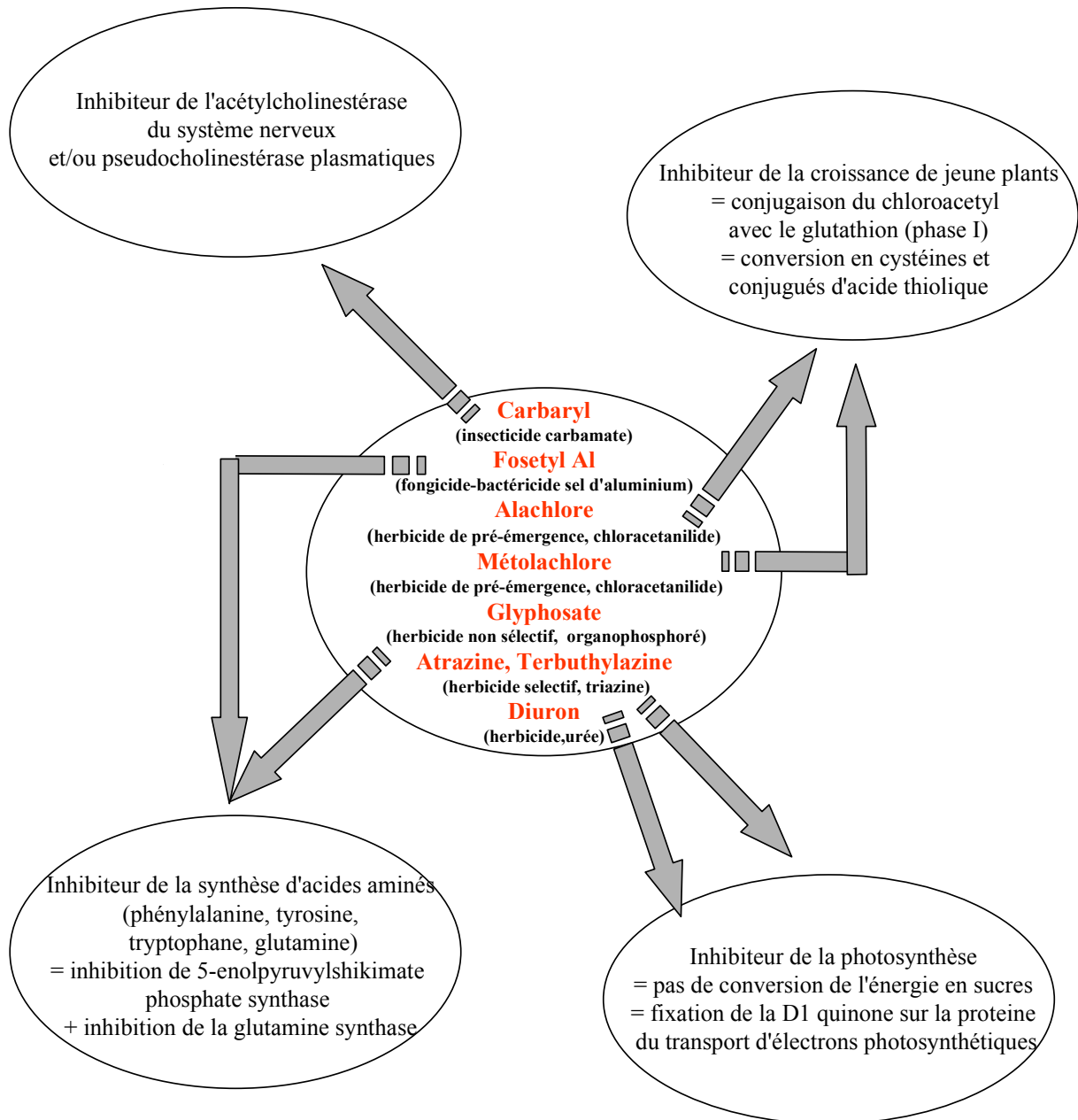


Figure 36 : mode d'action de 8 des pesticides utilisés (Géret, 2003).

L'alachlore, l'atrazine et le diuron sont classés comme des substances à étudier de manière prioritaire par la « Directive Cadre sur l'Eau » 2000/60/CE car ce sont des carcinogènes et des perturbateurs endocriniens et reproducteurs. Le métolachlore et le 2,4-D sont suspectés d'être carcinogènes. Le 2,4-D, l'alachlore et l'atrazine sont également suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. Les herbicides présentent une faible toxicité aiguë. A l'exception du fosétyl-aluminium, les fongicides et insecticides (y compris le PCP) sont carcinogènes et sont suspectés d'agir sur la reproduction, le développement et le système endocrinien. Leur toxicité aiguë est forte ou modérée. La dieldrine et le chlordane sont classés comme des Polluants Organiques Persistants (POPs). Le PCP est classé comme une substance prioritaire au niveau européen par la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE. Les 16 composés sélectionnés sont peu bioaccumulables et peuvent provoquer des perturbations chez les mollusques à différents niveaux (développement, reproduction, comportement, morphologie, physiologie, croissance et survie) (**Annexe 1e**).

Le mode d'action de huit molécules utilisées dans cette étude (cf troisième partie, IV) est présenté (**Figure 36**).

VII.4. HAP

Les HAPs constituent une famille de substances chimiques caractérisées par une structure comprenant plus d'un noyau benzénique. Les HAPs ont trois origines. La plus importante est la source pyrolytique qui correspond à la combustion incomplète de la matière organique (forêt, charbon, pétrole, transports) à haute température aboutissant à leur émission dans l'atmosphère. La seconde est pétrogénique correspondant aux déversements de pétrole dans l'environnement (naturels ou d'origine anthropique). La dernière, moins importante, est la diagénèse précoce, processus qui transforme les dépôts sédimentaires et les roches en pétrole. Les combustibles fossiles, comme le charbon et la houille, contiennent des HAPs. Ils sont peu dégradables. Les HAPs de faible poids moléculaire (2, 3 ou 4 noyaux benzéniques : naphtalène et fluoranthène) sont en grande partie présents dans l'atmosphère sous forme gazeuse. Les HAPs ayant cinq noyaux et plus (BaP) se retrouvent surtout sous forme particulaire.

Les HAPs sont rejetés près des raffineries ou dans les ports (pollution tellurique), et également en haute mer par le déversement des eaux de ballast des pétroliers ou accidentellement après naufrage (pollution pélagique) (Marteil, 1974). Le trafic maritime mondial est le facteur le plus important de pollution par les HAPs. Environ deux millions de tonnes de HAPs peuvent être rejetées par déballastage chaque année. Ceci ne compte pas les nombreux accidents de navigation responsables de la perte en mer de près d'un million de tonnes de pétrole supplémentaires (Marteil, 1974).

Les concentrations en HAPs sont inférieures à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans une zone de référence considérée comme non polluée, de $50\text{-}100 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans une zone faiblement polluée et supérieures à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans une zone fortement polluée (RNO, 2005) (**Annexes 1e, 1f**).

Les HAPs peuvent avoir un caractère toxique aigu ou chronique, mais également un effet mutagène (génotoxicité). La génotoxicité de ces composés est affectée par leur transformation au sein des organismes. Au cours des mécanismes de détoxification, des composés électrophiles peuvent être formés, et se fixer sur les sites nucléophiles de l'ADN et de l'ARN, provoquant des dysfonctionnements cellulaires pouvant conduire au développement de cancers. Le caractère lipophile des HAPs leur confère une grande facilité à franchir les membranes cellulaires et leur permet d'être stockés dans les différents tissus (forte bioaccumulation). Les HAPs sont métabolisés en composés plus hydrosolubles, ce qui facilite leur élimination. Ce métabolisme est observé dans différents tissus et utilise de nombreux systèmes enzymatiques. Les analogies structurales entre les différents HAPs sont à l'origine d'analogies de métabolisme. La plupart des HAPs sont excrétés dans les fèces et les urines.

VII.4.1. Benzo(a)pyrène

Le BaP est produit en petites quantités et son utilisation principale se fait en laboratoire de toxicologie. Il est présent dans les combustibles fossiles et les sources naturelles sont les éruptions volcaniques et les feux de forêt. Il est synthétisé naturellement par les plantes, les bactéries et les algues. Les rejets anthropiques sont liés au raffinage du goudron, l'utilisation du charbon et du kérosène et la fumée de cigarette (INERIS, 2005).

Il est facilement adsorbé dans l'eau et facilement bioaccumulable ($\text{BCF} = 2\ 657$ chez les poissons). Le BaP se distribue dans les organes internes en quelques heures. Il provoque une oxydation induite par les cytochromes P450, ce qui forme des époxydes et des diols époxydes. Ces derniers sont alors transformés en tétrols. Les tétrols se fixent aux macromolécules (protéines, ADN) pour former des adduits. Ces adduits peuvent débiter la cancérogenèse.

Pour être de bonne qualité, les eaux de consommation ne doivent pas dépasser une concentration de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour le total de six substances (Fluoranthène, Benzo(3,4)fluoranthène, Benzo(11,12)fluoranthène, Benzo(3,4)pyrène, Benzo(1,12)pérylène, Indéno(1,2,3-cd)pyrène).

VII.4.2. Phénanthrène

Le phénanthrène est présent dans l'huile d'anthracène obtenue par distillation du goudron et de la houille. Le phénanthrène est utilisé dans l'industrie des matières colorantes, des explosifs et des produits pharmaceutiques. Il est présent dans l'environnement par la combustion incomplète de certains composés organiques tels que le bois et les combustibles fossiles. Il est détecté dans la fumée de cigarette et les échappements de moteur. Il est très peu soluble dans l'eau. Sa

bioaccumulation est assez forte (BCF = 1 280 pour *Mya arenaria* et *M. edulis*) (INERIS, 2005). Il n'existe pas de données sur la dégradation du phénanthrène. Cependant, sa structure ressemblant à celle du benzène, on peut supposer que la voie de dégradation s'y apparente.

VII.4.3. Anthracène

La distillation des goudrons et des charbons permet de recueillir l'huile d'anthracène. L'anthracène est utilisé comme intermédiaire chimique pour la préparation de matières colorantes et pour la formation de polyradicaux destinés à la fabrication de résines. Il est utilisé comme diluant des produits de protection du bois, comme insecticide et comme fongicide. Il est naturellement présent dans les combustibles fossiles, le fioul, l'essence et les fumées émises lors de combustions incomplètes. Les rejets anthropiques sont liés aux échappements des moteurs, au raffinage du pétrole et à la fumée de charbon de bois. L'anthracène s'adsorbe facilement à la matière en suspension dans l'eau. La bioaccumulation est très importante (BCF = 9 000 pour les poissons) (INERIS, 2005). L'anthracène est un irritant de la peau, des yeux, des muqueuses et du tractus respiratoire chez l'homme.

VII.4.4. Pyrène

Le goudron de charbon contient en moyenne 2 % de pyrène. Il est utilisé pour la fabrication de teintures et comme additif dans les huiles d'isolation électrique. Il est présent dans les combustibles fossiles. Il est libéré dans l'atmosphère lors de la combustion incomplète du charbon et de produits pétroliers. Le pyrène est également présent dans le goudron des revêtements routiers. La production d'aluminium, de fer et d'acier, les fonderies, la combustion de déchets et la fumée de tabac constituent également des sources d'exposition de l'environnement au pyrène. Le pyrène se volatilise à partir de l'eau. Il peut subir le phénomène de photolyse dans les sols superficiels. Les facteurs de bioaccumulation sont élevés (2 700 pour la daphnie, *Daphnia magna*, 4 800 chez les poissons) (INERIS, 2005).

VII.4.5. Fluoranthène

Le fluoranthène fait partie des principaux constituants des goudrons lourds issus du charbon. Il est formé lors de la combustion incomplète du bois et du fioul. Il est utilisé en revêtement de protection pour l'intérieur des cuves et des tuyaux en acier servant au stockage et à la distribution d'eau potable. Il est utilisé comme intermédiaire dans la fabrication de teintures, et sert en pharmacie à synthétiser des agents anti-viraux. Les principales sources naturelles dans l'environnement sont les feux de forêts et les éruptions volcaniques. Les émissions des cheminées et des fours à bois domestiques, des incinérateurs d'ordures ménagères, la production du goudron et de l'asphalte constituent les principales sources anthropiques. Les rejets dans l'environnement sont

principalement atmosphériques. Les facteurs de bioaccumulation sont élevés (4 180 pour *Mya arenaria* et 5 920 pour *M. edulis*) (INERIS, 2005).

Les HAPs sont des molécules très toxiques. Le Benzo(a)pyrène (BaP), le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène sont classés dans la catégorie des substances potentiellement cancérigènes, catégorie 2, par la Directive Substances Dangereuses 67/548/CEE (INERIS, 2005). Ce sont des molécules connues pour leur génotoxicité chez les vertébrés et les invertébrés (Burgeot *et al.*, 1995; Akcha *et al.*, 2000). Le BaP et l'anthracène sont également classés comme des substances dangereuses prioritaires et le fluoranthène comme substance prioritaire par la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE en 2000 (**Annexe 2g**). Les différentes concentrations retrouvées dans l'air, l'eau ou le sol pour cinq composés sont présentées (**Tableau 8**).

VII.5. PCB

Les PCBs représentent une large famille de composés organochlorés de haut poids moléculaire de formule chimique $C_{10}H_{(10-n)}Cl_n$ dans laquelle le nombre d'atomes de chlore (n) peut varier entre 1 et 10. Ce sont des mélanges de composés aromatiques à squelette biphénylique dont certains atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de chlore. Ces composés de synthèse sont obtenus par chloration du biphényle, qui conduit à des mélanges techniques (Arochlor, Phénoclor) dont les propriétés dépendent de leur taux moyen de chlore. Ils sont extrêmement stables chimiquement, ininflammables, très peu solubles dans l'eau et largement utilisés pour leurs propriétés isolantes. Ils sont utilisés comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, comme lubrifiants dans les turbines et pompes, comme fluide caloporteur ou isolants. Ils sont également utilisés dans la formation des huiles de coupe pour le traitement du métal, des soudures, les adhésifs, les peintures, les vernis, les plastiques et les papiers autocopiants sans carbone. Ce groupe d'hydrocarbures halogénés rassemble 209 congénères qui se distinguent par le nombre d'atomes de chlore fixés sur la molécule (chloro-homologues ou isomères de composition) et par leur position sur le noyau biphénilique. Ce sont les caractéristiques structurales qui déterminent les propriétés physico-chimiques fondamentales de chaque congénère de PCBs (solubilité, pression de vapeur) ainsi que leur pouvoir toxique, leur devenir dans l'environnement et finalement leurs effets sur les organismes. D'une manière générale, les caractéristiques des PCBs les prédisposent à une longue persistance dans l'environnement et à un transport sur de longues distances (RNO, 2002).

Depuis la première identification de ces composés dans l'environnement en 1966, leur présence a été décelée partout sur la planète et dans tous les compartiments de l'environnement : air, eau, sols, sédiments et tissus biologiques. A partir des années 1970, la prise de conscience de leurs effets environnementaux a conduit tout d'abord à limiter l'utilisation des mélanges techniques aux

systèmes clos (transformateurs et condensateurs), puis à l'arrêt de leur production industrielle : la vente et l'acquisition de PCBs ou d'appareils contenant des PCBs ainsi que la mise sur le marché de tels appareils neufs sont désormais interdites en France depuis le décret du 2 février 1987. Cependant, 50 000 tonnes restent encore utilisées en France. La production mondiale cumulée est estimée à 1.5 millions de tonnes. Un décret européen a également établi le plan national de décontamination et d'élimination des appareils contenant des PCBs dont l'échéance est prévue pour fin 2010 (Préfecture de l'Indre, 2005).

Ces molécules sont classées comme des Polluants Organiques Persistants (POPs). Les PCBs sont toxiques, bioaccumulables, mutagènes et tératogènes. Ils peuvent induire des cancers, des affections du système nerveux central, des troubles de la reproduction et des perturbations du système immunitaire. Ils ne seraient pas transmis par la chaîne alimentaire, mais absorbés directement par l'eau car les groupes de poissons et crustacés benthiques ont des teneurs voisines des animaux pélagiques (Marteil, 1974).

Les empreintes de PCBs dans les organismes semblent être surtout définies par les caractéristiques biologiques. La distribution des différents congénères dans les organismes appartenant à des taxons voisins (niveaux trophiques et capacité de biotransformation comparables) est généralement très similaire (RNO, 2002). Ces molécules sont peu métabolisables, et les plus toxiques présentent des doses létales de l'ordre de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les PCBs étant plus solubles dans les lipides que dans l'eau, ils se concentrent donc dans les graisses et les facteurs de bioaccumulation peuvent alors atteindre 10 000 à plus de 1 million (les formes les plus chlorées sont les plus bioaccumulées et dès cinq atomes de chlore, elles ne sont plus dégradées) (Rostagno *et al.*, 1999).

Les concentrations en PCBs sont de 3-5 ng.L^{-1} dans une zone de référence, de 5-10 ng.L^{-1} dans une zone faiblement polluée et de 10-25 ng.L^{-1} dans une zone fortement polluée (RNO, 2005) (**Annexes 1e, 1f**).

VII.5.1. PCB 77

La structure du PCB 77 (non ortho-PCB coplanaire) montre de grandes analogies avec la dioxine (2,3,7,8-TCDD), ce qui classe ce composé dans la catégorie des PCBs apparentés aux dioxines. Ces PCBs contribuent de manière importante à la pollution par les dioxines (RNO, 2002).

VII.5.2. PCB 153

Le PCB 153 fait partie depuis 1982 de la liste de sept congénères à mesurer dans les programmes de surveillance internationaux (RNO, 2002). C'est un des composés les plus persistants et le plus abondant dans les organismes aquatiques. Il est fortement chloré (mono-ortho-PCB non coplanaire), peu soluble et associé aux particules du sédiment superficiel. Il est ainsi retrouvé couramment dans les organismes benthiques nécrophages ou détritivores.

Première partie

Développements méthodologiques



I Introduction

Cette partie est consacrée au développement de biomarqueurs servant à étudier les effets immunotoxiques de différents polluants.

Le premier chapitre de cette partie rapporte la mise au point de protocoles permettant l'étude d'activités cellulaires des hémocytes chez l'huître creuse, *C. gigas*, en cytométrie de flux et les essais de standardisation de ces protocoles. En effet, la cytométrie en flux apparaît adaptée à l'étude des activités cellulaires chez les bivalves du fait de la rapidité d'acquisition des informations et de la possibilité d'analyser de nombreux animaux. Il apparaissait donc intéressant de sélectionner des paramètres hémocytaires et de mettre au point les protocoles pour les suivre en cytométrie de flux. Plusieurs paramètres hémocytaires ont été sélectionnés.

Le deuxième chapitre rapporte les résultats obtenus lors de la comparaison des protocoles utilisés au Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP, IFREMER La Tremblade) et au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Plouzané). Les deux laboratoires travaillent en cytométrie en flux chez des mollusques bivalves en étudiant des activités cellulaires identiques avec des protocoles parfois différents. Il est apparu important de comparer ces différents protocoles afin de standardiser les méthodes de mesure.

Ce chapitre inclut également des essais réalisés afin de déterminer si les activités sélectionnées et mesurées sont propres aux hémocytes. Elles ont été recherchées dans des cellules provenant de différents types de tissus comme la glande digestive et les branchies chez la moule commune, *Mytilus edulis*.

Le troisième chapitre présente les résultats des expériences réalisées en vue d'améliorer le maintien des hémocytes *in vitro*. En effet, aucune lignée cellulaire de mollusque bivalve n'est disponible aujourd'hui. Un taux de mortalité relativement important a été observé dans diverses expériences menées au laboratoire pour les cellules témoins lors d'exposition *in vitro* à des polluants. Les conditions de maintien pour les hémocytes *in vitro* comprenaient alors l'utilisation d'antibiotiques et les expériences étaient réalisées à température ambiante. Si les cellules sont dans un état physiologique perturbé, il est en effet difficile d'analyser l'effet de polluants : la sensibilité des cellules peut être accrue et la mortalité induite par le polluant importante. Inversement, les cellules peuvent présenter une réactivité réduite voire inexistante par rapport aux polluants testés. Dans ce contexte, il apparaissait donc important de tenter d'optimiser les conditions de maintien des hémocytes *in vitro*.

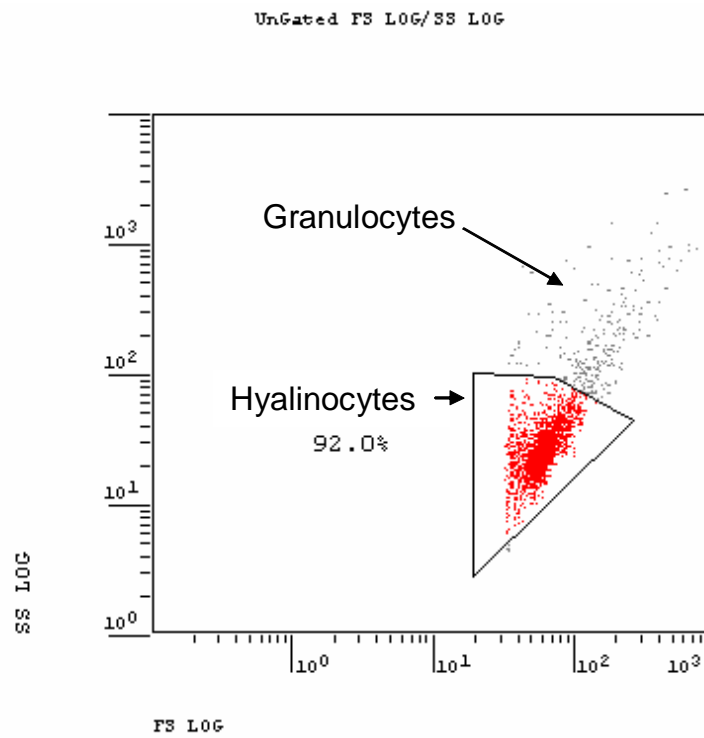


Figure 37 : cytogramme représentant la complexité (SS, axe des ordonnées) en fonction de la taille (FS, axe des abscisses) des cellules. L'échelle est logarithmique.

II Mise au point et standardisation de protocoles de mesure de paramètres hématocytaires

II.1. Mise au point de protocoles de mesure de paramètres hématocytaires en cytométrie de flux

Cette partie concerne le développement de protocoles de mesure de taille/complexité, de mortalité cellulaire, de phagocytose et d'activités enzymatiques en cytométrie de flux.

II.1.1. Matériel et Méthodes

L'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique (**Annexes 2.1, 2.2**). Pour chacun des paramètres, les analyses ont été réalisées sur trois pools de dix animaux. Pour chaque pool, différentes concentrations de marqueur et différents temps d'incubation ont été testés. Pour chaque paramètre cellulaire étudié en cytométrie en flux, le nombre d'événements analysés a été fixé à 3 000. 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. La taille/complexité, la mortalité cellulaire, la phagocytose, les activités de type estérase, la production d'EOR ainsi que la présence de lysosomes ont été évalués. Lorsque des réplicats étaient réalisés, des analyses statistiques ont été effectuées.

II.1.1.1. Taille/complexité

Sur le cytogramme obtenu pour la mesure de la mortalité cellulaire, il est possible de séparer deux populations en fonction de leur taille et de leur complexité. Ceci permet d'une part, d'éliminer les débris et d'autre part, de séparer les hyalinocytes des granulocytes (**Figure 37**).

II.1.1.2. Mortalité cellulaire

Un volume de 10 μL d'iodure de propidium (IP) (**Annexe 5**) a été ajouté à 200 μL d'hémolymphe. Une incubation de 30 minutes dans la glace à l'obscurité 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, correspondant à des cellules mortes. Ce protocole a été mis au point précédemment (Gagnaire, 2001, 2002).

II.1.1.3. Capacité de phagocytose

Un volume de 10 μL de billes de 1 μm de diamètre dilué dans de l'eau bidistillée au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution-mère (**Annexe 5**) a été rajouté à 200 μL d'hémolymphe. L'incubation a été d'une heure à l'obscurité à température ambiante. Une seule concentration hémocytaire a été testée ($10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$) et le ratio final de billes/hémocytes est de 700/1. Lorsque les billes sont phagocytées, les cellules émettent une fluorescence correspondant à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) porté par les billes (signal vert : FL1). Si les billes ne sont pas ingérées, les cellules ne deviennent pas fluorescentes. Ce protocole a été mis au point précédemment (Gagnaire, 2001, 2002).

Afin de s'assurer que les billes ne sont pas simplement collées sur la membrane des cellules, une comparaison entre le pourcentage d'activité de phagocytose déterminé par cytométrie en flux et par microscopie à épifluorescence (qui permet de visualiser les billes) a été réalisée. Les analyses ont été effectuées à 4°C et 16°C afin d'observer le comportement des hémocytes à faible température. Deux réplicats ont été réalisés pour chaque température.

II.1.1.4. Activité de type estérase

L'étude de l'activité de type estérase est réalisée avec un substrat liposoluble non spécifique : le diacétate de fluorescéine (FDA, **Annexe 5**). Le FDA non fluorescent diffuse dans la plupart des cellules du fait de son caractère liposoluble, puis est hydrolysé par des estérases non spécifiques en produits fluorescents retenus par les cellules dont les membranes sont intactes (signal vert : FL1) (Minier). Les substrats non hydrolysés et leurs produits sont rapidement évacués des cellules mortes ou des cellules dont la membrane est endommagée.

Un μL d'une solution de FDA à 400 μM , 200 μM ou 40 μM dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) (**Annexe 5**) a été ajouté à 200 μL d'hémolymphe (soit $C_f = 2 \mu\text{M}$, 1 μM ou 0.2 μM). Différentes concentrations cellulaires ont également été testées (0.5, 1, 2 et $5.10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$). L'incubation a été de 15, 30 ou 60 minutes à l'obscurité à température ambiante, puis la réaction a été arrêtée par un traitement de cinq minutes sur glace à l'obscurité.

II.1.1.5. Production d'EOR

L'étude des activités post-phagocytaires a été réalisée par l'intermédiaire de la mesure des EOR. La dihydrorhodamine 123 (**Annexe 5**) a été utilisée. La DHR123 est le produit réduit non chargé, non fluorescent et non toxique, dérivé de la rhodamine 123. La DHR 123 diffuse au travers des membranes cellulaires et est oxydée à l'intérieur de la cellule en rhodamine 123 fluorescente par l'anion superoxyde au cours de la flambée oxydative ; cette oxydation est spécifique de l'anion O_2^- (signal vert : FL1).

Différentes concentrations ont été testées : 29 mM et 20 mM dans du DMSO (**Annexe 5**)

($C_f = 145 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$). Une seule concentration cellulaire a été testée (10^6 cellules.mL⁻¹). Des essais ont été réalisés en présence de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (**Annexe 5**) aux concentrations finales de 0.5, 2, 9 et $80 \mu\text{M}$, de lipopolysaccharides (LPS) (**Annexe 5**) aux concentrations finales de 0.1, 1 et 10 mg.L^{-1} et sans modulateur à différents temps d'incubation (30 minutes, 1 h, 2 h et 4 h). Le PMA et les LPS sont des stimulateurs de la libération des EOR. Le protocole a consisté en l'ajout d' $1 \mu\text{L}$ d'une solution de DHR123 dans $200 \mu\text{L}$ d'hémolymphe. L'incubation a été réalisée à l'obscurité à température ambiante à différents temps, puis la réaction a été arrêtée par un traitement de cinq minutes sur glace à l'obscurité.

II.1.1.6. Présence de lysosomes

La présence de lysosomes peut être suivie en cytométrie de flux par l'utilisation d'un kit du commerce (Lysotracker®, **Annexe 5**). Le principe de cette sonde est basé sur la nature des lysosomes. Les lysosomes sont riches en glycosidases, acides phosphatases, élastases, carboxypeptidases, cathepsines et autres protéases. La sonde Lysotracker® est une sonde fluorescente acidotrophique qui marque les membranes des organelles acides des cellules vivantes. Cette sonde est très sélective des organelles acides. Elle contient un fluorophore lié à une base faible qui est partiellement protonée à pH neutre (signal vert : FL1). Elle peut traverser les membranes cellulaires et se concentre donc dans les organelles sphériques acides.

Pour mettre au point le protocole de marquage, différentes concentrations de Lysotracker® ont été testées : $15 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ et 1 mM dans du DMSO (**Annexe 5**) ($C_f = 75 \text{ nM}$, $1 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$). Différentes concentrations cellulaires ont également été testées (0.5 , 1 , 2 et 5.10^6 cellules.mL⁻¹) ainsi que plusieurs temps d'incubation (30 minutes, 1 heure et 2 heures). Le protocole a consisté à ajouter $1 \mu\text{L}$ d'une solution de Lysotracker dans $200 \mu\text{L}$ d'hémolymphe. L'incubation a été réalisée à l'obscurité à température ambiante, puis la réaction a été arrêtée par un traitement de cinq minutes sur glace à l'obscurité.

II.1.2. Résultats

II.1.2.1. Mortalité cellulaire

La lecture du pourcentage de cellules fluorescentes indique le pourcentage de cellules mortes dans l'échantillon (**Figure 38**).

II.1.2.2. Activité de phagocytose

Sur les cytogrammes obtenus pour la phagocytose, il est possible de séparer les pics de fluorescence correspondant à 1 ou 2 billes (généralement billes collées à la surface des cellules, donc non caractéristiques de la phagocytose) des pics correspondant à plusieurs billes (**Figure 39**).

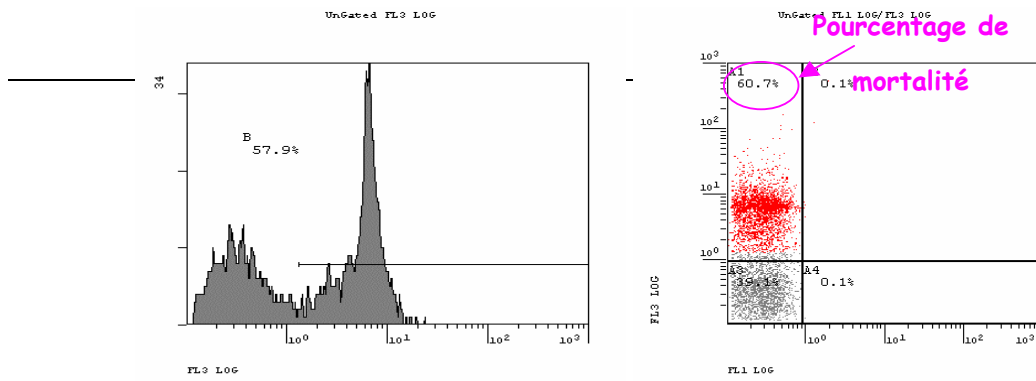


Figure 38 : cytogramme représentant la mortalité hémytaire selon le protocole choisi.

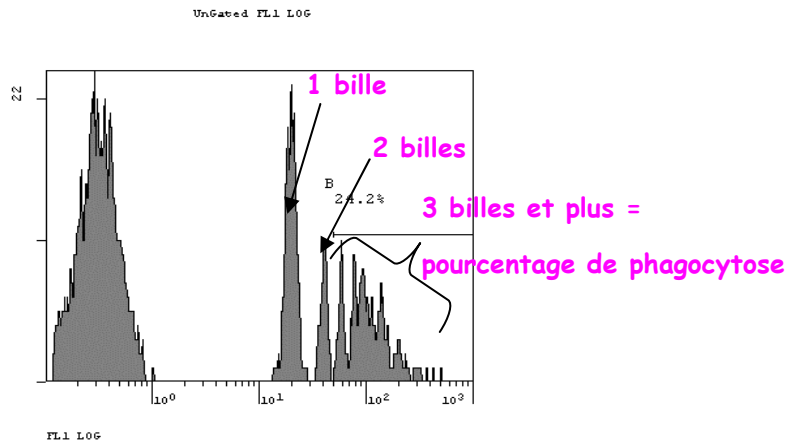


Figure 39 : cytogramme représentant l'activité de phagocytose selon le protocole utilisé au LGP.

	16°C	4°C
cytométrie	34.05	24.85
microscopie	35	27.33

Tableau 9 : comparaison de l'évaluation de l'activité de phagocytose par cytométrie en flux et par microscopie à épifluorescence ; N = 2 réplicats.

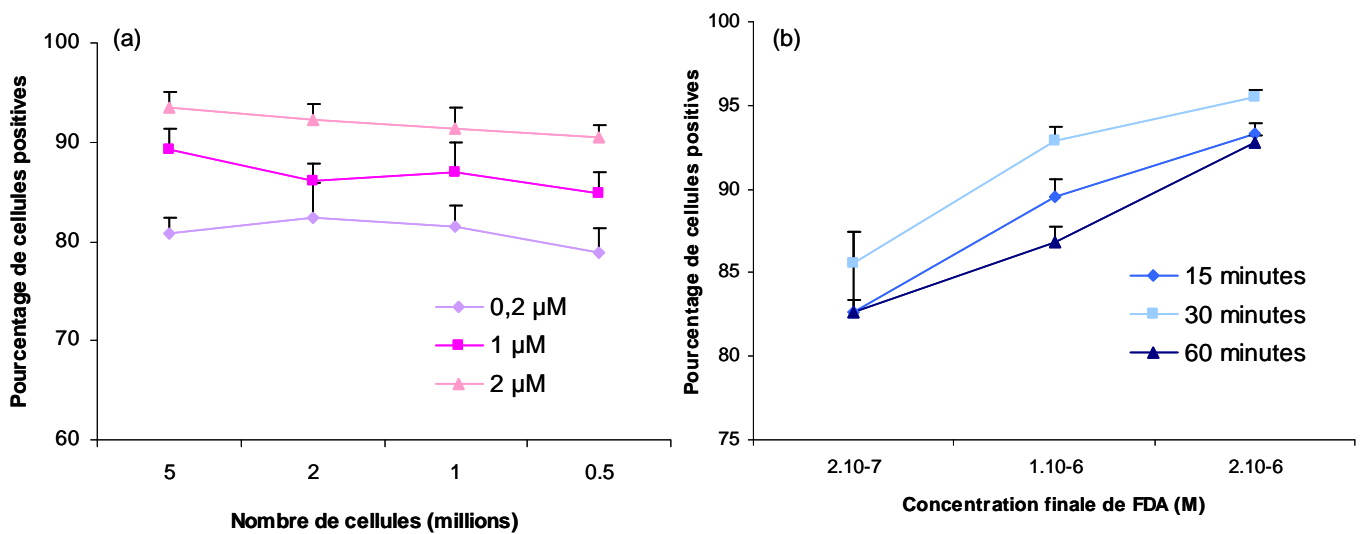


Figure 40 : évolution du pourcentage de cellules positives pour les estérases avec différentes concentrations de FDA et différentes concentrations de cellules (a) et différents temps d'incubation (b). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée.

L'information de taille permet de savoir que les billes sont phagocytées à l'intérieur d'un hémocyte et non simplement agglutinées entre elles. Le pourcentage de phagocytose est déterminé par le pourcentage de cellules ayant ingéré 3 billes et plus (présentant une fluorescence égale ou supérieure à la fluorescence de 3 billes).

Aucune différence significative n'est rapportée entre les pourcentages de phagocytose évalués par cytométrie et par microscopie aussi bien à 16°C (34.05 % et 35 % respectivement) qu'à 4°C (24.85 % et 27.33 % respectivement) (**Tableau 9**). La phagocytose est inférieure à 4°C en comparaison à 16°C ($p < 0.05$).

II.1.2.3. Activité de type estérase

La concentration cellulaire n'influence pas le pourcentage de cellules marquées par la FDA ($p > 0.05$) (**Figure 40a**). Le temps d'incubation a un effet : à 15 et à 60 minutes, les pourcentages de cellules marquées sont inférieurs à celui obtenu à 30 minutes ($p < 0.05$) (**Figure 40b**). La concentration de sonde et le temps d'incubation pour lesquelles le maximum de cellules sont marquées sont 400 μM (soit $C_f = 2 \mu\text{M}$) et 30 minutes ($p < 0.05$) (**Figure 40b**). Un essai de mise en contact des cellules avec le substrat et du PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride, inhibiteur spécifique de l'acétylcholinestérase) n'a induit aucune modification de marquage (données non montrées). Sur un cytogramme classiquement obtenu en utilisant le FDA, il est possible de distinguer trois populations de cellules présentant une intensité de fluorescence différente (**Figure 41**). Ces trois populations cellulaires sont systématiquement retrouvées lors des analyses. Les cellules les plus fluorescentes ne correspondent pas à un type cellulaire donné (granulocytes ou hyalinocytes), mais sont réparties parmi les deux sous-populations hémocytaires.

II.1.2.4. Production d'EOR

Le pourcentage de cellules marquées est plus important avec la concentration de 29 mM (soit $C_f = 145 \mu\text{M}$) (**Figure 42b**) en comparaison à 20 mM (soit $C_f = 100 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$) (**Figure 42a**). L'ajout de stimulants tels que le PMA (**Figure 42a**) et les LPS (**Figure 42b**) ne modifie pas la production d'EOR ($p > 0.05$). Le pourcentage de cellules positives augmente avec le temps d'incubation ($p < 0.05$) (**Figure 42**).

Il est possible de distinguer trois populations de cellules présentant une intensité de fluorescence différente (**Figure 43**). Cependant, les trois populations ne sont pas clairement distinctes sur tous les cytogrammes. Les cellules les plus fluorescentes correspondent aux cellules de plus grande taille et les plus complexes, interprétées comme étant des granulocytes.

II.1.2.5. Présence de lysosomes

Le pourcentage de cellules marquées augmente avec le temps et est maximal à 2 h ($p < 0.05$)

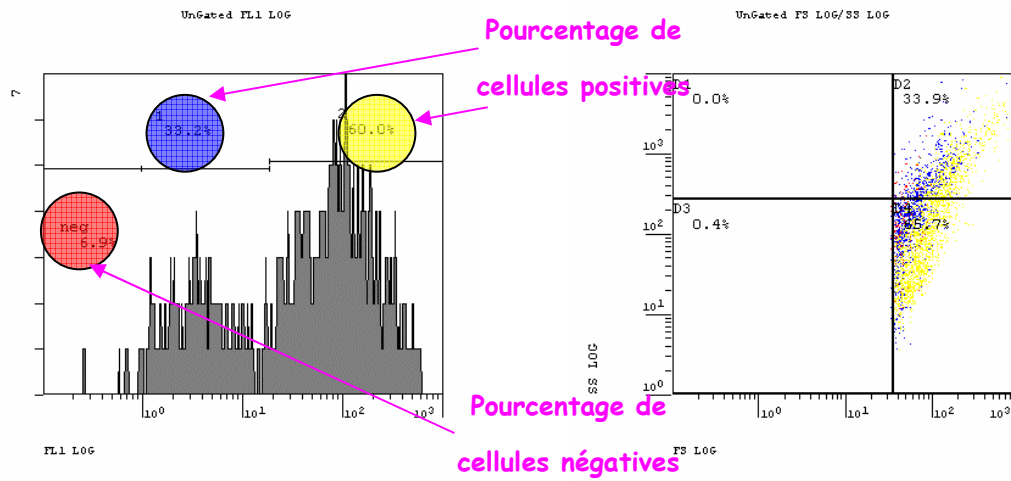


Figure 41 : cytogramme représentant l'activité de type estérase.

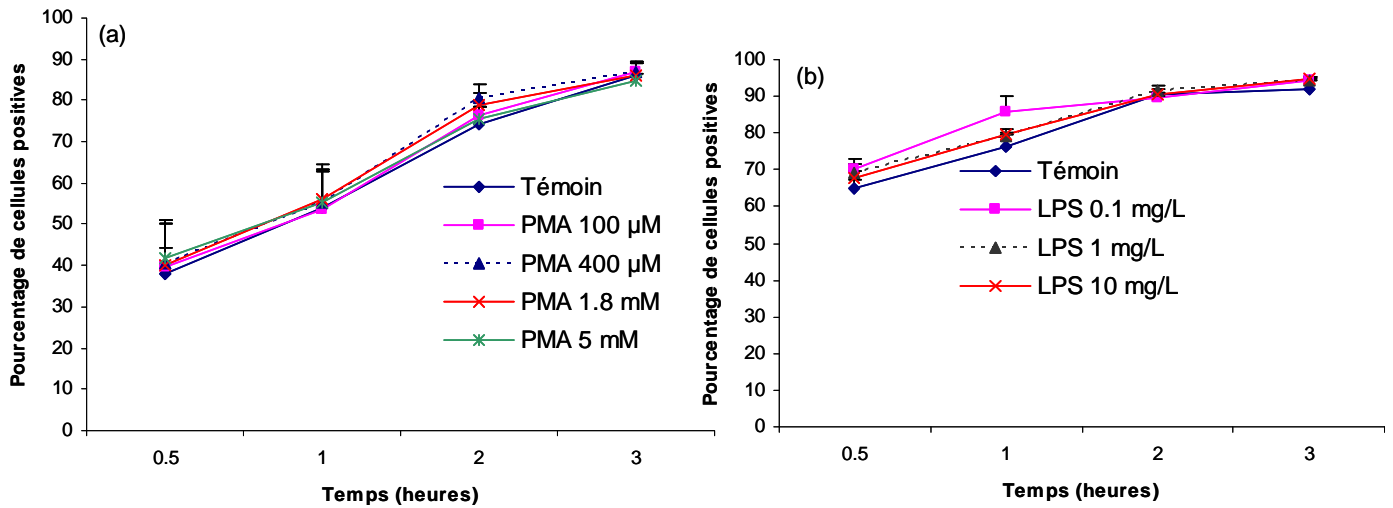


Figure 42 : évolution du pourcentage de cellules positives pour les EOR avec différentes concentrations de DHR 123 ($C_f = 100 \mu\text{M}$ (a) et $145 \mu\text{M}$ (b)), différents temps d'incubation et différentes concentrations d'activateurs (PMA (a) et LPS (b)). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée.

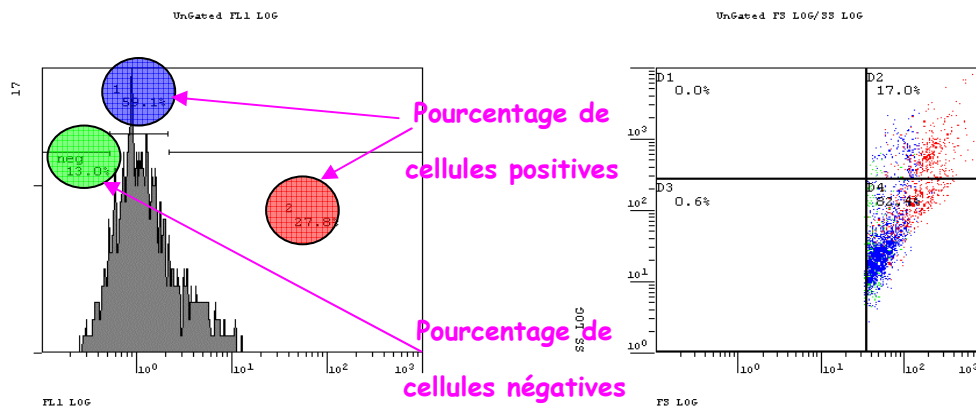


Figure 43 : cytogramme représentant la production d'EOR.

(**Figure 44a**). La concentration cellulaire n'influence pas le pourcentage de cellules positives ($p > 0.05$) (**Figure 44a**). Le pourcentage de cellules positives est maximal avec la concentration 1 mM (soit $C_f = 5 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$) (**Figure 44b**).

Sur un cytogramme obtenu en utilisant le LysoTracker®, il est possible de distinguer trois populations de cellules présentant une intensité de fluorescence différente (**Figure 45**). Ces trois populations cellulaires sont systématiquement retrouvées lors des analyses. Les cellules les plus fluorescentes correspondent aux cellules de plus grande taille et les plus complexes, interprétées comme étant des granulocytes.

II.1.3. Discussion

La cytométrie de flux a déjà été utilisée pour analyser les hémocytes de différentes espèces de bivalves (Ashton-Alcox & Ford, 1998; Allam *et al.*, 2002). Le suivi de la mortalité cellulaire permet d'évaluer l'état des cellules. Ce paramètre est souvent mesuré lors d'études d'immunotoxicité (Brousseau *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002). La phagocytose est l'une des activités les plus suivies chez un grand nombre d'espèces de bivalves en cytométrie de flux (Bouchard *et al.*, 1999; Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001, 2002; Xue *et al.*, 2001; Auffret *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002; Goedken & De Guise, 2004) ou par d'autres méthodes telles que l'observation au microscope photonique après ajout de substances fluorescentes (billes (Alvarez *et al.*, 1989), zymosan (Cajaraville *et al.*, 1996; Wootton *et al.*, 2003b), levures (Beckmann *et al.*, 1992; Cima *et al.*, 1998; Baier-Anderson & Anderson, 2000), l'observation au microscope électronique après ajout de billes fluorescentes (Alvarez *et al.*, 1989), ou par mesure de densité optique après ajout de billes de latex (Cheng & Sullivan, 1984) ou de bactéries tuées par la chaleur (Wootton *et al.*, 2003b). Elle représente l'une des principales activités du système de défense chez les invertébrés.

Dans ce travail, les deux méthodes utilisées pour évaluer la phagocytose (cytométrie et microscopie à épifluorescence) ont présenté des résultats comparables aux deux températures testées. Ce résultat valide l'utilisation de la cytométrie en flux comme outil d'évaluation de la capacité de phagocytose des hémocytes. La phagocytose est plus faible à 4°C qu'à 16°C, mais l'activité existe et est mesurable même à faible température. La phagocytose est fortement conservée à travers l'évolution et est présente chez toutes les espèces vivantes (Fournier *et al.*, 2000).

La mesure de la production d'EOR et d'estérases permet de suivre les événements post-phagocytaires : la phagocytose comporte plusieurs phases et notamment, après l'internalisation du corps étranger, la libération de réactifs hautement toxiques de l'oxygène. Les réactions se produisent dans un phagolysosome, résultat de la fusion entre le phagosome et les lysosomes (Cheng *et al.*, 1975; Cheng, 1983) (cf rappels bibliographiques IV.1.6, **annexes 1b** et **1c**). Deux techniques sont principalement utilisées pour détecter la production d'EOR dans les hémocytes de

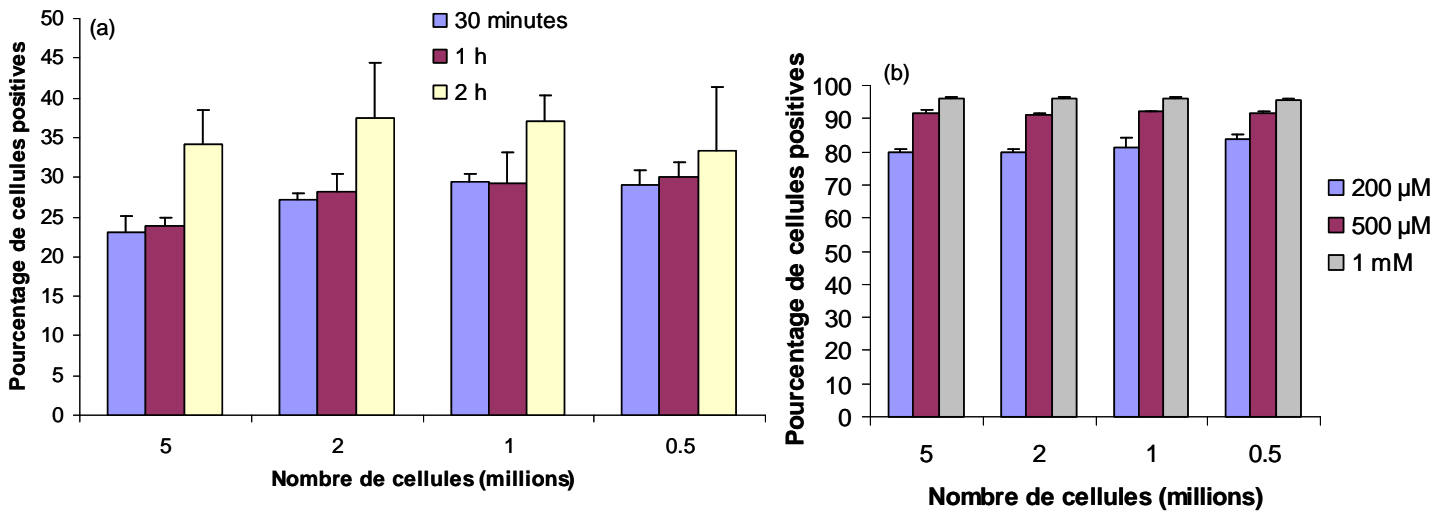


Figure 44 : évolution du pourcentage de cellules positives pour les lysosomes avec différentes concentrations de LysoTracker®. (a) évolution en fonction du temps avec $C_f = 75$ nM et différentes concentrations cellulaires. (b) évolution après 2 h de contact avec 200 μ M, 500 μ M ou 1 mM de sonde et différentes concentrations cellulaires. N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée.

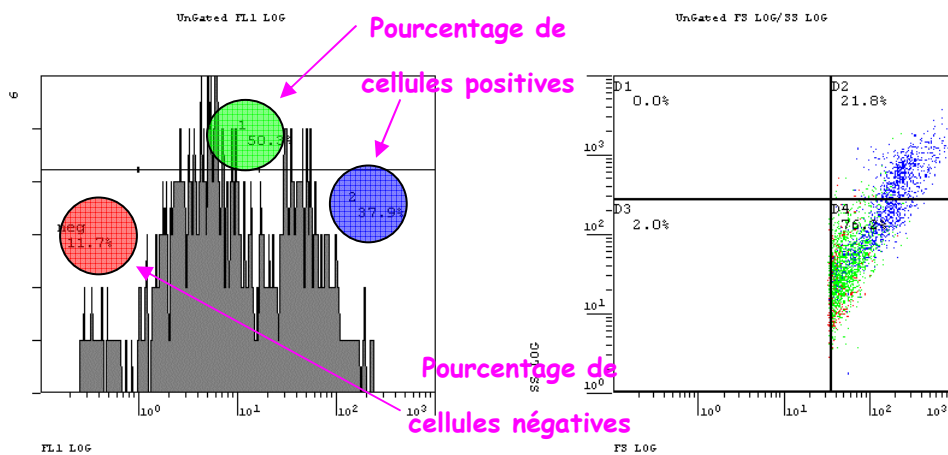


Figure 45 : cytogramme représentant la présence de lysosomes.

bivalves : la chimioluminescence, mesurée par l'émission de photons (Larson *et al.*, 1989; Lambert & Nicolas, 1998; Torreilles *et al.*, 1999) et la réduction du bleu de tétrazolium en formosan (Pipe, 1992; Anderson *et al.*, 1992a; Pipe *et al.*, 1995a; Glupov *et al.*, 2001). La DHR123 est également largement utilisée, chez les vertébrés et les invertébrés (Rothe *et al.*, 1988; Vowells *et al.*, 1995; Winston *et al.*, 1996; Chilmonczyk *et al.*, 1997; Boutet *et al.*, 2002). Dans ce présent travail, ni le PMA, ni les LPS n'ont permis de stimuler la production d'EOR, ils n'ont donc pas été utilisés dans le protocole retenu. Bien que le pourcentage de cellules positives augmentait avec le temps d'incubation et ce jusqu'à 3 h, une incubation de 30 minutes a été choisie. En effet, l'hémolymphe n'étant pas stérile, les bactéries présentes dans le système circulatoire peuvent stimuler la production d'EOR. Plus le temps d'incubation de la sonde est long, plus la stimulation par les bactéries endogènes peut être importante et dans le cadre d'expériences visant à étudier l'effet de polluants sur les paramètres hématocytaires, il apparaît important d'éviter un effet dû aux bactéries. Le temps d'incubation doit donc être limité. Cependant, la mesure des EOR ne permet pas de distinguer correctement les populations cellulaires selon leur intensité de fluorescence pour tous les cytogrammes. D'autres études utilisent le 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA) comme substrat pour la détection des EOR (Bass *et al.*, 1983; Goedken & De Guise, 2004).

Les estérases sont des enzymes appartenant au groupe des hydrolases catalysant l'hydrolyse des liaisons esters. Elles ont été mesurées chez les mollusques par microscopie électronique à transmission (Beckmann *et al.*, 1992; Carballal *et al.*, 1997a). Des protocoles de cytométrie de flux utilisant les mêmes substrats que ceux utilisés dans ce travail ont été rapportés dans la littérature. Cependant, peu d'études rapportent l'utilisation du FDA (diacétate de fluorescéine) en cytométrie de flux chez les vertébrés (Dive *et al.*, 1990) et cette technique n'est pas utilisée pour les invertébrés. Les résultats ont permis de choisir une concentration de sonde de 400 μM (soit $C_f = 2 \mu\text{M}$) et un temps d'incubation de 30 minutes pour les expériences. Comme la concentration cellulaire n'a pas influé sur le pourcentage de cellules marquées, une concentration de $10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$ a été choisie. Le FDA sert à la fois de marqueur de viabilité en mesurant une activité enzymatique nécessaire pour activer la fluorescence, et de marqueur d'intégrité membranaire qui est nécessaire pour la rétention intracellulaire du composé fluorescent. Les marqueurs d'activités estérases non spécifiques complètent ainsi les données obtenues avec l'iodure de propidium en donnant une information sur la fonctionnalité des cellules et l'intégrité des membranes. Cependant, l'activité mesurée n'est pas spécifique.

Les protocoles de suivi de ces deux activités (estérases et production d'EOR) ont été développés à la suite de l'arrêt de la commercialisation des kits précédemment utilisés (Gagnaire, 2001, 2002 ; Gagnaire *et al.*, 2003, 2004).

Les lysosomes sont des organelles subcellulaires limitées par une membrane lipoprotéique semi-perméable contenant une batterie d'environ 60 enzymes hydrolytiques. Les lysosomes ont un environnement acide, maintenu par une pompe ionique membranaire Mg^{2+} -ATPase- H^+ dépendante (Lowe *et al.*, 1995). Ils sont capables de dégrader toutes les classes de macromolécules d'origine intra et extracellulaire. Ils sont ubiquistes dans les cellules animales, à l'exception des cellules sanguines mammaliennes, et leurs rôles incluent la séquestration de composés étrangers, certains aspects de la réponse immunitaire, la digestion intracellulaire et des implications dans la reproduction, le développement embryonnaire et l'apoptose (Lowe & Fossato, 2000). En plus de la séquestration de pathogènes, les lysosomes accumulent également différents contaminants organiques et inorganiques, servant ainsi de système de détoxification jusqu'à ce que leur capacité de stockage soit dépassée ou qu'ils soient endommagés par les contaminants accumulés (Lowe & Fossato, 2000; Moore, 2002). Lorsque la déstabilisation a lieu, les lysosomes éclatent, relâchant leurs hydrolases dans le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Une diminution de la stabilité lysosomale est fortement associée à l'exposition à des polluants (Ringwood *et al.*, 1998; Lowe & Fossato, 2000), des changements de condition et de saison (Hauton *et al.*, 1998) et une inoculation bactérienne (Hauton *et al.*, 2001). Dans cette étude, peu de différences sont apparues entre les différentes concentrations cellulaires testées. La concentration de 10^6 cellules.mL⁻¹ a été choisie pour rester homogène avec les autres protocoles et afin de pouvoir comparer les données. La concentration de 500 μ M (soit $C_f = 2.5 \mu$ M) a été choisie car les populations cellulaires sont plus distinctes avec cette concentration. Le suivi de l'activité des lysosomes en cytométrie de flux n'a pas été précédemment décrit chez les bivalves. Cependant, d'autres techniques existent pour mesurer cet indicateur de la fonctionnalité des cellules. La technique couramment utilisée pour mesurer la stabilité lysosomale est l'étude de la rétention du rouge neutre et elle a été appliquée à des études d'immunotoxicité chez les bivalves (Moore *et al.*, 1978; Lowe *et al.*, 1995; Grundy *et al.*, 1996b; Lowe & Fossato, 2000). L'information donnée par le marquage avec la sonde LysoTracker® est complexe. La sonde ne peut marquer les lysosomes que si leur membrane est intègre. Elle apporte donc une information à la fois sur le nombre de lysosomes présents dans la cellule (plus le nombre est important, plus l'intensité de fluorescence augmente) et sur l'intégrité de la membrane.

La cytométrie de flux permet d'obtenir des résultats rapidement, ce qui rend le suivi de plusieurs activités envisageable. D'autres protocoles pourraient être développés afin de suivre d'autres types d'activités cellulaires (acide phosphatases, cathepsines).

D'autres protocoles pour suivre notamment la quantité de calcium intra-hémocytaire en cytométrie de flux et son implication dans le mécanisme de phagocytose ont été mis au point au laboratoire (Aton *et al.*, 2006).

II.2. Comparaison inter-laboratoires

La cytométrie en flux est aujourd'hui de plus en plus utilisée pour analyser les effets de polluants sur les capacités hémocytaires des bivalves. Cependant, les techniques décrites sont parfois différentes pour mesurer des paramètres identiques. Il apparaît important de tenter de standardiser ces méthodes afin de démontrer sans ambiguïté l'intérêt d'utiliser une telle technique pour explorer l'immunotoxicité chez les bivalves. Dans ce cadre, des essais de comparaison des protocoles et techniques ont été réalisés entre le LGP (IFREMER La Tremblade) et le LEMAR (UBO, Brest) ; ces deux laboratoires travaillent sur un modèle animal commun, l'huître creuse, *C. gigas*. Le but était de comparer deux techniques de ponction utilisées pour récolter les hémocytes, à savoir la ponction dans la cavité péricardique (pratiquée au LGP) et dans le muscle adducteur (pratiquée au LEMAR). De plus, les activités suivies ont également été évaluées sur deux types de cytomètre de flux (Beckman Coulter au LGP, Becton Dickinson au LEMAR) et en utilisant pour chaque activité les protocoles mis au point par chacun des laboratoires. Les éventuelles différences liées à l'origine des hémocytes et à l'appareil utilisé ont alors pu être mises en évidence.

II.2.1. Matériel et Méthodes

II.2.1.1. Prélèvement d'hémolymphe

L'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique et dans le muscle adducteur (**Annexes 2.1, 2.2**). Trois pools de dix individus ont été réalisés pour chaque type de prélèvement. Une expérience a été réalisée au LEMAR, puis une au LGP, sur le même lot d'huîtres à un mois d'intervalle.

II.2.1.2. Cytomètres en flux

Les analyses ont été réalisées avec un cytomètre EPICS XL4 (Beckman Coulter) au LGP (IFREMER La Tremblade) et avec un FACSCALIBUR (Becton Dickinson) au LEMAR (UBO, Brest) (**Annexe 2.4.1**).

II.2.1.3. Traitement des échantillons

Après la ponction, les hémolymphe ont été filtrées à 60 μm (protocole du LGP) ou à 80 μm (protocole du LEMAR). Avant l'analyse, les hémolymphe ont été placées sur glace sans ajout (protocole du LGP) ou après ajout (protocole du LEMAR) d'une solution anti-agrégante (**Annexe 3.3**).

	Paramètre suivi	Technique/marqueur	LGP	LEMAR
Morphologie et fonctionnalité	Numération (THC, DHC)	Cellule de Malassez Calcul de débit	X	X
	Taille/complexité	Aucun marquage SYBRGreen	X	X
	Cycle cellulaire	Tampon de lyse + IP	X	
	Mortalité cellulaire	IP	X	X
Viabilité cellulaire	Traceur de mitochondries	DIOC6	X	
	Traceur de lysosomes	Lysotracker	X	
	Activité estérase	FDA	X	
Immunocompétence	Phagocytose	Ingestion de billes 1 μ M Ingestion de billes 2 μ M	X	X
	Production de ROS	DHR123	X	X

Tableau 10 : récapitulatif des différents paramètres hémyocytaires mesurés au LGP et au LEMAR et des différentes méthodes de mesure.

Cytomètres Protocoles Organes		Cytomètre Beckman (Expériences réalisées au LGP)				Cytomètre Becton (Expériences réalisées au LEMAR)			
		Protocoles LGP		Protocoles LEMAR		Protocoles LGP		Protocoles LEMAR	
		Cœur	Muscle	Cœur	Muscle	Cœur	Muscle	Cœur	Muscle
Activités	Mortalité cellulaire	F	F	F	F	F	F	F	F
	Phagocytose	F	F	F	F	F	F	F	F
	Production de ROS	F	F	F	F	F	F	F	F
	Estérases	F	F	NE	NE	F	F	NE	NE
	Lysosomes	F	F	NE	NE	F	F	NE	NE
	Mitochondries	F	F	NE	NE	F	F	NE	NE

Tableau 11 : récapitulatif des activités hémyocytaires mesurées dans le cadre de la comparaison des cytomètres, des protocoles et des organes de prélèvement. F : mesure faite ; NE : protocole inexistant pour ces activités au LEMAR.

Les différents paramètres hématologiques suivis dans les deux laboratoires peuvent être regroupés en différentes catégories (**Tableau 10**).

Certains paramètres ont été sélectionnés afin de comparer les résultats obtenus avec les deux types de ponction (cœur et muscle) et les différents protocoles des deux laboratoires (**Tableau 11**). Les protocoles utilisés au LGP ont été décrits précédemment (cf rappels bibliographiques II.1.1, **Annexe 2.4.2**). Le détail des protocoles utilisés au LEMAR est présenté ci-dessous :

- Mortalité : deux cents μL d'hémolymphe ont été incubés avec 300 μL d'eau de mer et 10 μL IP à 1 g.L^{-1} . L'incubation a été de 10 minutes sur glace à l'obscurité.
- Phagocytose : elle a été étudiée en microplaque 96 puits. Cent μL d'hémolymphe pour chaque pool ont été distribués dans deux puits (duplicats). Les cellules ont été comptées et le volume de billes de 2 μm de diamètre rajoutées a été calculé de manière à obtenir $30 \text{ billes.cellule}^{-1}$. Les puits ont été complétés jusqu'à 200 μL avec un milieu d'incubation pour les hémocytes (MIH) (**Annexe 3.4**). La plaque a ensuite été centrifugée (300 g, 15 min, 4°C) et incubée pendant 4 heures à 15°C . Après incubation, 50 μL de SAAH-trypsine (solution anti-agrégante hématologique) (**Annexe 3.5**) ont été ajoutés. La plaque a été agitée sur un agitateur magnétique pendant dix minutes, et les solutions ont été placées dans un tube adapté au cytomètre pour les mesures.
- Production d'EOR : vingt μL de DHR 123 à 500 μM ont été ajoutés à 200 μL d'hémolymphe et à 800 μL de MIH. L'incubation a été de 15 minutes à 15°C . Les tubes ont ensuite été répartis en deux groupes : 500 μL ont été conservés en l'état et 500 μL ont été additionnés de 20 μL de PMA à 2.5 μM . L'incubation a été de 90 minutes à 15°C .

Dans le cadre des expériences réalisées au LGP, les cytogrammes ont été analysés directement sur le cytomètre Beckman Coulter. Dans le cadre des expériences réalisées au LEMAR, les cytogrammes ont été analysés avec le logiciel Winorphy. Les résultats ont été analysés statistiquement (**Annexe 2.3**).

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. Qualité et quantité d'hémolymphe

Les résultats montrent que la concentration en hémocytes circulants est moins variable dans l'hémolymphe provenant du muscle adducteur, mais plus importante dans l'hémolymphe provenant du cœur ($p < 0.05$) (**Figure 46a**). La ponction musculaire permet d'obtenir un volume d'hémolymphe trois fois plus important que la ponction péricardique ($p < 0.05$) (**Figure 46b**). Enfin, le nombre total de cellules récupérées est plus important pour la ponction musculaire ($p < 0.05$) (**Figure 46c**). Une observation au microscope des hémolymphe provenant des deux organes montre que l'hémolymphe ponctionnée dans le muscle est moins contaminée par les gamètes et les bactéries (données non montrées).

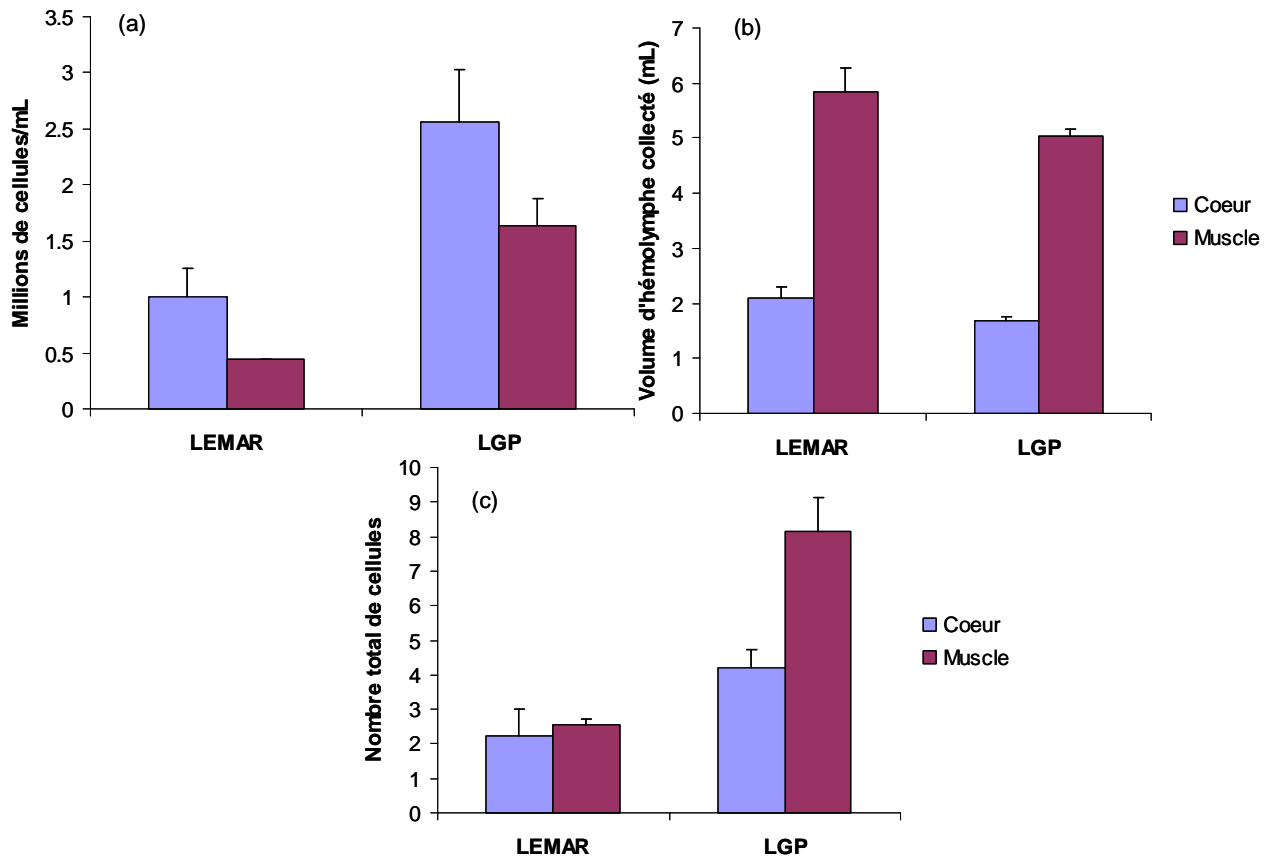


Figure 46 : paramètres de l'hémolymphe obtenus : concentrations en hémocytes circulants (a), quantité d'hémolymphe (b) et nombres de cellules circulantes (c). N= 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée.

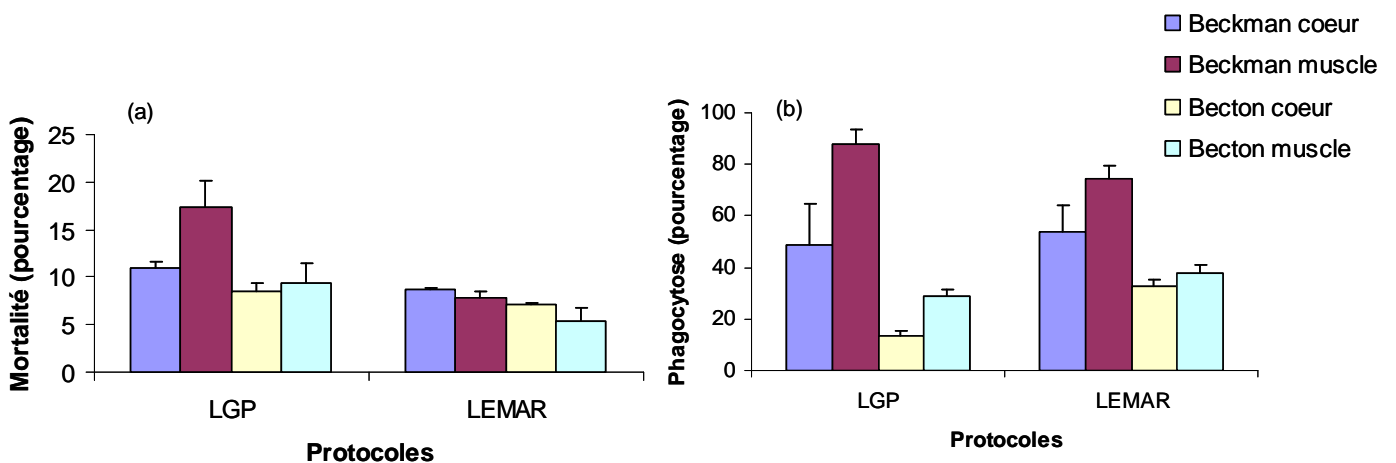


Figure 47 : activités hémocytaires mesurées avec les protocoles LGP et LEMAR sur les deux cytomètres et les deux types de prélèvement : mortalité hémocytaire (a) et phagocytose (b). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée.

Le volume d'hémolymphe obtenu est identique pour les deux expériences réalisées à un mois d'intervalle. Cependant, la concentration cellulaire et donc le nombre de cellules circulantes sont plus importants lors de l'expérience réalisée au LGP un mois après l'expérience réalisée au LEMAR ($p < 0.05$) (**Figure 46a, b et c**).

II.2.2.2. Mortalité hémocytaire

Les valeurs de la mortalité hémocytaire ne dépassent pas 17 % (**Figure 47a**). Les valeurs obtenues sont significativement plus importantes avec le protocole LGP ($p < 0.05$) et avec le cytomètre Beckman ($p < 0.05$). Les valeurs de la mortalité ne sont pas significativement différentes entre les prélèvements provenant du cœur et du muscle.

II.2.2.3. Activité de phagocytose

Les résultats (**Figure 47b**) montrent une différence entre les deux cytomètres. Les valeurs sont plus importantes avec le cytomètre Beckman, quelque soit le protocole utilisé (LGP ou LEMAR) ($p < 0.05$), mais la variabilité est plus grande qu'avec le Becton. La phagocytose est également plus importante pour les hémocytes provenant du muscle quels que soient l'appareil et le protocole utilisés ($p < 0.05$). Aucune différence entre les protocoles n'est mise en évidence.

II.2.2.4. Production d'EOR

Avec le protocole utilisé au LGP, le pourcentage de cellules présentant une production d'EOR est trois fois plus important que pour le protocole utilisé au LEMAR ($p < 0.001$) (données non montrées). Avec le protocole utilisé au LEMAR, l'ajout de PMA ne fait pas varier le pourcentage de cellules présentant une activité EOR.

II.2.2.5. Activité de type estérases et présence de lysosomes

Ces activités sont suivies dans les cellules provenant de la cavité péricardique et du sinus musculaire en utilisant les deux cytomètres. Aucune différence significative entre les organes de prélèvement ou les appareils n'est mise en évidence (résultats non montrés).

II.2.3. Discussion

Le but de ces expériences était de comparer les différentes techniques utilisées dans deux laboratoires pour évaluer les paramètres hémocytaires de *C. gigas*. La ponction d'hémolymphe dans le muscle fournit plus de cellules et un plus grand volume que celle réalisée dans le cœur, tout en étant moins contaminée. De plus, le nombre de cellules circulantes est relativement constant d'une expérience à l'autre pour des ponctions réalisées dans le muscle adducteur. La ponction dans la cavité péricardique présente cependant un avantage : elle est plus rapide à effectuer que la ponction dans le muscle adducteur. Cependant, du fait de la présence de contamination (gamètes et bactéries)

dans les ponctions péricardiques, qui peut amener à des résultats d'activités cellulaires biaisés, la ponction musculaire apparaît plus adaptée pour les expériences *in vitro*. La ponction péricardique reste à privilégier dans le cas d'expériences impliquant un grand nombre d'animaux afin de réduire le temps de ponction (cf quatrième partie). De plus, le cœur des bivalves et plus particulièrement les oreillettes ont été décrits comme étant un site majeur de bioaccumulation et de détoxification des xénobiotiques (métaux lourds, HAPs, PCBs, etc.) et d'ultrafiltration (Zaroogian & Yevich, 1994; Giamberini *et al.*, 1995). Dans le cadre d'expériences de contamination d'animaux (*in vivo* ou *in situ*), il semble plus adapté d'utiliser les hémocytes provenant de la cavité péricardique, en contact direct avec le cœur. L'origine des hémocytes semble avoir une importance dans l'étude de l'immunomodulation. Une étude rapporte les différents effets d'un pesticide sur des cellules de sang et du rein chez la souris (Prater *et al.*, 2002).

Les études sur l'effet de polluants sur les hémocytes de bivalves marins sont faites à partir de cellules provenant indifféremment du cœur (Cheng & Sullivan, 1984; Cheng & Downs, 1988; Sauvé *et al.*, 2002) ou du muscle (Carballal *et al.*, 1998; Cima *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2002; Canesi *et al.*, 2003). Il est par ailleurs décrit que ces cellules circulent dans tous les tissus (Soares-da-Silva *et al.*, 2002). Les expériences ont montré une différence dans l'intensité de l'activité de phagocytose, plus importante pour les hémocytes provenant du muscle. Ce résultat pourrait correspondre à une origine différente pour les hémocytes du cœur et du muscle, se traduisant par des activités différentes. Cependant, cette différence peut également s'expliquer par la plus faible contamination de l'hémolymphe du muscle par les bactéries. Les hémocytes pourraient de ce fait être plus disponibles pour phagocyter les billes en comparaison aux hémocytes du cœur.

Une activité de phagocytose plus importante en utilisant le protocole LGP a été rapportée. Cependant, les différents protocoles n'utilisent pas les mêmes quantités de billes et les billes sont de diamètres différents (1 μm de diamètre et 700 billes.cellule⁻¹ dans le protocole LGP, 2 μm et 30 billes.cellule⁻¹ dans le protocole LEMAR). Les hémocytes sont des cellules de petite taille (entre 5 et 15 μm de diamètre). La taille des billes pourrait de ce fait être un élément important. La littérature ne rapporte pas de données sur la capacité des hémocytes de phagocyter des billes de tailles différentes.

Les protocoles mesurant la mortalité hémocytaire diffèrent principalement par la quantité d'iodure de propidium utilisée. Dans le protocole LGP, l'IP est plus concentré, ce qui rend la technique de détection plus sensible et peut expliquer les différences observées. Cependant, les variations restent faibles.

Les protocoles mesurant la production d'EOR diffèrent essentiellement par la concentration de la DHR123 (trois fois plus importante dans le protocole LGP). Ceci pourrait expliquer la forte différence observée entre les pourcentages de populations de cellules marquées.

Les activités de type estérases et la présence de lysosomes ne sont recherchées que par le LGP. Les analyses sur les deux cytomètres ne font pas apparaître de différences, ce qui démontre la robustesse des protocoles développés et l'intérêt du suivi de ces activités.

Une partie des différences observées peut provenir de l'intervalle de temps entre les deux expériences. Par ailleurs, une étude rapporte que la répartition des informations liées à la taille diffère selon le cytomètre. Sur les cytogrammes, le cytomètre Beckman affiche les différentes tailles de billes dans l'ordre croissant (de gauche à droite, taille croissante de 3 μm à 8 μm) alors que le cytomètre Becton inverse les tailles (l'ordre d'affichage de gauche à droite est 4 μm , 3 μm , 6 μm , 5 μm , 8 μm , 7 μm) (Becker, communication personnelle).

Cependant, malgré une différence entre organes de prélèvement pour la phagocytose, les valeurs présentent globalement une variabilité limitée, ce qui conforte l'idée que la cytométrie en flux est un outil adapté pour étudier les activités cellulaires des hémocytes de bivalves.

II.3. Comparaison des activités dans différents types de tissus

Le premier objectif de cette partie était de valider l'utilisation de la cytométrie en flux pour l'étude des activités hémocytaires choisies. En effet, le fait d'étudier ces activités dans d'autres tissus peut permettre de montrer que certaines activités sélectionnées sont propres aux hémocytes. Un second objectif était de vérifier si les protocoles établis en cytométrie de flux pour les hémocytes peuvent être utilisés pour d'autres cellules d'intérêt en écotoxicologie. Une approche en collaboration avec le laboratoire IFREMER d'Ecotoxicologie de Nantes (Département Polluants Chimiques) a été réalisée chez la moule *Mytilus edulis*, dans les branchies et la glande digestive. Des analyses ont été réalisées en cytométrie de flux, afin de suivre les paramètres suivants : mortalité cellulaire, activités de type estérase, peroxydase (EOR) et aminopeptidase (Gagnaire, 2001, 2002; Gagnaire *et al.*, 2003, 2004). Les résultats montrent principalement que la viabilité des cellules de la glande digestive est supérieure à celle des cellules branchiales, que les aminopeptidases ne sont détectées que dans la glande digestive, que les peroxydases ne sont pas détectées dans les deux types de tissus et que les pourcentages de cellules positives pour les estérases sont relativement faibles (20 %) dans les cellules provenant des deux types de tissus. Les peroxydases (EOR) interviennent dans la flambée oxydative se déroulant dans les hémocytes ; il apparaît donc logique de ne pas les retrouver dans la branchie et la glande digestive (Faucet *et al.*, 2004).

Ces résultats semblent confirmer la spécificité de certaines activités aux hémocytes et permettent de valider les protocoles de suivi. Cependant, il aurait été intéressant de mesurer les mêmes activités dans les tissus de *C. gigas*.

III Conditions de maintien des hémocytes *in vitro*

L'exposition d'hémocytes à des polluants *in vitro* doit permettre d'obtenir rapidement des informations sur la toxicité de différentes molécules. L'absence de lignées cellulaires de bivalves marins et la difficulté de maintenir les hémocytes en culture sur de longues durées conduit à privilégier des tests d'une durée maximum de 24 heures. Après ce délai, l'état physiologique des cellules est modifié et de nombreuses bactéries ont pu se développer. En effet, le système circulatoire semi-ouvert existant chez les coquillages est associé à la présence de bactéries dans l'hémolymphe. Le milieu interne n'apparaît pas comme stérile. Les bactéries sont donc ponctionnées en même temps que l'hémolymphe. Il apparaissait important d'optimiser les conditions de maintien des cellules durant ces 24 heures d'exposition, afin de travailler sur des cellules capables de répondre à la présence de polluants.

Des expériences ont tout d'abord porté sur la comparaison de différents traitements appliqués aux cellules afin d'ajuster la concentration cellulaire à une même valeur et ainsi de pouvoir comparer les résultats. Dans une seconde partie, l'effet du temps et de la température de culture ont été testés.

III.1. Traitement des cellules avant mise en culture

III.1.1. Matériel et Méthodes

Trois pools de dix animaux ont été réalisés. L'hémolymphe a été prélevée dans le muscle adducteur et filtrée sur 60 μm (**Annexes 2.1, 2.2**). Les hémocytes ont été dénombrés sur cellule de Malassez. Chaque pool a été divisé en trois lots égaux d'hémolymphe pour chacun des traitements. Trois traitements ont été effectués sur les cellules de manière à ramener la concentration à 10^6 cellules.mL⁻¹.

- Traitement 1 : addition d'un volume ajusté d'eau de Lewis ou EDMAS (eau de mer artificielle stérile) (**Annexe 3.2**).
- Traitement 2 : centrifugation (50 g, 15 min, 4°C ; Microfuge 12, BECKMAN), élimination du surnageant puis reprise des cellules avec un volume ajusté d'EDMAS
- Traitement 3 : centrifugation (50 g, 15 min, 4°C ; Microfuge 12, BECKMAN), élimination et conservation du surnageant, puis reprise des cellules avec un volume ajusté d'hémolymphe filtrée sur 0.22 μm

Les expériences ont été réalisées à différentes températures (10°C, 15°C, 20°C et 25°C). Le temps d'incubation était de 4 heures. Seule la mortalité hémocytaire a été suivie (**Annexe 2.4.2.2**). Les résultats ont été analysés statistiquement (**Annexe 2.3**).

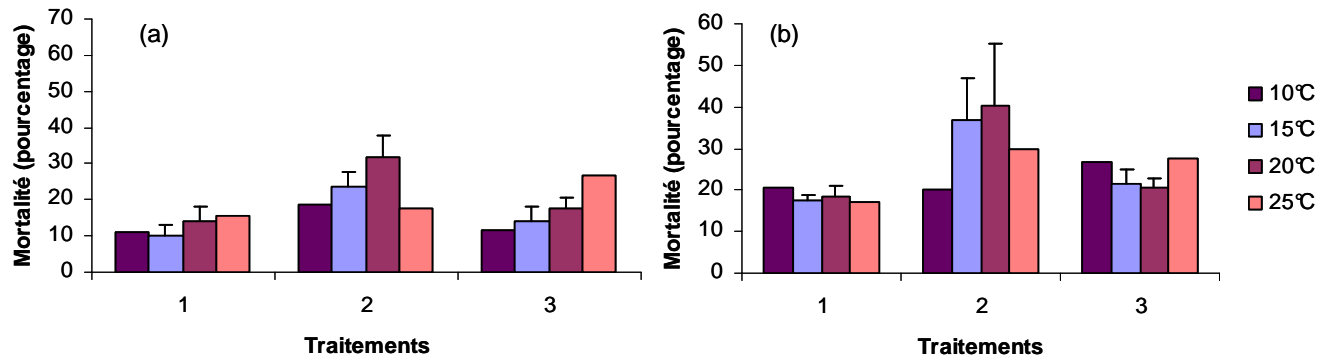


Figure 48 : évolution du pourcentage de mortalité obtenu avec les différents traitements (1, 2 et 3) et à quatre températures (10°C, 15°C, 20°C et 25°C) à 4 h (a) et à 24 h (b). N = 3 réplicats pour 15°C et 20°C ; l'erreur standard est représentée. N = 1 réplicat pour 10°C et 25°C. * = p<0.001.

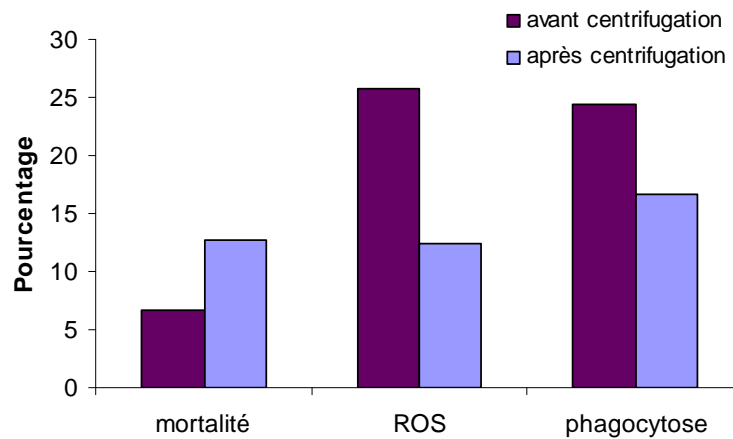


Figure 49 : effet de la centrifugation sur les paramètres hématocytaires. N = 1 réplicat.

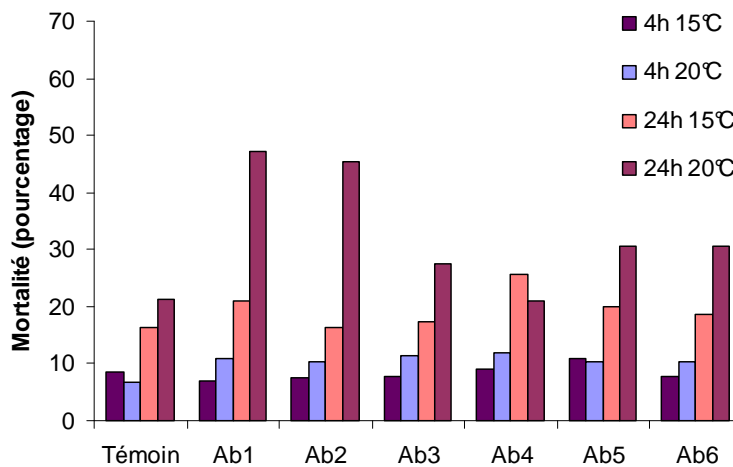


Figure 50 : évolution du pourcentage de mortalité obtenu avec les six concentrations d'antibiotiques à 15°C et 20°C après 4 h et 24 h d'incubation. N = 1 réplicat.

Dans le cadre d'une autre expérience, l'effet de la centrifugation sur les paramètres hémyocytaires a été testé. Un pool d'hémolymphe provenant de dix animaux a été réalisé. La mortalité hémyocytaire, la production d'EOR et la phagocytose (**Annexes 2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.2.5**) ont été évaluées juste après la ponction et après une centrifugation suivie d'une resuspension en hémolymphe (traitement 3).

III.1.2. Résultats

Le pourcentage de mortalité augmente après 4 h et 24 h d'incubation ($p < 0.05$) (**Figure 48**). Le traitement 1 permet d'obtenir les mortalités les plus faibles à 4 h et à 24 h ($p < 0.05$) (**Figure 48**). Après centrifugation, la mortalité augmente (12.8 % et 6.6 % respectivement), alors que la production d'EOR (25.7 % et 12.5 % respectivement) et la phagocytose (24.4 % et 16.7 % respectivement) diminuent ($p < 0.05$) (**Figure 49**).

III.1.3. Discussion

Dans les études d'immunotoxicologie, la plupart des auteurs ajustent la concentration cellulaire (Alvarez *et al.*, 1989; Bouchard *et al.*, 1999; Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2002). Cette étape est indispensable pour pouvoir comparer les résultats obtenus. Cependant, les techniques permettant d'ajuster la concentration cellulaire sont peu documentées.

Des premières expériences mesurant uniquement la mortalité cellulaire ont permis de montrer que la centrifugation fragilisait les hémocytes. Une expérience complémentaire a montré que les fonctions cellulaires sont altérées à la suite d'une centrifugation.

La centrifugation et le remplacement de la totalité de l'hémolymphe par l'EDMAS altèrent les cellules. Le protocole retenu fait donc intervenir l'ajout d'eau de Lewis, une eau de mer artificielle dont la composition est standardisée. Ce choix a paru s'imposer du fait de l'impossibilité d'obtenir une eau de mer naturelle ayant toujours la même composition. La composition de l'eau varie en effet au cours du temps, ce qui peut avoir un effet non négligeable sur les cellules et leur sensibilité aux polluants. Cependant, la dilution de l'hémolymphe peut également modifier certaines propriétés des hémocytes, telles que les phénomènes d'opsonisation dus aux lectines.

Une partie de ces résultats a été publiée dans l'**Article 2** (Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry) présenté dans la deuxième partie (III).

III.2. Effets des antibiotiques

III.2.1. Matériel et méthodes

Un pool de dix hémolymphes ponctionnées dans le muscle adducteur a été réalisé (**Annexes 2.1, 2.2**). La concentration des hémocytes a été ajustée à 10^6 cellules.mL⁻¹ selon le traitement 1 (III.1). Un cocktail de trois antibiotiques couramment utilisés en culture cellulaire et pour la production de larves axéniques a été utilisé (**Annexe 3.6**) à des concentrations finales de 0.5-1-5-10-50-100 ng.mL⁻¹ (Ab 1, 2, 3, 4, 5 et 6). Les hémocytes ont été incubés à 15°C et 20°C pendant 4 h et 24 h. La mortalité hémocytaire a été évaluée par cytométrie en flux (**Annexe 2.4.2.2**).

III.2.2. Résultats

Les plus fortes mortalités sont obtenues après 24 h d'incubation à 20°C (**Figure 50**). A cette condition, les faibles concentrations d'antibiotiques (Ab 1 et Ab 2) augmentent la mortalité en comparaison au témoin.

III.2.3. Discussion

Les antibiotiques ne semblent pas avoir d'effets sur la mortalité hémocytaire. Plusieurs études précédentes ont décrits l'utilisation d'antibiotiques afin de limiter le développement de bactéries en culture cellulaire (Le Deuff *et al.*, 1994; Burgeot *et al.*, 1995; Renault *et al.*, 1995b; Faucet *et al.*, 2004). Des expériences réalisées précédemment au laboratoire utilisaient comme milieu de culture pour les hémocytes de l'eau de mer additionnée d'antibiotiques (Gagnaire *et al.*, 2004). Cependant, les antibiotiques peuvent altérer les fonctions cellulaires (Rouveix *et al.*, 1987). L'action d'un polluant pourrait être modifiée par la présence d'autres substances. Il est en effet connu que l'ajout de plusieurs molécules dans un milieu peut résulter en une synergie, un antagonisme, ou une absence d'interaction des molécules (Gutierrez-Galindo & Breittmayer, 1981). Le fait de ne pas rajouter d'antibiotiques évite les risques d'interactions entre les polluants et les antibiotiques. Les résultats n'ayant pas montré d'effets des antibiotiques, nous avons choisi de ne pas en rajouter dans le milieu de culture.

III.3. Effet de la température et du temps de mise en culture sur les activités cellulaires (Article 2)

Les travaux réalisés dans ce domaine ont été publiés dans l'**Article 2** (Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry) (cf deuxième partie, III).

La plupart des études sur l'immunotoxicité utilisent des temps d'incubation de 24 h ou moins (2 h (Cheng & Sullivan, 1984), 18 h (Brousseau *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002) ou 20 h (Anderson *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2002). Les temps d'incubation de 48 h et 72 h ne semblent pas permettre la survie des cellules : la mortalité cellulaire était importante et l'activité de type estérase a diminué de manière importante. Nous avons donc choisi 24 h comme temps d'incubation.

Les résultats montrent qu'à 20°C et après 24 h d'incubation, le pourcentage de cellules positives pour les estérases diminue et la mortalité cellulaire augmente. Les pourcentages de mortalité sont équivalents à 10°C et 15°C et sont élevés à 48 h et 72 h. La température de 20°C, relativement élevée, est associée au développement de bactéries dans la culture. Une température de 20°C pourrait provoquer des changements métaboliques et physiologiques importants et est considérée comme un seuil « à risque » (Koganezawa, 1974). D'autre part, les températures moyennes du bassin de Marennes Oléron sur une année sont comprises entre 10°C et 15°C (Soletchnik *et al.*, 1998a). La température 10°C n'apparaît pas optimale pour les incubations *in vitro* avec des polluants. Certains paramètres cellulaires comme la stabilisation de la membrane peuvent être altérés à 10°C (Hauton *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 2000). La température de 15°C a donc été retenue pour la suite des expériences.

IV Conclusion

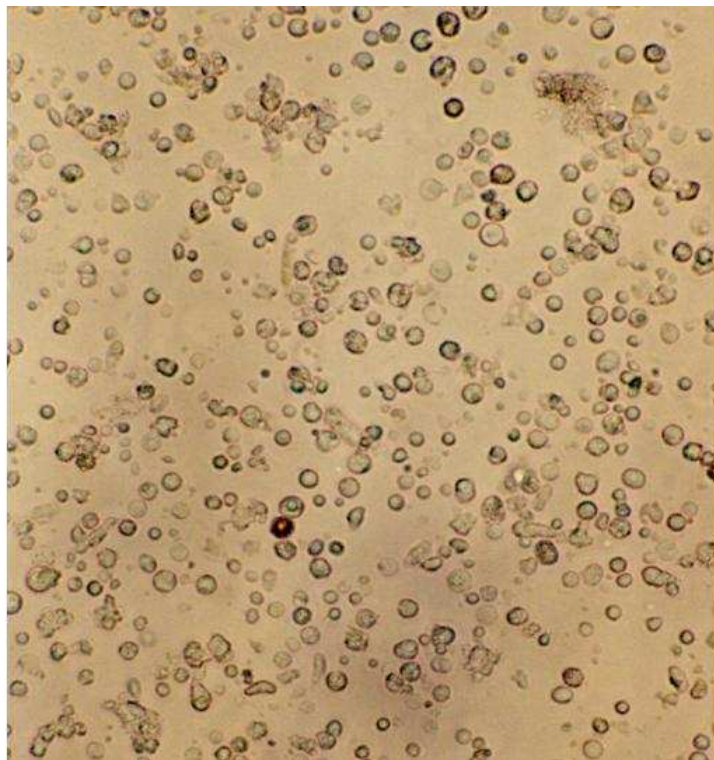
Cette partie a permis de développer et de mettre au point un certain nombre de protocoles afin de suivre six paramètres hématologiques sélectionnés (pourcentage de granulocytes, mortalité cellulaire, activité estérase, phagocytose, production d'EOR, présence de lysosomes) chez *C. gigas*.

L'étude menée en collaboration avec le LEMAR a permis de tester différents protocoles servant à mesurer un même paramètre hématologique. Il est primordial d'harmoniser les outils et les protocoles utilisés. Les résultats obtenus tendent à montrer que dans l'ensemble, peu de variations existent, à l'exception de l'activité de phagocytose. Des études réalisées sur les bivalves ont montré que la phagocytose semble donc être un bon biomarqueur immunologique pour sa capacité à démontrer une immunomodulation dans de nombreuses circonstances, y compris pour des études de terrain (Fournier *et al.*, 2000). Il apparaît donc important de poursuivre ce travail de comparaison, en particulier pour la phagocytose, jusqu'à arriver à définir un protocole pour une activité donnée. En effet, à l'heure actuelle, l'absence de standardisation des protocoles visant à évaluer l'effet de polluants sur le système immunitaire des bivalves (polluants utilisés, temps de contact, protocoles, espèces) limite l'interprétation des résultats (Lorteau *et al.*, 1995a).

L'étude réalisée sur le suivi des paramètres mis au point dans d'autres types cellulaires chez *M. edulis* valide l'utilisation de la cytométrie de flux pour l'étude d'activités cellulaires de bivalves. Un effort a été également fourni afin d'établir un milieu optimal pour la conservation des hématocytes lors d'expériences de mises en contact *in vitro* avec les polluants. De ce fait, le suivi des paramètres étudiés en présence de polluants devrait permettre d'en évaluer les effets.

Deuxième partie

Analyse *in vitro* de paramètres hémocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



I Introduction

Le prélèvement d'hématocytes est facilement réalisable, ce qui fait de ces cellules un modèle intéressant pour les études d'immunotoxicité. Les résultats de la partie précédente ont permis de déterminer les conditions optimales pour l'étude de ces cellules. Du fait de la difficulté de maintenir les hématocytes *in vitro*, les expériences doivent être de courte durée (24 h au maximum). L'avantage des tests *in vitro* est de pouvoir obtenir des réponses rapidement. Il est possible de tester un grand nombre de conditions.

Dans le cadre de ce travail de thèse, des expériences visant à déterminer l'effet de facteurs environnementaux (température et salinité d'une part, polluants d'autre part) sur les hématocytes ont été réalisées *in vitro*. Au cours des expériences réalisées, plusieurs paramètres hématocytaires (mortalité, pourcentage de granulocytes, activités estérases et aminopeptidases, production d'EOR, présence de lysosomes et activité de phagocytose) ont été suivis en cytométrie de flux. L'intérêt majeur de cette approche est la stratégie d'étude de l'effet de facteurs environnementaux (température, salinité et polluants) sur les activités des hématocytes en utilisant plusieurs biomarqueurs alors que la majorité des études sur le sujet n'en utilisent qu'un.

Les résultats de cette partie sont rapportés sous forme de deux publications : la première porte sur les effets *in vitro* et *in vivo* de la température et de la salinité sur les paramètres hématocytaires et la deuxième porte sur les effets *in vitro* de 23 polluants sur ces paramètres.

II Effets de paramètres physico-chimiques sur les paramètres hématocytaires (Article 1)

Article 1 : Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) (Fish & Shellfish Immunology, sous presse)

La température et la salinité sont deux paramètres abiotiques qui présentent d'importantes variations en fonction de la période de l'année. Les huîtres creuses, *C. gigas*, étant élevées généralement sur l'estran, elles subissent ces variations de l'environnement. De plus, du fait du système circulatoire de type semi-ouvert des huîtres et de leur osmo- et thermo-conformité, la température et la salinité peuvent influencer directement les fonctions physiologiques et notamment les activités des hématocytes. Peu d'études ont porté sur les effets de ces deux facteurs abiotiques sur les paramètres hématocytaires.

Cette étude a permis d'évaluer les effets *in vitro* de la température et de la salinité sur les hématocytes. Après 2 h et 4 h d'exposition à une gamme de température, la mortalité hématocytaire augmente à 40°C, 50°C et 60°C ; le pourcentage de cellules positives pour les estérases et les aminopeptidases diminuent à 50°C et 60°C. La salinité provoque elle aussi une augmentation de la mortalité et une diminution du pourcentage de cellules positives pour les estérases à 6.5 ‰, 3 ‰ et 0 ‰ après 2 h et 18 h d'exposition.

Il apparaît que les hématocytes sont des cellules sensibles à des variations *in vitro* extrêmes de température et de salinité. Ces résultats sont à prendre en considération, car certaines des conditions expérimentales testées peuvent être observées dans le milieu naturel. En émergence, en été, la température peut atteindre 40°C dans le milieu et être encore plus élevée dans les huîtres. De plus, dans les expériences réalisées, les hématocytes n'ont été soumis qu'à une variation ponctuelle. Dans l'environnement, les variations de température et de salinité peuvent se répéter plusieurs fois (variations jour/nuit, cycle tidal). Si les hématocytes apparaissent sensibles à une variation ponctuelle importante, ils pourraient l'être également et davantage lors de variations répétées.



ELSEVIER

Fish & Shellfish Immunology 20 (2006) 536–547

**Fish & Shellfish
Immunology**

www.elsevier.com/locate/fsi

Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)

Beatrice Gagnaire^a, Heloise Frouin^{a,b}, Kevin Moreau^a,
Helene Thomas-Guyon^b, Tristan Renault^{a,*}

^a Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), Ronce-les-Bains, IFREMER La Tremblade, 17390 La Tremblade, France

^b Laboratoire de Biologie et Environnement Marin (LBEM), Université de La Rochelle, FRE 2727,
Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

Received 17 March 2005; revised 4 July 2005; accepted 11 July 2005

Available online 21 September 2005

Abstract

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is extensively cultivated and represents an important economic activity. Oysters are reared in estuarine areas, subjected to various biotic and abiotic factors. One of the limiting factors in aquaculture is mortality outbreaks, which may limit oyster production, and the causes of these outbreaks are not completely understood. In this context, the effects of temperature and salinity on Pacific oyster, *C. gigas*, haemocytes, were studied. Haemocytes are the invertebrate blood cells and thus have been shown to be involved in defence mechanisms. Flow cytometry was used for monitoring several haemocyte parameters. An increase of temperature induced an increase of haemocyte mortality, in both in vitro and in vivo experiments. Temperature modulated aminopeptidase activity. An in vitro decrease of salinity was associated with cell mortality. During the course of in vivo experiments, an increase of phagocytic activity was reported at 15‰ and 50‰. Environmental physical parameters may modulate haemocyte activities.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pacific oyster; *Crassostrea gigas*; Haemocyte; Temperature; Salinity; Flow cytometry; Cellular activity

1. Introduction

Shellfish farming represents an important economic activity around the world. Among shellfish, the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the most cultivated species. In France, *C. gigas* was introduced in the 1970s to

* Corresponding author. Tel.: +33 5 4676 2649; fax: +33 5 4676 2611.

E-mail address: trenault@ifremer.fr (T. Renault).

replace the Portuguese oyster, *C. angulata* [1]. France ranks fourth worldwide in the production of *C. gigas* with 150 000 tons produced annually. However, oyster production may be subjected to various limiting factors including mortality outbreaks. For several decades now, French Pacific oyster livestock has presented abnormal mortality outbreaks during the summer period. This phenomenon, called summer mortality, has also been reported in North America and Japan since the 1940s [2–4]. Authors have hypothesised that summer mortality outbreaks are the result of multiple factors, including elevated temperatures, physiological stress associated with sexual maturation, aquaculture practices, pathogens or pollutants [5]. The Pacific oyster, *C. gigas*, is mostly reared in estuaries that are continually contaminated by pollutants [6]. Estuaries are also subjected to important variations of abiotic environmental factors, including temperature and salinity. *C. gigas* is an osmo- and thermo-conformer species [7]. In oysters natural habitat, salinity fluctuates with tidal cycles, rainfall and with drainage from adjacent terrestrial sites [8]. In summer period, temperature can reach high values. Oysters are sessile benthic animals and as such are continually exposed to physico-chemical modifications of the environment. Physical stress such as tidal exposure, which modify temperature and salinity, can affect marine invertebrate defence mechanisms [9].

Bivalve defence mechanisms involve circulating blood cells, the so-called haemocytes [10]. In *C. gigas*, two types of haemocytes can be differentiated on the basis of morphological features: hyalinocytes and granulocytes [10]. Haemocytes constitute one of the main line of defence against non-self particles. They are involved in phagocytosis and encapsulation of foreign material [10–12]. They also contain hydrolytic enzymes and produce reactive oxygen species (ROS), which play a key role in pathogen degradation [13–15]. They have been used as immune capacity indicators in many bivalve species [16–19].

Studies have previously been conducted on the effects of temperature and salinity on bivalve haemocytes [20–23]. Since bivalves are both osmo- and thermo-conformers, haemolymph readily acquires salinity and temperature of the external environment [7]. In fact, haemocytes found in haemolymph and in tissue sinuses are exposed to temperature and salinity variations that occur in the environment. High water temperatures inhibit haemocyte spreading and locomotion in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) [24] while variations of temperature can also affect haemocyte counts and phagocytic activity in *Ostrea edulis* and *Ruditapes philippinarum* [25,26]. On the other hand, elevated salinity increased the time for spreading and reduced haemocytes locomotion towards target particles and may therefore pose an additional stress [27] and may also reduce oyster defence capacities and leave them more susceptible to parasites [27]. Moreover, the susceptibility of *C. virginica* to the protozoan parasites *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni* is influenced by temperature and salinity [24,28,29].

In this study, the effects of temperature and salinity on the Pacific oyster, *C. gigas*, and haemocyte parameters were investigated. Haemocytes were subjected in vitro to a range of temperatures and salinity. In vivo experiments were also carried out by placing oysters in waters at defined salinities or in incubators at controlled temperatures. Haemocyte parameters were monitored using flow cytometry. This emerging tool has often been used in marine bivalve research to describe haemocyte population characteristics [30,31] or changes associated with pathology or environmental stress [32,33]. Cell mortality, esterase, aminopeptidase activities and phagocytic activity were monitored.

2. Material and methods

2.1. Oysters

Eighteen-month-old Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, 7–10 cm in shell length, were produced in the IFREMER hatchery in La Tremblade (Charente-Maritime, France). Temperature experiments were conducted in April and May 2002 and salinity experiments were undertaken in July 2004. For both experiments, oysters were held in tanks receiving a constant flow of external seawater.

2.2. Haemocyte collection

For temperature experiments, haemolymph was withdrawn from the pericardial cavity while for salinity experiments, haemolymph was collected from the posterior adductor muscle sinus. In both cases, a 1-mL syringe equipped with a needle (0.9 × 25 mm) was used. Haemolymph samples were filtered on a 60- μm mesh to eliminate debris and were maintained on ice to prevent aggregation. In order to reduce inter-individual variation and to provide enough haemocytes for experiments, haemolymph samples were pooled. Haemocyte counts were performed using a Malassez cell and the cell concentration was adjusted to 10^6 cells mL^{-1} with artificial seawater (ASW: 23.4 g NaCl, 1.5 g KCl, 1.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.15 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.15 g CaCl_2 anhydrous; H_2O qsp 1 L).

2.3. Effect of temperature on haemocyte parameters

Before each experiment, the oysters were acclimated in tanks receiving external seawater (temperature and salinity were 11.6–17.7 °C and 31.5–32.3‰).

2.3.1. In vitro experiments

After collection of haemocytes and resuspension in ASW, antibiotics (kanamycin, erythromycin, oxolinic acid, 0.1 mg mL^{-1}) were added. Haemocytes were incubated for 2 h and 4 h at varying temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Cell mortality, phagocytic activity, esterase and aminopeptidase activities were monitored by flow cytometry as described below. Experiments were carried out in triplicates.

2.3.2. In vivo experiments

Five oysters were immersed during 4 h in incubators at different temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Haemolymphs were then withdrawn and pooled from five oysters without any treatment. Cell mortality, phagocytosis, esterase and aminopeptidase activities were analysed by flow cytometry as described below. Experiments were carried out in triplicates.

2.4. Effect of salinity on haemocyte parameters

Before each experiments, the oysters were acclimated in tanks receiving external seawater (temperature and salinity of external seawater were 18.7–19 °C and 33.9–34.5‰).

2.4.1. In vitro experiments

After collection, haemocytes were divided into eight tubes, and centrifuged (10 min, 100 g, 4 °C; Microfuge Beckman). The cells were resuspended in haemolymph only in tube 1. The cells from tubes 2 to 7 were resuspended in a haemolymph-distilled water mixture in order to obtain a range of decreasing salinity (tube 2: 29‰, tube 3: 25.5‰, tube 4: 22.5‰, tube 5: 16‰, tube 6: 6.5‰, tube 7: 3‰). The cells from tube 8 were resuspended in distilled water (0‰).

Cell mortality was monitored using flow cytometry after 2 h and 18 h at 15 °C. Experiments were carried out four separate times.

2.4.2. In vivo experiments

In the first experiment, 40 oysters were placed in three tanks at 15‰ (hyposalinity), 35‰ (control) and 45‰ (hypersalinity), respectively. Hyposalinity was obtained by mixing 25 L of sea water and 15 L of fresh water. Hypersalinity was obtained by the addition of 516 g of aquarium sea salts (Instant Ocean Aquarium Systems, synthetic sea salts without nitrate and phosphate, Haurit, Saintes, France) in 40 L of sea water.

Oysters were fed with *Chaetoceros gracialis* (3×10^9 cells per tank). Water and food were provided every day. Temperature of external seawater was maintained between 18.7 and 19 °C during the experiments which lasted 7 days. Sampling of ten oysters per tank were then performed at days 1, 3 and 7. Ten oysters were also analysed at the beginning of the experiment. At each time, the oysters were divided in three pools. Cell mortality and phagocytosis were analysed by flow cytometry as described below.

A second experiment was conducted using the same protocol as previously described with the following differences: oysters were maintained at 5‰ (hyposalinity), 35‰ (control) and 60‰ (hypersalinity). Hyposalinity was obtained by mixing 35 L of fresh water and 5 L of sea water. Hypersalinity was obtained by adding 1219 g of aquarium sea salts (Instant Ocean Aquarium Systems, synthetic sea salts without nitrate and phosphate, Haurit, Saintes, France) in 40 L of sea water.

2.5. Flow cytometry analysis

The protocols used in the present study were previously described [34]. For each sample, 3000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Results were depicted as cell cytograms indicating cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used. Recorded fluorescence depended on the monitored parameters: enzymatic activities and phagocytosis were measured using green fluorescence while cell mortality was measured using red fluorescence. Mortality was quantified using 200 µL of haemocyte suspension. Haemocytes were incubated in the dark for 30 min at 4 °C with 10 µL of propidium iodide (PI, 1.0 mg L⁻¹, Interchim). Esterase and aminopeptidase activities were evaluated with commercial kits (Cell Probe™ Reagents, Beckman Coulter). Each analysis required 200 µL of haemolymph and 20 µL of the corresponding kit (FDA·Esterase and A·Aminopeptidase M). Haemocytes were incubated in the dark at ambient temperature, 15 min for esterases and 30 min for aminopeptidases. Phagocytosis was measured by ingestion of fluorescent beads. Two hundred microlitres of haemocyte suspension were incubated for 1 h in the dark at ambient temperature with 10 µL of a 1/10 dilution of Fluorospheres® carboxylate-modified microspheres (diameter 1 µm, Interchim).

2.6. Statistical analysis

Results were expressed as percentage of positive cells. In order to detect an effect of tested conditions, an ANOVA was performed using Statgraphics® Plus version 5.1 software. To ensure respect of a priori assumptions for normality and homogeneity, values were converted into r angular arcsinus $\sqrt{(\% \text{ of positive cells})}$ before analysis and in the case of rejection of H_0 , an a posteriori test was used. Significance was concluded at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Temperature effects

3.1.1. In vitro experiments

After a 2-h incubation period, cell mortality significantly increased at 40 °C (Fig. 1, $P < 0.001$), while after a 4-h incubation period, mortality was significantly higher at 50 and 60 °C (Fig. 1, $P < 0.001$). Percentages of aminopeptidase positive cells were significantly lower for both incubation periods at 50 and 60 °C (Fig. 2). Percentages of esterase positive cells were significantly lower after a 2-h incubation period at 50 °C and after a 4-h incubation period at 50 and 60 °C (Fig. 3).

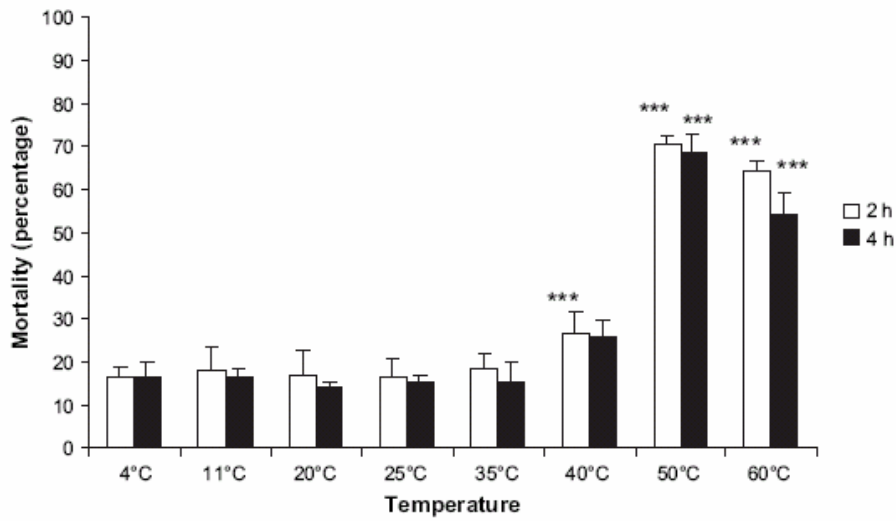


Fig. 1. Haemocyte mortality percentage of oysters evaluated by flow cytometry after an in vitro 2 h or 4 h incubation period at several temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Values are mean of three replicates. Bars represent standard deviation. *** $P < 0.001$.

3.1.2. In vivo experiments

Cell mortality significantly increased at 40, 50 and 60 °C (Fig. 4, $P < 0.001$). The percentage of esterase positive cells was significantly lower at 4 and 60 °C compared to other temperatures (Fig. 4, $P < 0.001$), and phagocytosis activity decreased at 60 °C (Fig. 4, $P < 0.001$).

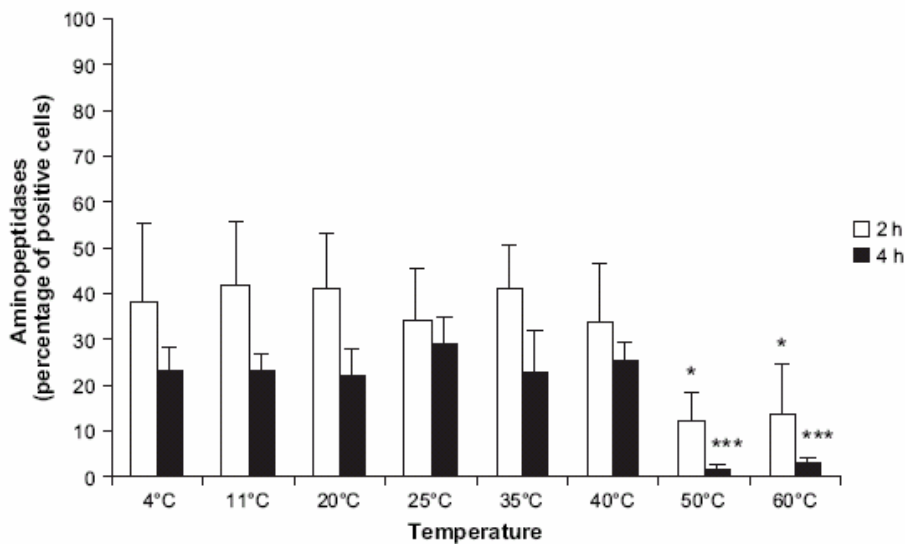


Fig. 2. Percentage of positive cells for aminopeptidases of oysters evaluated by flow cytometry after an in vitro 2-h or 4-h incubation period at several temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Values are mean of three replicates. Bars represent standard deviation. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

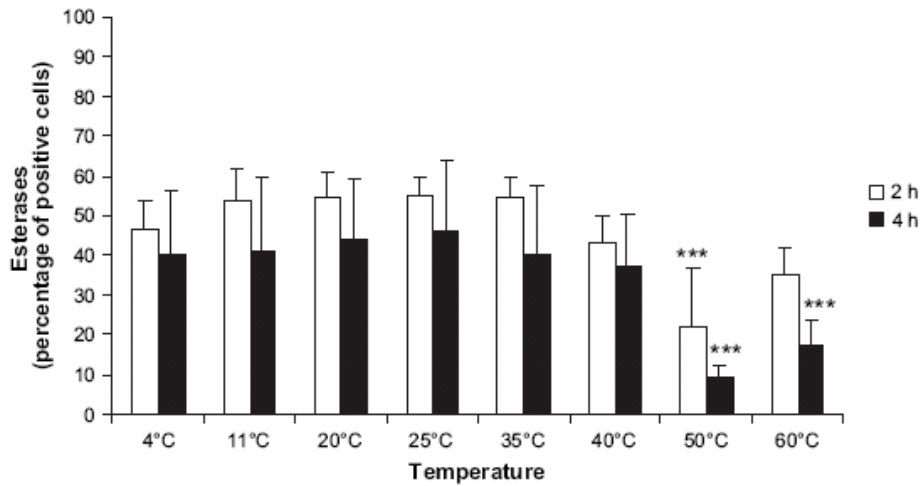


Fig. 3. Percentage of positive cells for esterases of oysters evaluated by flow cytometry after an in vitro 2-h or 4-h incubation period at several temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Values are mean of three replicates. Bars represent standard deviation. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

3.2. Salinity

3.2.1. In vitro experiments

After a 2-h incubation period, cell mortality was significantly higher for lower salinities (6.5‰, 3‰ and 0‰) (Fig. 5, $P < 0.001$) in contrast with the percentage of esterase positive cells which was significantly lower (Fig. 6, $P < 0.001$). After an 18-h incubation period, mortality was significantly higher for 3‰

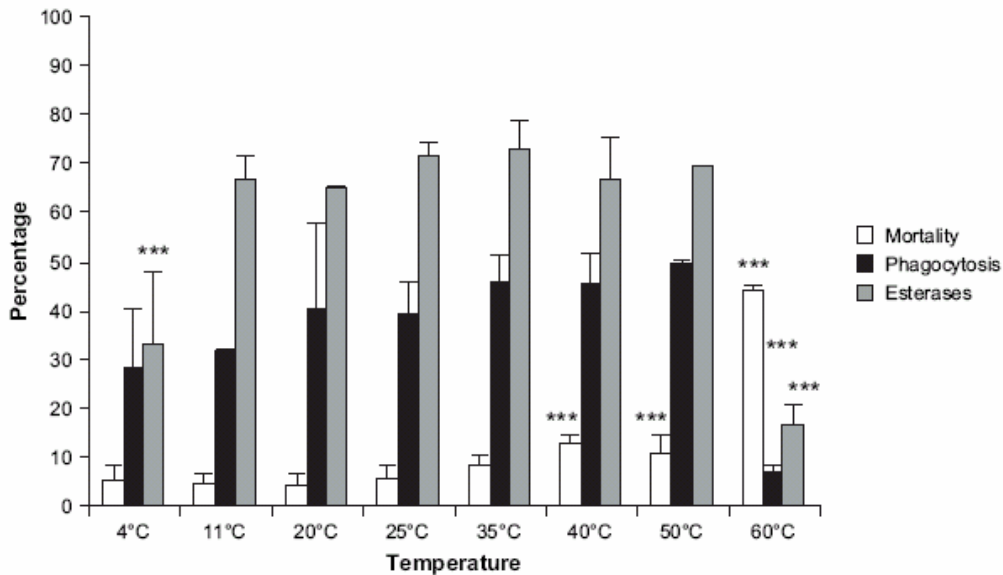


Fig. 4. Haemocyte mortality percentage, phagocytosis percentage and percentage of positive cells for esterases of oysters evaluated by flow cytometry after an in vivo 4-h incubation period at several temperatures (4 °C, 11 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C). Values are mean of three replicates. Bars represent standard deviation. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

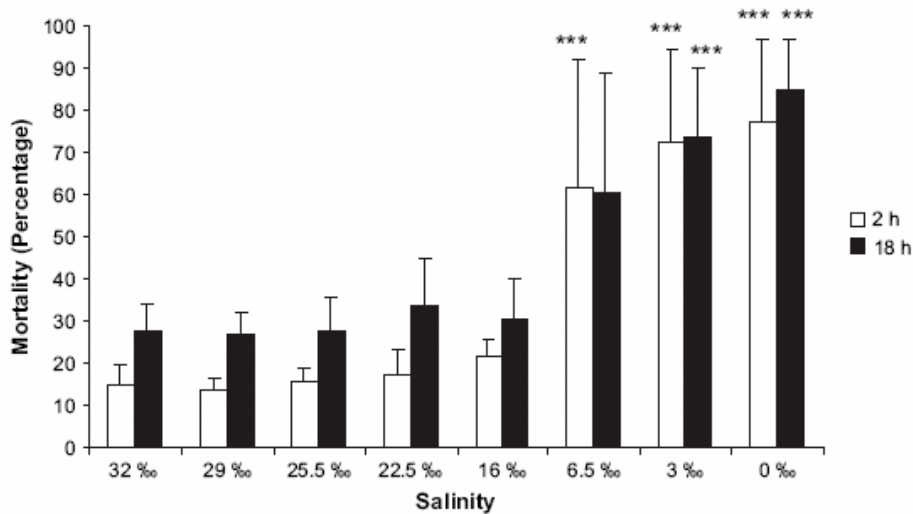


Fig. 5. Haemocyte mortality percentage of oysters evaluated by flow cytometry after an in vitro 2-h or 18-h incubation period at different salinities (32‰, 29‰, 25.5‰, 22.5‰, 16‰, 6.5‰, 3‰ and 0‰). Values are mean of four replicates. Bars represent standard deviation. *** $P < 0.001$.

and 0‰ (Fig. 5, $P < 0.001$) and esterase percentage of positive cells was significantly lower for the same salinities (Fig. 6, $P < 0.001$).

3.2.2. In vivo experiments

No mortality was noted during the first experiment. After 1 day, phagocytosis activity was significantly lower in oysters placed in hyposalinity compared to the two other conditions (Fig. 7, $P < 0.05$). After 3 and 7 days, phagocytosis activity was significantly lower in control oysters than in the two other conditions

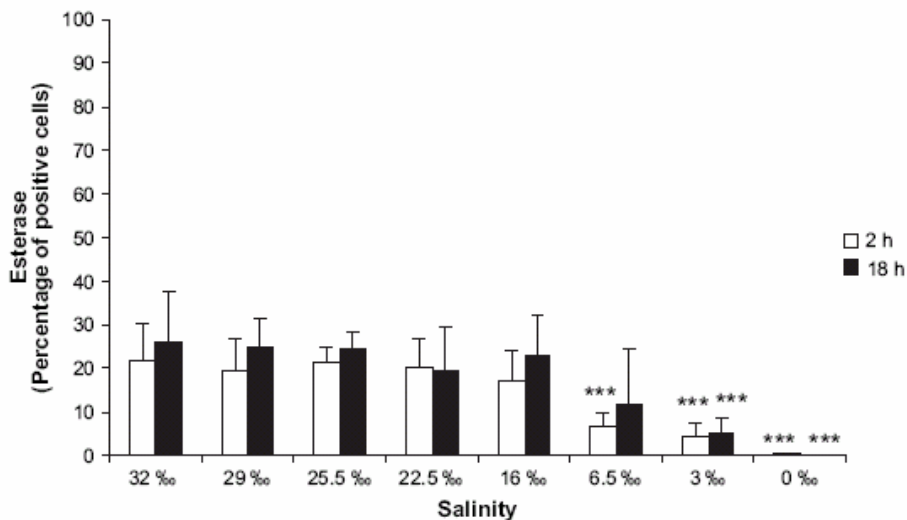


Fig. 6. Percentage of positive cells for esterases of oysters evaluated by flow cytometry after an in vitro 2-h or 18-h incubation period at different salinities (32‰, 29‰, 25.5‰, 22.5‰, 16‰, 6.5‰, 3‰ and 0‰). Values are mean of four replicates. Bars represent standard deviation. *** $P < 0.001$.

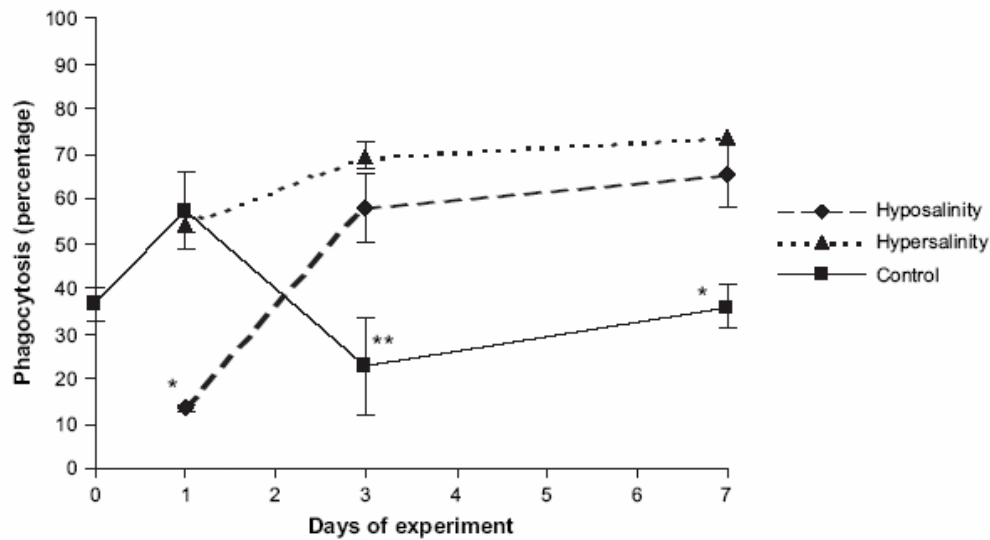


Fig. 7. Phagocytic activity of oysters evaluated by flow cytometry after an in vivo exposure to 15‰ (hyposalinity), 35‰ or 45‰ (hypersalinity) during 7 days. Values are mean of three replicates. Bars represent standard deviation. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

(Fig. 7, $P < 0.01$). Two-way analysis of variance showed that phagocytosis activity was significantly lower in control oysters than in oysters placed in hypersalinity ($P < 0.05$). Cell mortality showed no variation in relation with salinity condition (data not shown).

In the second experiment, a high daily mortality was reported in hypo- and hypersalinity conditions (Fig. 8). Oyster mortality appeared on day 3 for both conditions (15% of mortality in hyposalinity, 25.9% of mortality in hypersalinity, Fig. 8). Highest mortality levels were observed on day 6 (55.5% of mortality in hyposalinity, 66.6% of mortality in hypersalinity, 0% of mortality in the control, Fig. 8). Cell mortality and phagocytosis activity showed no effect related to salinity conditions during the first three days of experiment (data not shown).

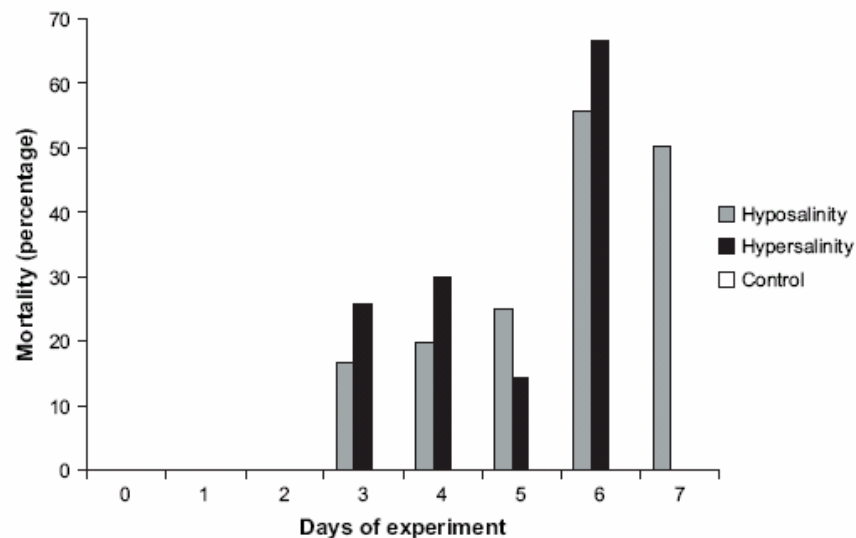


Fig. 8. Daily mortality of oysters after an in vivo exposure to 5‰ (hyposalinity), 35‰ or 60‰ (hypersalinity) during 7 days.

4. Discussion

In the present study, flow cytometry was used to demonstrate effects of two abiotic factors (temperature and salinity) on haemocyte parameters of the Pacific oyster, *C. gigas*. Flow cytometry has been shown to be an efficient tool for analysis of haemocytes in various mollusc species [31,33–35]. However, relatively few studies have used this tool for monitoring effect of temperature and salinity on haemocyte parameters [22,36].

Pacific oysters were exposed to varying regimes of temperature and salinities in order to assess their sensitivity to abiotic factors including temperature and salinity. In in vitro experiments, we have demonstrated that while high temperatures induced haemocyte mortality, haemocytes can tolerate a temperature of 35 °C without presenting any mortality. In contrast, a 4 h in vivo incubation period at 40, 50 and 60 °C increased cell mortality of oysters. Esterase activity was decreased at 4 and 60 °C, and phagocytosis was decreased only at 60 °C. This was consistent with the decreased phagocytosis activity of *Ostrea edulis* haemocytes [25] and of *C. virginica* haemocytes [22,36] as well as with the increased cell mortality of *C. virginica* haemocytes [22,36] following temperature elevation. However, the decrease of enzymatic activities was predictable, as haemocytes presented mortality, which is a consequence of morbidity. In Marennes-Oleron Bay (Charente-Maritime, France), 4 h correspond to the time of exondation between low tide and high tide. The temperature in the field may often reach 40 °C during the summer period [37]. Since oysters often encounter these extreme conditions, they may have become tolerant and thus the effect of high temperature may have been masked. In addition, oysters are thermoconformers and our results confirm that oyster haemocytes can adapt to elevated temperatures.

In vitro decrease of salinity also induced an increase of cell mortality. However, as mentioned before, the decrease of enzymatic activities was predictable, as haemocytes presented mortality. Salinity variations also reduced haemocyte activities of *C. virginica* haemocytes in other studies [24,27]. However, oyster haemocytes are able to synthesise osmotic shock protein, therefore protecting themselves from acute salinity variations [8]. The relationships between in vitro measurements of haemocyte activities and the ability of marine bivalves to develop accurate defence in the field have not been established. In vitro measurements do not represent in vivo or in situ conditions [25].

In vivo experiments involving salinity were also conducted. In the first experiment, phagocytosis activity was enhanced at both high salinity (45‰) and low salinity (15‰). Another study reported a decrease of phagocytosis in *Ruditapes philippinarum* associated with an increase of salinity [38]. These results indicate that salinity may modulate phagocytic activity. In the second experiment, oysters were reared at 5‰ and 60‰, and both conditions induced high mortality. However, those values are distant from the range of salinity reported in Marennes-Oleron Bay (21–34‰), where *C. gigas* are reared [37]. Oysters may not be able to acclimatise to high salinities. However, a part of oysters are reared in 'claires' (oyster pounds), a confined zone, where salinity may decrease to 15‰ after rainfalls (Soletchnik, personal communication).

Crassostrea gigas have been successfully introduced in many countries over the world since the 1950s [1,39]. We can therefore conclude that this species is naturally subjected to important variations of environmental conditions and can acclimatise to them. Moreover, our results clearly demonstrated that only extreme values of temperature and salinity could modify haemocyte activities of *C. gigas*. Haemocytes are apparently resistant cells because only high values of temperature and salinity kill them. This phenomenon has already been observed with pollutant exposure: only high concentrations of mercury chloride were able to kill haemocytes after 4 h of in vitro contact [40].

These results could lead us to study possible interactions between the effects of abiotic factors and pollutants or susceptibility to infections. Most of the studies conducted on abiotic factors including temperature and salinity on bivalve defence functions pointed to the relationships between abiotic factors and diseases. The virulence of infectious agents in the field has been correlated with high salinities and temperatures [41]. Prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* in *C. virginica* is positively correlated to

salinity [29] and to temperature [42], suggesting that parasite virulence may be increased or oyster resistance may be decreased at high salinities [43] and high temperatures.

Viral infection may also be influenced by temperature and salinity. In the hard clam, *Meretrix lusoria*, birnavirus has proved to be more pathogen to young stages when a rapid increase of water temperature occurs [44]. Moreover, herpes virus affecting the Pacific oyster, *C. gigas*, may exist as a latent form or low productive infection and temperature elevation can declare the disease into the whole organism for larvae and spat [45,46].

In vivo acute variations of temperature and salinity increase could temporarily affect the ability of shellfish haemocytes to resist foreign invasion [25]. Temperature and salinity appear to be key factors modulating the host immune defence in invertebrates and influences the severity of disease in several bivalve species, particularly during young stages [47]. Their role in massive mortality affecting different invertebrate species of economic interest must be taken into account. The interactions between temperature, salinity, pollutants and pathogens, together with all other environmental factors (pH, dissolved oxygen) could represent scraps of explanation of the summer mortality phenomenon in *C. gigas*. In this context, experiments studying relationships between modulation of abiotic factors and infectious agents (including bacteria or OsHV-1) could be conducted in the future.

Acknowledgements

The authors are thankful to P. Gouletquer for allowing the work at the IFREMER station in La Tremblade (Charente-Maritime, France). Thanks are due to Dr Thierry Burgeot for his advices. The authors are grateful to Dr Sylvie St-Jean (Fisheries and Oceans Canada, Burlington, Ontario, Canada) for improving the English of the manuscript. This research was supported in part by the Poitou-Charentes Region.

References

- [1] Grizel H, Heral M. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). ICES J Mar Sci 1991;47:399–403.
- [2] Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J Shellfish Res 2000;19:353–9.
- [3] Glude JB. A summary report of Pacific Coast oyster mortality investigations 1965–1972. In: Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo. 1974. p. 28.
- [4] Koganezawa A. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In: Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan, October 15–16, 1974;29–34.
- [5] Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, et al. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen; 1998.
- [6] Livingstone DR. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 1998;120:43–9.
- [7] Shumway SE. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. Mar Biol 1977;41:153–77.
- [8] Tirard CT, Grossfeld RM, Levine JF, Kennedy-Stoskopf S. Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes in vitro. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 1997;116:43–9.
- [9] Cheng TC, Combes C. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. In: Castri FD, Hansen AJ, Debussche M, editors. Biological invasions in Europe and the Mediterranean Basin. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1990. p. 307–32.
- [10] Cheng TC. Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF, editors. Invertebrate blood cells I. London: Academic Press; 1981. p. 233–99.
- [11] Fisher SW. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin M, editor. Immunity in invertebrates. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1986. p. 25–35.

- [12] Cheng TC. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble F, editors. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. College Park: Maryland Sea Grant College; 1996. p. 299–333.
- [13] Pipe RK. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol 1992;16:111–22.
- [14] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. J Invertebr Pathol 1997;70:96–105.
- [15] Cheng TC, Rodrick GE. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Comp Biochem Physiol B 1975;52:443–7.
- [16] Moore CA, Gelder SR. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). Trans Am Microsc Soc 1985;104:242–9.
- [17] Torreilles J, Guerin MC, Roch P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. Dev Comp Immunol 1997;21:267–75.
- [18] Gelder SR, Moore CA. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign material within hemocytes of *Mercenaria mercenaria*. Trans Am Microsc Soc 1986;105:51–8.
- [19] Beckmann N, Morse MP, Moore CM. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. J Invertebr Pathol 1992;59:124–32.
- [20] Alvarez MR, Friedl FE, Johnson JS, Hinsch GW. Factors affecting in vitro phagocytosis by oyster hemocytes. J Invertebr Pathol 1989;54:233–41.
- [21] Cheng W, Chen JC. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol 2000;10:387–91.
- [22] Hegaret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. J Exp Mar Biol Ecol 2003;293:249–65.
- [23] Robillard S, Beauchamp G, Lallier M. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2003;135:49–59.
- [24] Fisher SW. Environmental influence on host response: environmental influence on bivalve hemocyte function. Am Fisheries Soc Spec Publ 1988;18:225–37.
- [25] Fisher WS, Auffret M, Balouet G. Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. Aquaculture 1987;67:179–90.
- [26] Auffret M, Oubella R. Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. In: Stolen JS, Fletcher TS, editors. Modulators of fish immune responses. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications; 1994. p. 23–32.
- [27] Fisher WS, Newell RIE. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole 1986;170:122–34.
- [28] Chu F-LE, La Peyre JF. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: Temperature effects. Dis Aquat Org 1993;16:223–34.
- [29] Chu F-LE, La Peyre JF, Burrenson CS. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity effects. J Invertebr Pathol 1993;62:226–32.
- [30] Goedken M, De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol 2004;16:539–52.
- [31] Xue QG, Renault T, Chiltonczyk S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol 2001;11:557–67.
- [32] Sauve S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. Ecotoxicol Environ Safety 2002;52:21–9.
- [33] Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y, Brousseau P. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. Toxicology 2001;161:201–11.
- [34] Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapegue S, Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. Curr Pharm Des 2003;9:193–9.
- [35] Fisher SW, Ford SE. Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. Am Fisheries Soc Spec Publ 1988;18:286–91.
- [36] Hegaret H, Wikfors GH, Soudant P. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. J Exp Mar Biol Ecol 2003;293:237–48.
- [37] Soletchnik P, Faury N, Razet D, Gouletquier P. Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. Hydrobiologia 1998;386:131–46.
- [38] Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis Aquat Org 2003;56:249–58.
- [39] Grizel H. Quelques exemples d'introduction et de transferts de mollusques. Rev Sci Techn Office Int Epizooties 1996;15:401–8.
- [40] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol 2004;16:501–12.

- [41] Chu F-LE, Hale RC. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Mar Environ Res 1994;38:243–56.
- [42] Chu F-LE, La Peyre JF. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. Dis Aquat Org 1993;16:223–34.
- [43] Anderson RS, Burreson EM, Paynter KT. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* Infected with *Perkinsus marinus*. J Invertebr Pathol 1995;66:82–9.
- [44] Chou H-Y, Li H-J, Lo C-F. Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. Fish Pathol 1994;29:171–5.
- [45] Le Deuff RM, Renault T, Gerard A. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Org 1996;24:149–57.
- [46] Renault T, Le Deuff RM, Cochennec N, Maffrat P. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France — comparative study. Rev Méd Vét 1994;145:735–42.
- [47] Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis Aquat Org 2004;59:249–62.

III Effets de polluants sur les paramètres hématocytaires (Article 2)

Article 2 : Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry (Cell Biology and Toxicology, sous presse)
(cité dans le texte comme « Gagnaire *et al.*, sous presse a »)

Cet article rapporte les résultats des tests de polluants sur des hématocytes maintenus *in vitro*. Les polluants testés ont été choisis comme les plus représentatifs de ceux présents dans l'environnement, mais également en fonction de leur potentiel immunotoxique décrit dans la littérature (chez les bivalves ou d'autres espèces animales). Une large gamme de molécules comprenant plusieurs représentants de plusieurs familles de polluants (pesticides, PCBs, HAPs) ainsi qu'un mélange de huit pesticides a été testé. Parmi toutes les molécules testées, plusieurs ont eu des effets sur les paramètres hématocytaires. Plusieurs HAPs (BaP, phénanthrène, anthracène) diminuent la mortalité hématocytaire, le pourcentage de cellules positives pour les estérases et les lysosomes et augmentent le pourcentage de granulocytes. Le PCB 77 induit une diminution de la présence de lysosomes. Le 2,4-D augmente la mortalité cellulaire. Le paraoxon provoque une diminution des pourcentages de cellules positives pour les estérases et les lysosomes et une augmentation de la production d'EOR. Le chlorothalonil induit une augmentation de la mortalité et du pourcentage de granulocytes et une diminution du pourcentage de cellules positives pour les estérases. Le mélange de huit pesticides (atrazine, diuron, glyphosate, alachlore, métolachlore, terbuthylazine, carbaryl, fosétyl-aluminium) augmente la phagocytose.

Sur les 23 molécules testées, au moins une molécule appartenant à chaque groupe de polluants (HAPs, PCBs, herbicides, insecticides, fongicides) a modulé un ou plusieurs paramètres hématocytaires. De plus, le mélange de pesticides testé a eu un effet alors que les huit molécules testées individuellement n'en ont pas provoqué. Ce résultat met en évidence l'importance de travailler sur des mélanges de polluants, car il peut exister des effets synergiques ou antagonistes. De plus, ces conditions se rapprochent davantage de ce qui existe dans l'environnement, où les animaux sont confrontés à des mélanges de polluants de natures diverses.

Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry

B. Gagnaire¹, H. Thomas-Guyon², Th. Burgeot³ and T. Renault¹

¹IFREMER La Tremblade, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), La Tremblade; ²Université de La Rochelle, Laboratoire de Biologie et Environnement Marin (LBEM) FRE 2727, La Rochelle;

³IFREMER, Département Polluants chimiques, Nantes, France

Received 25 May 2005; accepted 22 August 2005

Keywords: cellular activities, flow cytometry, hemocytes, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, PAHs, PCBs, pesticides, toxicity

Abstract

The shellfish industry is an important economic activity in France, occurring mostly in estuarine zones subject to pollution due to anthropogenic activities. The harmful effects of pollutants on species inhabiting these estuarine zones are not well known. Among marine species, bivalve mollusks—particularly Pacific oyster, *Crassostrea gigas*—may serve a model of interest. The species is sedentary and filter-feeding, which favors bioaccumulation of pollutants in their tissues. Oysters may be suitable for studies on disturbance by pollutants of physiological activities, among which defense mechanisms are poorly documented in bivalves. In this study, effects of pollutants on hemocyte functions were monitored in Pacific oyster, *C. gigas*. Hemocytes were exposed *in vitro* to selected pollutants. The strategy for investigating the effects of pollutants on hemocyte function is based on several biomarkers, which is more relevant than that of published papers based on single-endpoint experiments. Pollutants belonging to the most important groups of xenobiotics (PAHs, PCBs, and pesticides) were selected and their effect on hemocyte activities was analyzed using flow cytometry. Twenty-three pollutants were tested and eight of them showed significant modulation of hemocyte activities. PAHs and PCB 77 induced a decrease of hemocyte activity after an incubation periods of 4 and 24 h at 200 µmol/L. Three pesticides (2,4D, paraoxon, and chlorothalonil) modulated hemocyte activities. A mixture of eight pesticides also decreased phagocytotic activity. This study is one of the first to investigate the effects of so many pollutants on hemocyte function at the same time and therefore allows a real comparison of different pollutant effects.

Abbreviations: ASW, artificial seawater; BaP, benzo(a)pyrene; DHR123, dihydrorhodamine 123; 2,4D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; FDA, fluorescein diacetate; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs, polychlorinated biphenyls; PCP, pentachlorophenol; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species

Introduction

Shellfish farming is an ancestral activity in France. It has been developed intensively over the last

century and now represents a major economic activity. The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the most cultivated species, introduced in France in the 1970s after the decline of the Portuguese

oyster, *C. angulata* (Grizel and Heral, 1991). This species is mostly reared in estuarine zones under the continual threat posed by contamination with pollutants. Natural and synthetic foreign compounds (xenobiotics) enter and are dispersed in aquatic ecosystems by various routes, including direct discharge, land run-off, atmospheric deposition, *in situ* production, abiotic and biotic movements, and food-chain transfer (Livingstone, 1998). Xenobiotics include polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), pesticides, and heavy metals. Many of these compounds come from anthropogenic activities including industry, fuel transport, and agriculture.

Bivalve mollusks are often used as sentinel organisms in invertebrate immunotoxicology. Their worldwide distribution, their sedentary mode of life, and their filter-feeding behavior, susceptible bioaccumulation of pollutants make them ideal species for the assessment of environmental pollution (Wade et al., 1998; Wootton et al., 2003). Study of the modulation of the immune system, or immunomodulation, in marine mollusks has become one of the most important ways of evaluating the physiological effects of environmental factors (Oubella and Auffret, 1995). Physiological responses of bivalve mollusks to environmental and biological stresses are mediated, in part, by hemocytes circulating within the open vascular system and across epithelial boundaries (Cheng, 1981). Hemocytes are responsible for recognition, phagocytosis, and elimination by oxidation of nonself particles, including viruses, bacteria, and parasites (Cheng, 1981). In bivalve mollusks, it has been well established that hemocytes can be affected by environmental factors such as stress (Lacoste et al., 2002) or pathogens (Oubella et al., 1993; Anderson et al., 1995). In past decades, emerging diseases have been reported in marine species and outbreaks of disease have also increased considerably (Harvell et al., 1999). Anthropogenic compounds may be partly responsible by depressing defensive capacities of host animals and therefore increasing susceptibil-

ity to infections, as proposed by several authors (Coles et al., 1994; Pipe and Coles, 1995). Studies have demonstrated effects of PAHs (Coles et al., 1994; Pipe and Coles, 1995), PCBs (Pipe et al., 1995; Canesi et al., 2003), pesticides (Tripp, 1971; Auffret and Oubella, 1997), heavy metals (Cheng et al., 1987; Auffret et al., 2002; Gagnaire et al., 2004), and contaminated sediments (Sami et al., 1993; Oliver et al., 2001) on whole oysters or directly on hemocyte activities.

Flow cytometry is a routine tool in vertebrate biomedical research and it has been applied more recently to marine invertebrate research. This powerful tool has been used to characterize hemocyte population characteristics in oysters (Xue et al., 2001; Goedken and De Guise, 2004) or changes associated with environmental contaminants (Fournier et al., 2001; Sauve et al., 2002b). In the present work, we investigated the *in vitro* effects of 23 xenobiotics on several hemocyte activities of Pacific oyster, *C. gigas*, using flow cytometry. This is one of the first study to investigate the effect of so many pollutants on hemocyte functions at the same time and therefore allows a real comparison of different pollutant effects. The strategy of using several biomarkers is more relevant than that of published papers based on single-endpoint experiments. The first step of the study focused on optimization of incubation conditions for the subsequent *in vitro* experiments. Toxic molecules were selected from among the major groups of xenobiotics: 5 PAHs, 2 PCBs and 16 pesticides (7 herbicides, 6 insecticides, 2 fungicides and pentachlorophenol (PCP)). Concentrations ranging from 7 pmol/L to 500 µmol/L were used for observation of rapid effects of toxic compounds on oyster hemocytes. The resulting data were based on autofluorescence light scattering parameters related to size and internal complexity (granularity). Cellular activities were monitored using appropriate fluorescent markers with respect to cell mortality, esterase activity, production of reactive oxygen species (ROS), presence of lysosomes, and phagocytosis.

Material and methods

Oysters

Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, with a shell length of 7–10 cm, were produced in the IFREMER hatchery of La Tremblade laboratory (Charente-Maritime, France) in February 2002. They were held at Bouin (IFREMER, Vendée, France). Analyses were performed from August to December 2003.

Hemocyte collection

Hemolymph was collected from the posterior adductor muscle sinus, with the use of a 1 ml syringe equipped with a needle (0.9 × 25 mm) after breaching the shell using a pincers. For each oyster, 1–1.5 ml of hemolymph was collected. Hemolymph samples were filtered on a 60 µm mesh to eliminate debris and then maintained on ice to avoid aggregation. Hemocytes from 10 oysters were pooled to reduce inter-individual variation and to provide enough hemocytes for the various exposure protocols. After pooling, hemocytes were counted on a Malassez cell.

Preliminary experiments

Cell treatments. Collected hemocytes were subjected to three different treatments and cell concentration was adjusted to 10⁶ cells/ml. One pool received a volume of artificial seawater to adjust cell concentration (treatment 1). The second pool was centrifuged (260g, 15 min, 4°C, Microfuge 12, Beckman) and cells were resuspended in artificial seawater (ASW, Lewis composition; for 1 L distilled water: 234 g NaCl, 15 g KCl, 12 g MgSO₄·4H₂O, 1.5 g CaCl₂·2H₂O, 1.5 g CaCl₂ anhydrous; use at dilution 1/10) (treatment 2). The third pool was centrifuged (260g, 15 min, 4°C, Microfuge 12, Beckman), supernatant (serum) was filtered, and the cell pellet was then resuspended in the 0.22 µm-filtered serum (treatment 3). Experiments were performed three times at

15°C or 20°C for 4 h and 24 h. Cell mortality was monitored using flow cytometry as described under “Flow cytometry analysis” below.

Effect of temperature and incubation time on hemocyte activities. For all these experiments, cell concentration was adjusted to 10⁶ cells/ml by addition of ASW without centrifugation (treatment 1). Different temperatures (10°C, 15°C, or 20°C) and incubation periods (4, 24, 48, and 72 h) were tested. Experiments were performed three times. Cell mortality and esterase activity were monitored using flow cytometry as described below.

Xenobiotics

Twenty-three xenobiotics were selected on the basis of their immunotoxic potential for invertebrate models described in the literature. They belonged to five families of xenobiotics: PAHs (benzo(*a*)pyrene (BaP), phenanthrene, pyrene, anthracene, fluoroanthene), PCBs (PCB 77, PCB 153), herbicides (metolachlor, alachlor, terbutylazine, glyphosate, diuron, atrazine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D)), insecticides (DDT, carbofuran, chlordane, dieldrin, paraoxon, carbaryl) and fungicides (chlorothalonil, fosetyl aluminum). Pentachlorophenol (PCP) is a pesticide (herbicide, insecticide, and fungicide). A mixture of 8 pesticides (carbaryl, fosetyl aluminum, alachlor, metolachlor, terbutylazine, atrazine, diuron and glyphosate) was also tested. Solvents were used as recommended by the manufactures (Table 1) and final solvent concentration was 0.5% in order to avoid disturbance of hemocyte parameters.

Pyrene, anthracene, fluoranthene, PCB 77, PCB 153, PCP, 2,4D, DDT, chlorodane, dieldrin, paraoxon and chlorothalonil were purchased from Fluka (Sigma-Aldrich). The eight compounds composing the pesticide mixture were purchased from LGC Promochem. BaP, phenanthrene and chlordane were kindly provided by J. Faucet

Table 1. For the 23 pollutants tested individually and the pesticide mixture. Final concentrations of the pollutants in presence of hemocytes and the solvents used are presented

PAH					PCB			
BaP (DMSO)	Phenanthrene (DMSO)	Pyrene (CH)	Anthracene (CH)	Fluoranthene (CH)	PCB 77 (TMP)	PCB 153 (TMP)		
200 µmol/L	300 µmol/L	2.5 µmol/L	180 µmol/L	500 µmol/L	60 µmol/L	70 µmol/L		
20 µmol/L	30 µmol/L	250 nmol/L	18 µmol/L	50 µmol/L	6 µmol/L	7 µmol/L		
2 µmol/L	3 µmol/L	25 nmol/L	1.8 µmol/L	5 µmol/L	600 nmol/L	700 nmol/L		
200 nmol/L	300 nmol/L	2.5 nmol/L				70 nmol/L		
20 nmol/L	30 nmol/L	250 pmol/L						
2 nmol/L	3 nmol/L							
Pesticides				Herbicides				
PCP (MeOH)	Metolachlor (A80)	Alachlor (A80)	Terbutylazine (A80)	Glyphosate (H ₂ O)	Diuron (A80)	Atrazine (A80)	2,4 D (AN)	
2 µmol/L	7 µmol/L	7 µmol/L	26 µmol/L	12 µmol/L	17 µmol/L	30 µmol/L	450 µmol/L	
200 nmol/L	700 nmol/L	700 nmol/L	2.6 µmol/L	1.2 µmol/L	1.7 µmol/L	3 µmol/L	45 µmol/L	
20 nmol/L	70 nmol/L	70 nmol/L	260 nmol/L	120 nmol/L	170 nmol/L	300 nmol/L	4.5 µmol/L	
2 nmol/L	7 nmol/L	7 nmol/L	26 nmol/L	12 nmol/L	17 nmol/L	30 nmol/L		
200 pmol/L	700 pmol/L	700 pmol/L	2.6 nmol/L	1.2 nmol/L	1.7 nmol/L	3 nmol/L		
20 pmol/L	70 pmol/L	70 pmol/L	260 pmol/L	120 pmol/L	170 pmol/L	300 pmol/L		
Insecticides					Fungicides			
DDT (MeOH)	Carbofuran (A80)	Chlordane (AN)	Dieldrin (AN)	Paraoxon (CH)	Carbaryl (A80)	Chlorothalonil (AN)	Fosteyl AI (H ₂ O)	
1.5 µmol/L	120 µmol/L	250 µmol/L	1.3 µmol/L	400 µmol/L	1 µmol/L	200 µmol/L	700 nmol/L	
150 nmol/L	12 µmol/L	25 µmol/L	130 nmol/L	40 µmol/L	100 nmol/L	20 µmol/L	70 nmol/L	
15 nmol/L	1.2 µmol/L	2.5 µmol/L	13 nmol/L	4 µmol/L	10 nmol/L	2 µmol/L	7 nmol/L	
1.5 nmol/L	120 nmol/L	250 nmol/L	1.3 nmol/L		1 nmol/L		700 pmol/L	
150 pmol/L	12 nmol/L				100 pmol/L		70 pmol/L	
15 pmol/L	1.2 nmol/L				10 pmol/L		7 pmol/L	
Pesticide mixture								
	Carbaryl	Fosteyl AI	Alachlor	Metolachlor	Terbutylazine	Atrazine	Diuron	Glyphosate
6	1 µmol/L	700 nmol/L	7 µmol/L	7 µmol/L	26 µmol/L	30 µmol/L	17 µmol/L	12 µmol/L
5	100 nmol/L	70 nmol/L	700 nmol/L	700 nmol/L	2.6 µmol/L	3 µmol/L	1.7 µmol/L	1.2 µmol/L
4	10 nmol/L	7 nmol/L	70 nmol/L	70 nmol/L	260 nmol/L	300 nmol/L	170 nmol/L	120 nmol/L
3	1 nmol/L	700 pmol/L	7 nmol/L	7 nmol/L	26 nmol/L	30 nmol/L	17 nmol/L	12 nmol/L
2	100 pmol/L	70 pmol/L	700 pmol/L	700 pmol/L	2.6 nmol/L	3 nmol/L	1.7 nmol/L	1.2 nmol/L
1	10 pmol/L	7 pmol/L	70 pmol/L	70 pmol/L	260 pmol/L	300 pmol/L	170 pmol/L	120 pmol/L

Solvents: DMSO, dimethyl sulfoxide; CH, cyclohexane; TMP, trimethylpentane; AN, acetonitrile, A80, ethanol 80%; MeOH, methanol. For the pesticide mixture, numbers 1 to 6 correspond to different concentrations of the mixture, and concentrations of the eight components are indicated.

(IFREMER Nantes) and F. Quiniou (IFREMER Brest).

Exposure protocol

For all exposure experiments, hemocyte concentration was adjusted to 10^6 cells/ml by addition of ASW without centrifugation (treatment 1). Pollutants were added individually at $5 \mu\text{l}$ per ml of hemocyte suspension. In each experiment, the same volume of corresponding solvent was used as negative control. Six concentrations were tested for BaP, phenanthrene, PCP, metolachlor, alachlor, terbutylazine, glyphosate, diuron, atrazine, DDT, carbofuran, carbaryl, fosteal aluminum, and the pesticide mixture (Table 1), five concentrations for pyrene (Table 1) and four concentrations for PCB 153, chlordane and dieldrin (Table 1). In addition, three concentrations were tested for anthracene, fluoranthene, PCB 77, 2,4D, paraoxon, and chlorothalonil (Table 1). Hemocytes were incubated at 15°C . Analyses were carried out after a 4 and 24 h incubation periods, except for paraoxon and chlorothalonil for which analyses was carried out only after a 4 h incubation period. Cell mortality, granulocyte percentage, esterase activity, phagocytosis, production of superoxide anion, and presence of lysosomes were analysed using flow cytometry as described below. Experiments were carried out three times for BaP, phenanthrene, DDT, pesticide mixture, PCP and pyrene, twice for 2,4D, anthracene, chlordane, chlorothalonil, dieldrin, fluoranthene, paraoxon, PCB 77, and PCB 153, and once for each of the eight pesticides composing the mixture.

Flow cytometry analysis

Flow cytometry protocols were as previously described (Gagnaire et al., 2003, 2004). For each sample, 3000 events were counted using an EPICS XL 4 (Beckman Coulter). Results were depicted as cell cytograms indicating cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) and the fluo-

rescence channel(s) corresponding to the marker used. A gate was defined on the basis of FSC value in order to eliminate cell debris. Recorded fluorescence depended on monitored parameters: enzymes, lysosomes, and phagocytosis were measured using green fluorescence, and cell mortality was measured using red fluorescence. Mortality was quantified using $200 \mu\text{l}$ of hemocyte suspension. Hemocytes were incubated in the dark for 30 min at 4°C with $10 \mu\text{l}$ of propidium iodide (PI, 1.0 mg/L , Interchim). The EPICS XL 4 software allows differentiation between supposed populations of granulocytes and hyalinocytes based on their FSC and SSC values. Esterase activity was measured using the nonspecific liposoluble substrate fluorescein diacetate (FDA, Molecular Probes). FDA solution ($1 \mu\text{l}$ of $400 \mu\text{mol/L}$) was added to $200 \mu\text{l}$ of hemocyte suspension. Cells were incubated for 30 min in dark at room temperature and the reaction was stopped on ice (5 min). Presence of lysosomes was measured using a commercial kit (LysoTracker Green DND-26, 1 mmol/L in DMSO, Molecular Probes). A $1 \mu\text{l}$ aliquot of Lyso Tracker was added to $200 \mu\text{l}$ of hemocyte suspension. Cells were incubated for 2 h in the dark at room temperature and the reaction was stopped on ice (5 min). Production of ROS was measured using dihydrorhodamine 123 (DHR123, Molecular Probes), specific for superoxide anion O_2^- . DHR123 solution ($1 \mu\text{l}$ of $145 \mu\text{mol/L}$) was added to $200 \mu\text{l}$ of hemocyte suspension. Cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature and the reaction was stopped on ice (5 min). Phagocytosis was measured by ingestion of fluorescent beads. Hemocyte suspension ($200 \mu\text{l}$) was incubated for 1 h in the dark at ambient temperature with $10 \mu\text{l}$ of a 1/10 dilution of Fluorospheres carboxylate-modified microspheres ($1 \mu\text{m}$ diameter, Interchim).

For esterase activity, ROS, and lysosomes, gates were defined on the cytograms to distinguish different populations according to fluorescence intensity (Figure 1). Events were previously gated in order to analyze only cells and not bacteria or debris. Analysis was performed on the whole

6

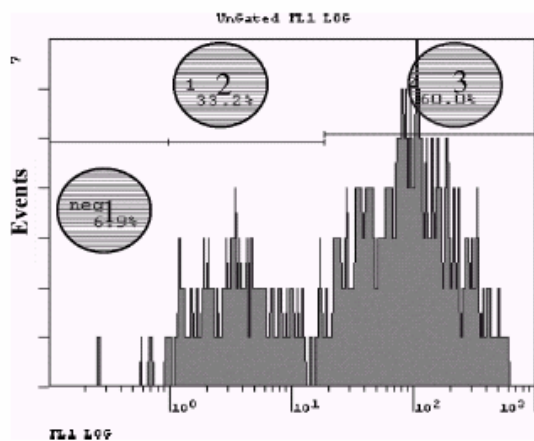


Figure 1. Flow cytometry cytogram of cells stained with FDA. Horizontal-axis, intensity of fluorescence; Vertical-axis, number of cells: (1) population of negative cells; (2) population of moderately stained cells; (3) population of strongly stained cells.

population of cells, live and dead. Gates obtained were similar for all cytograms. Three cell populations were defined: a population of negative cells, a population of moderately stained cells, and a population of strongly stained cells. For these three parameters, further analyses were realized only on the population of strongly stained cells.

Statistical analysis

Results were expressed as percentage of positive cells. Values were converted into r angular arc-sine $\sqrt{(\% \text{ of positive cells})}$ before analysis. Values were normally distributed after transformation. ANOVA analysis was carried out using Statgraphics. Plus version 5.1 software to detect any effect of the tested pollutants. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* test was used. Significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Maintaining hemocytes in vitro

Cell treatments before culture. Among the three treatments, treatment 2 (centrifugation and cells

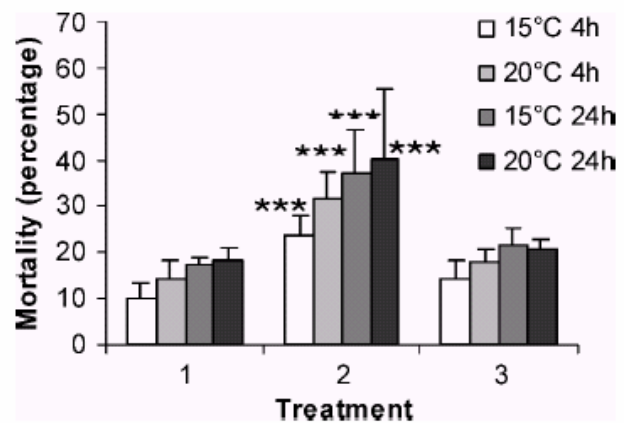


Figure 2. Cell mortality percentage after a 4 h incubation period at 15°C or 20°C. (1) Cells adjusted to 10^6 cells/ml by addition of ASW; (2) cells adjusted to 10^6 cells/ml by resuspension in ASW after centrifugation; (3) cells adjusted to 10^6 cells/ml by resuspension in hemolymph after centrifugation. Values are means of 3 replicates. Bars represent standard error. Asterisks indicate a significant difference (increase) between the three treatments for one given condition (temperature and incubation time); *** $p < 0.001$.

resuspended in ASW) caused the highest mortality ($p < 0.001$) for both temperatures tested after 4 h and 24 h incubation periods (Figure 2). No significant difference was found between treatments for 1 and 3, or for effect of incubation temperature on percentage mortality (Figure 2). Treatment 1 was chosen for xenobiotic exposure.

Effects of temperature and time of culture on hemocyte activities. Cell mortality increased significantly after 48 h and 72 h incubation periods at 15°C compared to 4 h and 24 h. At 20°C, mortality increased significantly after 24 h and 48 h incubation periods compared to 4 h ($p < 0.01$, Figure 3). No variation of percentage mortality was observed at 10°C (Figure 3).

For all temperatures, percentage of esterase-positive cells was significantly lower after 48 h and 72 h incubation periods compared to 4 h and 24 h ($p < 0.01$, Figure 4). Cells incubated at 20°C also showed a significant decrease of positive cell percentage after a 24 h incubation period compared to 4 h ($p < 0.01$, Figure 4).

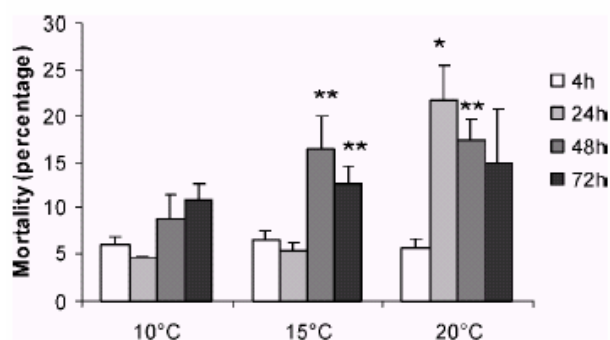


Figure 3. Cell mortality percentage after different incubation periods at 10°C, 15°C, or 20°C. values are means of 3 replicates. Bars represent standard error. Asterisks indicate a significant difference (increase) between the four incubation periods for one given temperature; ** $p < 0.01$.

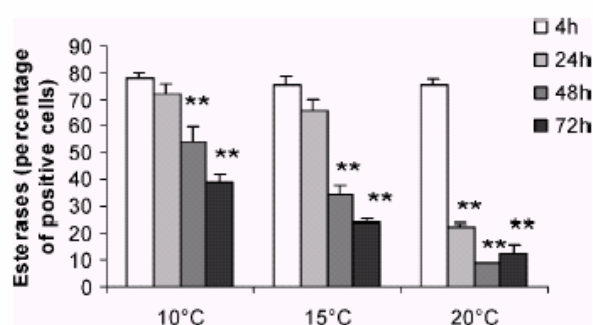


Figure 4. Percentage of esterase-positive cells after different incubation periods at 10°C, 15°C, or 20°C. Values are means of 3 replicates. Bars represent standard error. Asterisks indicate a significant difference between the four incubation periods for one given temperature; ** $p < 0.01$.

On the basis of those results we chose a temperature of 15°C and incubation periods of 4 h and 24 h for further xenobiotic exposures.

Modulations of hemocyte parameters by pollutants

Among the 23 pollutants tested, eight showed significant modulations of at least one hemocyte parameter (Table 2). These eight compounds belong to different families of xenobiotics: four PAH (BaP, phenanthrene, anthracene, fluoranthene), one PCB (PCB 77), herbicide (2,4D), an insecticide (paraoxon) and a fungicide (chlorothalonil). The

pesticide mixture also showed significant effects. However, there was no significant effect of PCP on hemocyte parameters.

PAHs. BaP and phenanthrene had similar effects on hemocyte parameters. They significantly increased granulocyte percentage but significantly decreased cell mortality and esterase- and lysosome-positive cells for the highest concentration tested compared to the control (200 $\mu\text{mol/L}$ for BaP and 300 $\mu\text{mol/L}$ for phenanthrene) after 4 h and 24 h incubation periods (Table 2). Anthracene at 180 $\mu\text{mol/L}$ induced similar effects to BaP and phenanthrene, except for a decrease of cell mortality after a 24 h incubation period ($p < 0.01$, Table 2) and of esterase- and lysosome-positive cell percentage after a 4 h incubation period ($p < 0.01$, Table 2). Fluoranthene significantly decreased esterase-positive cells only at 500 $\mu\text{mol/L}$ after a 4 h incubation period compared to control ($p < 0.05$, Table 2). Values for the negative control for both BaP and phenanthrene ranged between 66% and 70% after a 4 h incubation period and decreased significantly to 43.9% with 200 $\mu\text{mol/L}$ BaP and to 11.1% with 300 $\mu\text{mol/L}$ phenanthrene ($p < 0.01$, Figure 5). After a 24 h incubation period, values for controls for both pollutants were 27% and decreased to 16.8% with 200 $\mu\text{mol/L}$ BaP and to 2% with 300 $\mu\text{mol/L}$ phenanthrene (Figure 5).

PCBs. PCB 77 significantly decreased lysosome-positive cell percentage at 6 $\mu\text{mol/L}$ and 60 $\mu\text{mol/L}$ after a 4 h incubation period compared to control ($p < 0.05$, Table 2).

Herbicides. The presence of 2,4D increased cell mortality at the highest concentration of 450 $\mu\text{mol/L}$ after a 4 h incubation period compared to control ($p < 0.05$, Table 2). The value was 7.8% in the control and increased to 11.8% with 450 $\mu\text{mol/L}$ 2,4D (Figure 6).

Insecticides. Paraoxon exposure significantly decreased the percentage of esterase-positive

Table 2. Effects of pollutants on *C. gigas* hemocyte activities after an *in vitro* contact. For each pollutant, the concentration (s) and the period(s) of incubation for which an effect of the pollutant was observed are indicated

Group	Compound	Mortality	Granulocytes (percentage)	Esterases	Lysosomes	ROS	Phagocytosis
PAH	BaP	▼200 µmol/L 4 h and 24 h **	▲200 µmol/L 4 h and 24 h **	▼200 µmol/L 4 h and 24 h *	▼200 µmol/L 4 h and 24 h *		
	Phenanthren	▲300 µmol/L 4 h and 24 h *	▲300 µmol/L 4 h and 24 h *	▼300 µmol/L 4 h and 24 h *	▼300 µmol/L 4 h and 24 h **		
	Anthracen	▼180 µmol/L 24 h *	▲180 µmol/L 4 h and 24 h **	▼180 µmol/L 4 h **	▼180 µmol/L 4 h **		
	Fluoranthen			▼500 µmol/L 4 h *			
PCB	PCB 77				▼6 µmol/L and 60 µmol/L 4 h *		
Herbicides	2,4D	▲450 µmol/L 4 h *					
Insecticides	Paraoxon			▼400 µmol/L 4 h and 24 h **	▼40 µmol/L and 400 µmol/L 24 h **	▼400 µmol/L 4 h *	
Fungicides	Chlorohalonil	▲2 µmol/L 4 h *	▲200 µmol/L 4 h **	▼200 µmol/L 4 h *			
Pesticides	Pesticide mixture						▲ cc = 6 4 h *

▲ = increase; ▼ = decrease. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

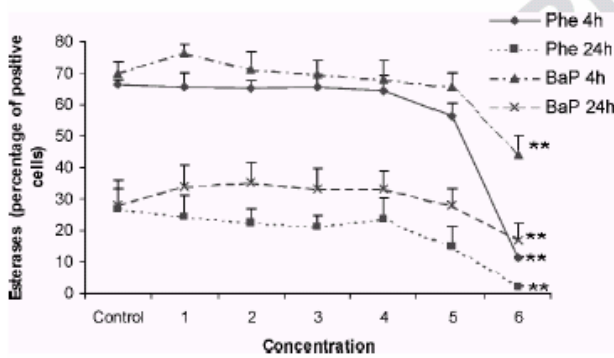


Figure 5. Percentage of esterase-positive cells after 4 h and 24 h incubation periods with increasing concentrations of BaP or phenanthrene (Phe). BaP:(1)2 nmol/L; (2) 20 nmol/L; (3) 200 nmol/L; (4) 2 µmol/L; (5) 20 µmol/L; (6) 200 µmol/L. Phe:(1) 3 nmol/L; (2) 30 nmol/L; (3) 300 nmol/L; (4) 3 µmol/L; (5) 30 µmol/L; (6) 300 µmol/L. Values are means of 3 replicates. Bars represent standard error. ** $p < 0.01$.

cells after 4 h and 24 h incubation periods at 400 µmol/L compared to control ($p < 0.01$, Table 2). A similar effect was found on percentage of lysosome-positive cells at 40 µmol/L and

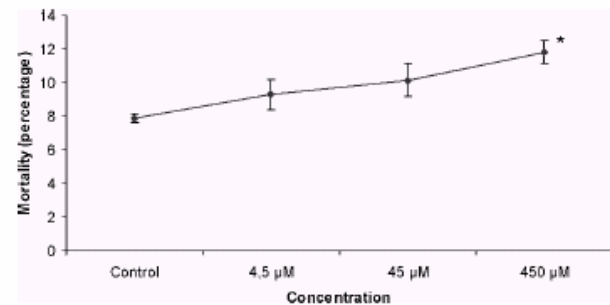


Figure 6. Cell mortality percentage after a 4 h incubation period with increasing concentrations of 2,4D. Values are means of 2 replicates. Bars represent standard error. * $p < 0.05$.

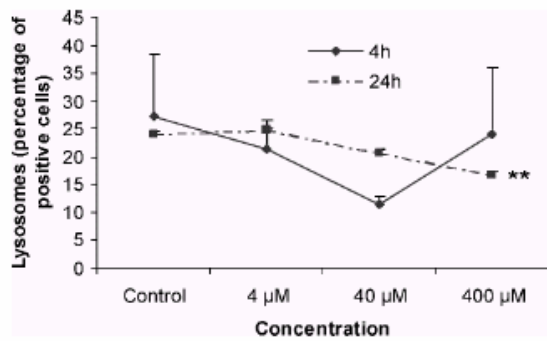


Figure 7. Percentage of lysosome-positive cells after 4 h and 24 h incubation periods with increasing concentrations of paraoxon. Values are means of 2 replicates. Bars represent standard error. ** $p < 0.01$.

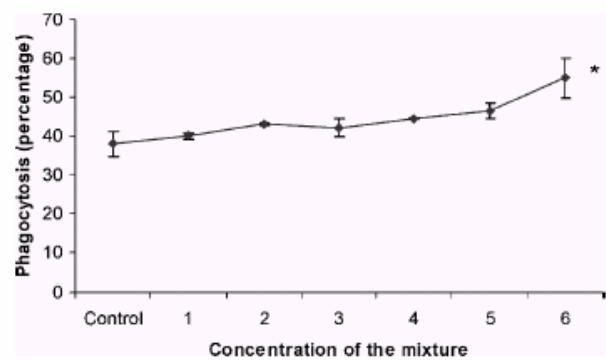


Figure 8. Percentage phagocytosis after a 4 h incubation period with increasing concentrations of the pesticide mixture. See Table 1 for the different concentrations of the eight pesticides in the mixture. Values are means of 3 replicates. Bars represent standard error. * $p < 0.05$.

400 µmol/L but only after a 24 h incubation period ($p < 0.01$, Table 2). ROS-positive cell percentage increased significantly at 400 µmol/L after a 4 h than after a 24 h incubation period ($p < 0.05$, Table 2). Percentages of lysosome-positive cells were 24% in the negative control and decreased to 16.7% at 400 µmol/L after a 24 h incubation period (Figure 7). However, no significant effect was reported after a 4 h incubation period (Figure 7).

Fungicides. The presence of chlorothalonil significantly increased cell mortality at 2 µmol/L ($p < 0.05$) and granulocyte percentage at 200 µmol/L ($p < 0.01$) and significantly decreased esterase-positive cells percentage at 200 µmol/L ($p < 0.05$) after a 4 h incubation period (Table 2).

Pesticide mixture. Exposure to the pesticide mixture significantly increased phagocytosis activity after a 4 h incubation period at the highest concentration tested ($p < 0.05$, Tables 1 and 2). Values increased from 37.9% in the negative control to 54.8% at maximal concentration (Figure 8).

Discussion

In order to allow comparison results, hemocyte concentrations must be adjusted (Brousseau et al.,

2000; Fournier et al., 2001, 2002). However, techniques for cell adjustment are poorly documented. Our results showed that cell resuspension in ASW after centrifugation increased cell mortality. Cellular parameters including esterase activity were modified by centrifugation and were dependent on the medium used for cell resuspension (data not shown). For immunotoxicity studies, modification of cellular activities must due only pollutant tested and not to culture conditions. We thus added ASW to adjust cell concentration. Under these conditions, no change in cell parameters was observed.

In experiments concerning the effects of temperature and time of incubation on hemocyte activities, esterase activities decreased as cell mortality increased. This has been reported previously for phagocytosis and cell viability (Brousseau et al., 2000). Protocols of flow cytometry used in this study are therefore validated and allow also validations of further results on pollutant effects. Lysosomes have been reported to be a valid marker of cell viability (Moore et al., 1978; Lowe et al., 1995; Lowe and Fossato, 2000). A decrease of lysosome-positive cells could also have been related to an increase of cell mortality. However, in these experiments we tested only esterase activity.

In vitro exposure of cells to pollutants may provide an approach to evaluation of pollutant toxicity, although several mechanisms, including

mucus in the mantle cavity or alimentary canal, may be involved in the toxicity of pollutants under *in vivo* conditions (Fisher et al., 1987). *In vitro* conditions are frequently used for the assessment of pollutant toxicity in bivalve hemocytes (Larson et al., 1989; Alvarez and Friedl, 1992; Anderson et al., 1992; Baier-Anderson and Anderson, 2000; Brousseau et al., 2000; Gagnaire et al., 2004).

This study confirmed significant effects of PAHs on hemocyte viability. Our results also revealed that PAHs significantly decreased lysosomes and esterases. This is in accordance with literature reports (Wootton et al., 2003). Lysosomes appeared to be one of the most important target of PAHs (Moore et al., 1978; Lowe et al., 1995). There are reports that PAHs increased the release of peroxidase and ROS production, both mechanisms occurring in oxidative burst (Coles et al., 1994; Gomez-Mendikute et al., 2002). Our results did not support this hypothesis. However, our detection method permits quantification only of superoxide anion, O_2^- , but not of all components of the oxidative burst. Moreover, as PAHs significantly decreased lysosomes and esterases, we hypothesize that hydrolytic enzymes, which also act in oxidative burst, may be affected by PAHs. Granulocyte percentages were increased in the presence of PAHs. We can hypothesize that percentage of hyalinocytes decreased because they were killed by pollutants. Granulocytes may be more resistant.

We found an effect on PCB 77 on lysosomes but not on ROS release or esterase activity. Some studies have demonstrated the effects of PCBs to be congener-specific (Coteur et al., 2001). In mussels PCBs act on targets corresponding to those found in human neutrophils, i.e. signal transduction pathways involved in the immune response (Canesi et al., 2003). Moreover, PCBs might be more toxic in mixtures (Harper et al., 1995).

Lysosomes appear to be a more generalized target of toxic stress induced by PAHs and PCBs. Lysosomal enzymes are considered to play an important role in invertebrate defense reactions involving bacterial destruction (Moore et al., 1978;

Moore and Gelder, 1985). Their functional impairment may affect host resistance to a pathogen infection (Anderson, 1981).

No effect was detected in this study with PCP. However, a previous study showed that PCP decreased ROS production in *C. virginica* (Baier-Anderson and Anderson, 1996). PCP is an uncoupler of oxidative phosphorylation and has been shown to inhibit NADPH, a component involved in ROS production (Anderson, 1981). The probe used in our study, DHR 123, is for detection of superoxide anion. NADPH production was reported to take place earlier in the oxidative burst mechanism (Anderson, 1981) and our probe may not be an effective indicator of NADPH production.

A previous study reported no effect of atrazine on hemocyte parameters in *C. gigas* (Gagnaire et al., 2003). Here, the range of herbicides tested showed no effects. Herbicides would act on photosynthesis. Studies on herbicides have mostly shown a genotoxic potential of herbicides such as glyphosate (Lioi et al., 1998) and atrazine (Bouilly et al., 2003) in both vertebrates and invertebrates.

Organophosphorus compounds and carbamates including paraoxon and carbaryl are known to be acetylcholinesterase and carboxylesterase inhibitors in vertebrates (Cooreman et al., 1993) and in mussels (Orzetic and Krajnovic-Ozretic, 1992; Galloway et al., 2002). However, cholinesterases in *C. gigas* were insensitive to insecticides (Bocquene et al., 1997). We found a decrease of esterase- and lysosome-positive cell percentages with paraoxon. Esterases measured in this study were nonspecific esterases.

Dieldrin and chlordane induced a decrease of phagocytosis of *C. virginica* hemocytes (Larson et al., 1989). We found no effect on phagocytosis at equivalent concentrations for both compounds. However, the previous authors used chemiluminescence to measure phagocytotic activity.

A few studies have explored effects of fungicides on oysters. Exposure of hemocytes from *C. virginica* to chlorothalonil and triforine induced a decrease of ROS production and of cell viability

and phagocytotic activity (Alvarez and Friedl, 1992; Baier-Anderson and Anderson, 2000). Our results showed effects on percentages of esterase- and lysosome-positive cells at similar concentrations. These compounds thus appear to modulate hemocyte activities.

The pesticide mixture (alachlor, metolachlor, terbutylazine, glyphosate, diuron, atarazine, carbaryl and fosteyl aluminium) is representative of pollutants in the surface waters of the Marennes-Oleron Basin (Charente-Maritime, France). Concentrations of these compounds in the environment are between 0.25 nmol/L and 4 nmol/L (internal report). Interestingly, none of these eight compounds generated significant effects when tested individually on *C. gigas* hemocytes. However, as a mixture, the same compounds increased phagocytotic activity. The vast majority of available toxicity data is related to single substances, not to mixtures. However, in the environment molecules are usually present concomitantly (Moore, 2002). Moreover, a study on joint toxicity of multiple-component triazine mixtures demonstrated that the toxic effects of the mixtures exceeded those of each component alone (Faust et al., 2001). This synergistic effects (or concentration addition) may be enhanced by the fact that the different compounds possess a same specific target, and also by their additional effects on different sites (Faust et al., 2001).

Among the 23 pollutants tested (belonging to five groups of pollutants), at least one compound in each group showed effects on at least one hemocyte parameter. It may therefore be concluded that all groups of pollutants (PAHs, PCBs, herbicides, insecticides, and fungicides) may be hazardous to bivalve defense systems. However, PAHs appeared to be the group inducing more modulations, since four of the five PAHs tested showed significant effects. This work is the first to study such large number of pollutants from different groups on hemocytes of the Pacific oyster, *C. gigas*. However, only one mixture of pesticides was tested. This work needs to be extended by testing mixtures of different pollutants by groups.

Moreover, several of the xenobiotics selected in this study need to be bioactivated in order to become toxic. In this *in vitro* type of exposure, we can never be assured that hemocytes have the ability to perform this activation. It is therefore difficult to compare the toxicity of these chemicals. We may hypothesize that under *in vivo* exposure conditions these xenobiotics could be more toxic.

This study showed that pollutants can increase or decrease hemocyte parameters. However, we cannot conclude whether an increase in a given hemocyte activity is related to a positive or a negative effect on immunity. Hemocytes are involved in other physiological processes (Cheng, 1981; Fisher, 1986) and hemocyte activities are therefore not indicators only of defensive activities. We may hypothesize that an increase or a decrease of hemocyte activities correspond to a perturbation of the immune system and, as other authors have advanced, that pollutants induce modulation of the immune system via toxic effects (Oubella and Auffret, 1995). Moreover, several studies have demonstrated that pollutants can have inhibitory or stimulatory effects depending on the dose (Cheng and Sullivan, 1984; Sauve et al., 2002a). In vertebrates, an increase of phagocytotic activity may be related to an enhancement of cell sensitivity and may lead to the development of autoimmune diseases (Christin et al., 2004). An increase of hemocyte activity is not necessarily related to a better defensive capacity of the organism.

Demonstration of the link between hemocyte parameters and immune activities requires experiments involving exposure to pollutants and pathogens. Several authors have already demonstrated that alteration of hemocyte parameters in bivalves exposed to pollutants could be associated with an increase of disease susceptibility (Chu et al., 2002; Coles et al., 1994, 1995; Fournier et al., 1988; Pipe et al., 1999).

No bivalve cell lines are available and experiments have to be conducted on cells maintained *in vitro* (Anderson, 1994; Brousseau et al., 2000;

Sauve et al., 2002a). Hemocytes are of interest because of their ease of collection.

Among the hemocyte parameters tested, the presence of lysosomes and esterase activity appeared to be the most sensitive. These were modulated by six pollutants. As demonstrated previously, lysosomes are biomarkers of cellular viability (Moore et al., 1978; Lowe and Fossato, 2000; Moore, 2002). The probe used in this study allowed us to measure the presence of lysosomes. We may hypothesize that a high number of lysosomes is correlated with a greater capacity of the cell to respond to insult. A few studies have reported evolution of esterase activity, other involving acetyl- and carboxylesterases (Cooreman et al., 1993).

Production of superoxide anion as measured by DHR123 was affected only by paraoxon. However, this parameter may also be modulated by PAHs (Gomez-Menkikute et al., 2002). Other studies used different methods for flow cytometric measurement of superoxide anion with DCFH-DA (Lambert et al., 2003). Further comparative studies on both of these components are required.

Conclusion

This study is the first to analyze the *in vitro* effects of 23 xenobiotics on six oyster hemocyte parameters. All groups of pollutants had an effect on one or more hemocyte parameters. These results need to be confirmed by *in vivo* experiments in order to demonstrate the effects of these potential immunomodulators in the whole animal.

Acknowledgments

P. Gouletquer is acknowledged for allowing the work at the IFREMER station in La Tremblade (Charente-Maritime, France). Drs. J. Faucet, F. Quiniou and F. G eret are acknowledged for providing some of the pollutants tested and for ordering references. Thanks to Dr. Michel Fournier

for his reading of the manuscript and his advice. This research was partly supported by the Poitou Charentes Region.

References

- Alvarez MR, Friedl FE. Effects of a fungicide on *in vitro* hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 1992;107:135-40.
- Anderson RS. Effects of carcinogenic and noncarcinogenic environmental pollutants on immunological functions in a marine invertebrate. In: Dawe CJ, eds. *Phyletic approaches to cancer*. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press; 1981:319-31.
- Anderson RS. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev Comp Immunol*. 1994;18:89-96.
- Anderson RS, Oliver LM, Jacobs D. Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)): effects on hemocyte chemiluminescence. *J Shellfish Res*. 1992;11:31-5.
- Anderson RS, Bureson EM, Paynter KT. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J Invertebr Pathol*. 1995;66:82-9.
- Auffret M, Oubella R. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol A*. 1997;118:705-12.
- Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C, Moraga D. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar Environ Res*. 2002;54:585-89.
- Baier-Anderson C, Anderson RS. The effect of pentachlorophenol on NADPH production in oyster hemocytes; immunomodulatory consequences. *J Shellfish Res*. 1996;15:498-9.
- Baier-Anderson C, Anderson RS. The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation. Phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environ Res*. 2000;83:72-8.
- Bocquene G, Roig A, Fournier D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett*. 1997;407:261-6.
- Bouilly K, Leitao A, McCombie H, Lapegue S. Impact of atrazine on aneuploidy in pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol Chem*. 2003;22:219-23.
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *My arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology*. 2000;142:145-56.
- Canesi L, Ciacci C, Betti M, et al. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat Toxicol*. 2003;63:293-306.
- Cheng TC. Bivalves. In: Ratcliffe NA and Rowley AF, eds. *Invertebrate blood cells I*. London: Academic Press; 1981:233-99.
- Cheng TC, Sullivan JT. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Mar Environ Res*. 1984;14:305-15.

- Cheng TC, Mohandas A, Sullivan JT. *In vivo* effects of heavy metals on cellular immunity in molluscs. In: Dorigan JV and Harrison FL, eds. Physiological responses of marine organisms to environmental stressors; 1987:59–62.
- Christin MS, Menard L, Gendron AD, et al. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat Toxicol.* 2004;67:33–43.
- Chu FL, Volety AK, Hale RC, Huang Y. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Mar Environ Res.* 2002;53:17–35.
- Coles JA, Farley SR, Pipe RK. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol.* 1994;30:367–79.
- Coles JA, Farley SR, Pipe RK. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis Aquat Organ.* 1995;22:59–65.
- Cooreman K, Roose P, Vyncke W. Screening of organophosphate and carbamate pesticides by cholinesterase inhibition. In: ICES Marine Environmental Quality Committee, eds. ICES Statutory Meeting 1993. Copenhagen: ICES; 1993:1–7.
- Coteur G, Danis B, Fowler SW, Teyssie JL, Dubois P, Warnau M. Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Mar Pollut Bull.* 2001;42:667–72.
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat Toxicol.* 2001;56:13–32.
- Fisher SW. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin M, eds. Immunity in invertebrates. Berlin Heidelberg; Springer; 1986:25–35.
- Fisher WS, Auffret M, Balouet G. Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture.* 1987;67:179–90.
- Fournier M, Chevalier G, Nadeau D, Trotter B, Krzystyniak K. Virus–pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *J Toxicol Environ Health A.* 1988;25:103–18.
- Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y, Brousseau P. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology.* 2001;161:201–11.
- Fournier M, Pellerin J, Lebeuf M, Brousseau P, Morin Y, Cyr D. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat Toxicol.* 200;59:83–92.
- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapegue S, Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes. *Curr Pharm Design.* 2003;9:193–9.
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;16:501–12.
- Galloway TS, Millward N, Browne MA, Depledge MH. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquat Toxicol.* 2002;61:169–80.
- Goedken M, De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;16:539–52.
- Gomez-Mendikute A, Etxebarria A, Olabarrieta I, Cajaraville MP. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res.* 2002;54:431–6.
- Grizel H, Hearl M. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES J Mar Sci.* 1991;47:399–403.
- Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. Immunosuppressive activity of polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: nonadditive (antagonistic) interactions. *Fundam App Toxicol.* 1995;27:131–9.
- Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, et al. Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. *Science.* 1999;285:1505–10.
- Lacoste A, Malham SK, Gelebart F, Cuffe A, Poulet SA. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.* 2002;26:1–9.
- Lambert C, Sodant P, Choquet G, Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 2003;15:225–40.
- Larson KG, Roberson BS, Hetrick FM. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Dis Aquat Organ* 1989;6:131–6.
- Lioi MB, Scarfi MR, Santoro A, et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 1998;403:13–20.
- Lingstone DR. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol.* 1998;120:43–9.
- Lowe DM, Soverchia C, Moore MN. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat Toxicol.* 1995;33:105–12.
- Lowe DM, Fossato VU. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon). *Aquat Toxicol.* 2000;48:75–85.
- Moore CA, Gelder SR. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans Am Microsc Soc.* 1985;104:242–9.
- Moore MN, Lowe DM, Fieth PEM. Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Mar* 1978;48:297–302.
- Moore MN. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquat Toxicol.* 2002;59:1–15.
- Oliver LM, Fisher WS, Winstead JT, Hemmer BL, Long ER. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat Toxicol.* 2001;55:203–22.
- Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ.* 1993;15:193–7.

- Oubella R, Auffret M. Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Brest Roadstead. Acte de Rencontre Scientifique Interantional. 1995;1:307–19.
- Ozretic B, Krajnovic-Ozretic M. Esterase heterogeneity in mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects of organophosphate and carbamate pesticides *in vitro*. Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol. 1992;103:221–5.
- Pipe RK, Coles JA. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 1995;5:581–95.
- Pipe RK, Coles JA, Thomas ME, Fossato VU, Pulsford AL. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. Aquat Toxicol. 1995;32:59–73.
- Pipe RK, Coles JA, Carissan FMM, Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol. 1999;46:43–54.
- Sami S, Faisal M, Huggett RJ. Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar Environ Res. 1993;35:131–5.
- Sauve S, Brousseau P, Pellerin J, et al. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). Aquat Toxicol. 2002a;58:189–200.
- Sauve S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. Ecotoxicol Environ. Safe. 2002b;52:21–9.
- Tripp MR. Effects of organophosphate pesticides on adult oysters (*Crassostrea virginica*). In: Vernberg FJ and Vernberg WB, eds. Pollution and physiology of marine organisms. New York: Academic Press; 1971:225–36.
- Wade TL, Sericano JL, Gardinali PR, Wolff G, Chambers L. NOAA's 'Mussel Watch? Project: current use organic compounds in bivalves. Mar Pollut Bull. 1998;37:20–6.
- Wootton EC, Dyrinda EA, Pipe RK, Ratcliffe NA. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. Aquat Toxicol. 2003;65:13–25.
- Xue QG, Renault T, Chilmoneczyk S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol. 2001;11:557–67.

Address for correspondence: T. Renault, Ifremer La Tremblade, LPG, 17390 La Tremblade, France.
E-mail: trenault@ifremer.fr

UNCORRECTED PROOF

NB : certaines erreurs se sont glissées dans l'édition de l'épreuve présentée ici. Les corrections seront effectuées sur le document final.

Dans le tableau 2, le phénanthrène diminue la mortalité cellulaire (la flèche doit être dirigée vers le bas et non vers le haut) et le paraoxon augmente la production de ROS (EOR) (la flèche doit être dirigée vers le haut et non vers le bas).

IV Discussion

Dans les expériences rapportées dans ce travail, des variations des paramètres hématologiques mesurés en cytométrie de flux ont été rapportées. Il est probable que la variabilité observée entre expérimentations est due pour une grande part à des différences d'état physiologique des individus. La variabilité inter-individuelle est une réalité existant dans tous les modèles d'invertébrés (Pipe *et al.*, 1995a, 1999). Des variabilités inter-individuelles importantes chez les hématocytes de bivalves ont été rapportées (Pipe *et al.*, 1995a; Oubella, 1996; Ashton-Alcox & Ford, 1998). Nous avons choisi de travailler sur des animaux provenant de familles produites en éclosion. Ces productions impliquent un nombre limité de géniteurs, ce qui tendrait à diminuer la variabilité liée à des facteurs génétiques. Cependant, ce choix peut être critiqué, car les populations utilisées ne sont pas représentatives de la diversité observée dans le milieu naturel. Le développement ou l'aménagement de structures pour obtenir et/ou maintenir des animaux dans des conditions contrôlées et standardisées pourrait permettre de réduire cette variabilité. Cependant, peu de données étant disponibles sur les facteurs modifiant les mécanismes de défense et l'état physiologique chez *C. gigas*, il est difficile de déterminer quels sont les facteurs à contrôler en priorité. Le fait de travailler en pools avait également pour objectif de réduire la variabilité. Cependant, il est important de considérer que les hématocytes ponctionnés à un temps donné représentent seulement une fraction de la population hématocytaire totale (Fisher, 1986). Cependant, lors d'analyses en pools, il n'est pas possible de savoir quelle est la contribution relative de chacune des hémolymphes du pool dans les résultats.

Certains facteurs ont été démontrés comme induisant une variabilité chez les bivalves. Une étude rapporte que l'hétérozygotie influe sur la réponse immunitaire chez *M. edulis*, les individus hétérozygotes présentant plus d'hématocytes éosinophiles (Carissan-Lloyd *et al.*, 2004). L'âge des animaux peut également faire varier leur réponse à une exposition aux polluants. Cela a été démontré chez le ver de terre, *Eisenia andrei*, où les jeunes animaux étaient plus sensibles au méthylmercure que les adultes (Sauvé & Fournier, 2005) et chez le medaka japonais, *Oryzias latipes*, où le même résultat a été observé pour les PCBs (Duffy *et al.*, 2002). Une étude rapporte également que les concentrations en différents enzymes varient en fonction du stade (larve trochophore, larve véligère, naissain, adulte) chez *C. gigas* (Luna-Gonzalez *et al.*, 2004). Les animaux plus âgés présentent une sensibilité accrue au stress oxydatif (Banerjee *et al.*, 2001). De plus, il est important de tenir compte de l'état de stress dans lequel se trouvent les cellules ou les animaux au moment de l'expérience. En effet, il a été montré qu'un facteur de stress tel qu'une agitation mécanique peut modifier des activités hématologiques (phagocytose, production d'EOR,

nombre d'hématocytes) liée à une augmentation de la production d'hormones (noradrénaline et dopamine) chez l'ormeau tuberculeux, *Haliotis tuberculata* (Malham *et al.*, 2003) et chez *C. gigas* (Lacoste *et al.*, 2002). Les facteurs de stress peuvent conduire également à une augmentation de la sensibilité aux maladies infectieuses et donc de la mortalité (Lacoste *et al.*, 2001d). Ces stress mécaniques sont couramment rencontrés par des animaux élevés en aquaculture (collecte des naissains, tri, transport d'un parc à un autre).

Cette étude a montré que les polluants peuvent augmenter ou diminuer les paramètres hématocytaires. Cependant, il n'est pas possible de conclure si une augmentation des activités hématocytaires est reliée à un effet positif ou négatif sur l'immunité. En effet, le fait d'avoir des valeurs des paramètres hématocytaires plus élevées pourrait correspondre soit à une plus grande capacité de défense, soit à une stimulation plus importante. Les hématocytes sont des cellules multi-fonctionnelles et elles agissent en particulier dans les processus physiologiques tels que la reproduction (Svardh & Johannesson, 2002), la digestion et le transport de nutriment (Cheng, 1981), la réparation de blessures et de la coquille. Les activités hématocytaires ne sont donc pas seulement des indicateurs des activités immunitaires et des capacités à combattre les pathogènes. Cependant, malgré le manque d'informations concernant l'implication de ces paramètres hématocytaires dans l'immunité, de nombreuses études sur le système de défense des bivalves les utilisent. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une augmentation ou une diminution des activités hématocytaires correspondent à des perturbations du système immunitaire et, comme d'autres auteurs l'ont postulé, que les polluants peuvent induire des modulations du système immunitaire (Oubella & Auffret, 1995). De plus, plusieurs études ont démontré que les polluants peuvent avoir des effets inhibiteurs ou stimulants en fonction de la concentration utilisée (Cheng & Sullivan, 1984; Sauvé *et al.*, 2002). Chez les vertébrés, une augmentation de la phagocytose peut être reliée à une augmentation de la sensibilité des cellules et peut conduire au développement de maladies auto-immunes (Christin *et al.*, 2004). Une augmentation des activités hématocytaires n'est donc pas obligatoirement reliée à une meilleure capacité de défense de l'organisme.

Afin de démontrer le réel lien entre les paramètres hématocytaires et les activités immunitaires, des expériences impliquant des pathologies expérimentales doivent être conduites.

V Conclusion

Les expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'effet de deux facteurs abiotiques, la température et la salinité, sur les activités des hémocytes dans des conditions extrêmes qui, pour certaines, peuvent être rencontrées dans l'environnement par les animaux. Les expériences avec les polluants ont permis de tester un grand nombre de molécules et de montrer les effets de plusieurs d'entre elles sur des paramètres hématocytaires. Ces travaux montrent l'intérêt d'utiliser la cytométrie de flux pour analyser les hémocytes des mollusques bivalves. Cet outil permet d'obtenir rapidement des informations sur plusieurs paramètres cellulaires et il est de plus en plus utilisé dans les études sur l'immunotoxicité (Larson *et al.*, 1989; Alvarez & Friedl, 1992; Anderson *et al.*, 1992b; Baier-Anderson & Anderson, 2000; Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2001; Auffret *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002; Gagnaire *et al.*, 2003, 2004). Du fait de la rapidité de l'analyse, il serait aisé de continuer ces expériences avec d'autres xénobiotiques et également de tester différents mélanges.

Cependant, cette approche ne permet pas de reproduire les événements intervenant dans l'animal dans son milieu naturel. En effet, la physiologie générale de l'huître n'est pas prise en compte. Or, de nombreuses autres activités sont susceptibles de moduler la réponse des hémocytes en présence de conditions stressantes. En outre, certaines molécules toxiques nécessitent une bio-activation par l'organisme avant d'être nocive pour l'animal. Dans le cadre d'expériences *in vitro*, cette bio-activation ne peut pas être réalisée. Le mucus et le manteau peuvent également jouer un rôle dans la toxicité du polluant dans des conditions *in vivo* (Fisher *et al.*, 1987). De plus, dans l'environnement, les polluants peuvent être métabolisés et ces métabolites peuvent être plus toxiques que les molécules-mères. Les expériences *in vitro* doivent donc être complétées par des expériences *in vivo* et *in situ*.

Les expériences *in vitro* montrent qu'il est possible d'observer des effets lorsque les cellules sont en-dehors de leur milieu naturel. Les expériences *in vitro* s'avèrent donc être des modèles puissants pour évaluer les effets toxiques d'une molécule donnée. Les expériences *in vitro* peuvent servir dans un premier temps à orienter les recherches et à sélectionner des conditions stressantes d'intérêt (facteurs naturels ou polluants) pour ensuite les tester *in vivo*. L'objectif suivant est donc de démontrer que les molécules sélectionnées présentent *in vivo* un effet similaire à celui observé en *in vitro*.

Troisième partie

Contamination *in vivo* d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, avec des polluants - Effets des polluants sur la sensibilité aux maladies infectieuses



I Introduction

Les tests de toxicité *in vitro* présentent des limitations dans la surveillance biologique car ils ne permettent pas de prendre en compte les effets de la spéciation chimique dans l'environnement, l'accumulation le long des chaînes alimentaires, les modes d'action des polluants et les réponses physiologiques des animaux.

Les expériences *in vivo* doivent permettre de suivre l'effet des polluants et en particulier de pesticides à l'échelle de l'individu. Elles pourront permettre de confirmer des effets précédemment observés dans les expériences *in vitro*. Les expériences *in vivo* fournissent les meilleures informations pour l'évaluation de l'état immunitaire d'un animal (Wong *et al.*, 1992). Dans ce travail, les concentrations testées sont plus proches de celles rencontrées dans le milieu (Léonard, 2002) et plus faibles que celles utilisées lors des expériences réalisées *in vitro*. L'un des objectifs des expériences *in vivo* est également de montrer qu'une modulation des paramètres hématocytaires sélectionnés peut se traduire par une diminution des activités de défense face à des organismes pathogènes. Ceci permettrait de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse aux infections chez l'huître creuse, *C. gigas*.

Dans le premier chapitre, les expériences *in vivo* ont permis d'étudier l'influence de la température et de la salinité sur les paramètres hématocytaires.

Ensuite, les expériences ont porté sur l'effet de polluants. Dans le deuxième chapitre, le diuron a été testé dans le cadre d'une expérience commune avec l'équipe de Génétique du LGP. Dans le troisième chapitre, un mélange de pesticides à des concentrations retrouvées dans le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime) a été étudié. Des expériences préliminaires réalisées à la station IFREMER Bouin (Vendée) avaient utilisé le même mélange de pesticides, et les résultats avaient montré des effets sur les paramètres hématocytaires. Ce mélange a été ensuite étudié à La Tremblade, afin de confirmer les effets observés sur les hématocytes. Dans le cadre de ces expériences, un certain nombre de gènes susceptibles d'intervenir dans le mécanisme de phagocytose ont été sélectionnés. Leur expression a été suivie en RT-PCR semi-quantitative et en PCR en temps réel dans les animaux contaminés en comparaison aux témoins. Le but de ces expériences était d'établir un modèle reproductible de contamination et d'affaiblissement de l'organisme afin de pouvoir étudier le lien entre polluants et sensibilité aux maladies.

Afin de comparer les résultats obtenus dans un autre modèle, le même genre d'expériences a ensuite été conduit avec du chlorure de mercure (cf quatrième chapitre). L'expression de gènes pouvant être

impliqués dans la phagocytose a également été suivie chez les animaux contaminés en comparaison aux témoins.

Enfin, dans le cinquième chapitre, l'influence des pesticides sur la sensibilité de *C. gigas* aux maladies infectieuses a été étudiée grâce à un modèle d'infection expérimentale des huîtres par un mélange de deux bactéries du genre *Vibrio*. Ces bactéries ont été isolées d'huîtres ayant subi des mortalités. Dans ces expériences, le suivi de la mortalité et de l'expression des gènes a été réalisé après contamination des huîtres par les pesticides et injection des bactéries. Dans le cadre de ces expériences, les pesticides sont utilisés comme une source d'affaiblissement de l'organisme pouvant agir sur la réponse de l'huître à une infection.

II Effets *in vivo* de la température et de la salinité sur les paramètres hématocytaires

Ces résultats ont été publiés dans l'Article 1 présenté précédemment (cf deuxième partie, II : Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg))

Après avoir démontré les effets de la température et de la salinité dans le cadre d'expériences *in vitro*, des expériences *in vivo* impliquant ces deux facteurs abiotiques ont été réalisées afin de valider les résultats obtenus.

Après une exposition de 4 h en émersion à différentes températures, la mortalité cellulaire augmente à 40°C, 50°C et 60°C, la phagocytose diminue à 60°C et le pourcentage de cellules positives pour les estérases diminue à 4°C et 60°C. Après une exposition de sept jours à trois conditions de salinité (contrôle, hypo- et hyper salinité), la phagocytose augmente pour les deux conditions extrêmes (15 ‰ et 45 ‰) dès trois jours de contact. Des salinités de 5 ‰ et 60 ‰ provoquent quant à elles une mortalité des huîtres dès trois jours d'exposition.

Ces résultats sont à intéressants car les conditions de température testées peuvent être rencontrées en milieu naturel. Les conditions de salinité ayant eu des effets sur les huîtres sont quant à elles plus éloignées de réelles conditions environnementales. Les huîtres ne paraissent pas être capables de s'acclimater à des salinités très éloignées des valeurs qu'elles peuvent rencontrer sur le terrain.

Ces résultats peuvent apporter des informations dans la compréhension des mécanismes de développement des infections. En effet, le développement de maladies infectieuses dans des conditions naturelles a été associé à des variations de température et/ou de salinité. Ces deux facteurs abiotiques peuvent temporairement affecter la capacité des hémocytes à combattre les pathogènes et peuvent également jouer un rôle sur la croissance des agents infectieux (Fisher *et al.*, 1987; Chu & La Peyre, 1993; Chu *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1994; Chu & Hale, 1994; Anderson *et al.*, 1995).

III Contamination *in vivo* d'huîtres creuses, *C. gigas*, avec du diuron

Le diuron est un herbicide utilisé pour le contrôle de l'émergence des mauvaises herbes en agriculture. Depuis l'interdiction de l'atrazine et de la terbuthylazine en 2003, il est de plus en plus utilisé. Cette molécule est classée sur la liste des substances prioritaires dangereuses par l'Union Européenne. A la station IFREMER La Tremblade, une étude a montré que l'atrazine pouvait induire une aneuploïdie chez l'huître creuse, *C. gigas* (Bouilly *et al.*, 2003). Cependant, aucun effet n'avait été rapporté sur les paramètres hématocytaires (Gagnaire *et al.*, 2003). Une expérience du même type a été réalisée avec du diuron (Bouilly *et al.*, soumis a) (**Article 5, Annexe 6**).

Les résultats montrent que le diuron peut induire de l'aneuploïdie chez *C. gigas* et des effets sur les paramètres hématocytaires. Après quatre semaines de contamination, la mortalité cellulaire, le pourcentage de granulocytes, la production d'EOR, la présence de lysosomes et l'activité de phagocytose présentent des valeurs supérieures chez les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins, quelle que soit la concentration de diuron testée (0.3 et 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Cependant, après onze semaines de contamination, aucune variation des paramètres hématocytaires n'est observée. Ces résultats suggèrent que le diuron pourrait modifier les activités de défense de l'huître creuse, *C. gigas*, mais qu'après une exposition à long terme, les activités hématocytaires sont restaurées.

Ces résultats montrent également que deux molécules toxiques utilisées dans le même objectif agricole n'ont pas les mêmes effets sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse. Cependant, l'atrazine et le diuron n'appartiennent pas à la même famille d'herbicides. Il serait intéressant de tester d'autres molécules appartenant à la famille de l'atrazine (triazines) ou du diuron (urées) afin de déterminer si les réponses des paramètres hématocytaires pourraient être spécifiques d'une famille ou d'un mode d'action donné.

IV Contamination *in vivo* d'huîtres avec un mélange de pesticides

IV.1. Préambule

Dans le cadre du programme MOREST (cf quatrième partie, I), il a été mis en évidence des différences de survie sur estran en période estivale entre différentes familles d'huîtres produites en éclosure. Ces résultats ont conduit à séparer les familles et à les qualifier de « R » (résistantes) et de « S » (sensibles) en fonction de leurs capacités de survie (Dégremont, 2003) (cf quatrième partie). De nombreux travaux ont été conduits afin de caractériser les familles « R » et « S » à différents niveaux, y compris la nutrition, la reproduction et les capacités de défense.

Une expérience a été réalisée par le laboratoire IFREMER d'Ecotoxicologie de Nantes en février 2003 à la station IFREMER Bouin (Vendée) (Géret *et al.*, en préparation). L'objectif de cette expérience était de comparer plusieurs paramètres entre une famille « R » et une famille « S » toutes deux confrontées à une pollution par des pesticides en utilisant une batterie de biomarqueurs. Un mélange de pesticides (Géret, 2003) composé de huit molécules (atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl aluminium, terbuthylazine, diuron, carbaryl) retrouvées dans les rivières en Charente-Maritime (17) (Léonard, 2002) a été testé sur les huîtres pendant sept jours. Les concentrations ont été choisies parmi les plus fortes valeurs rencontrées dans l'environnement en période d'épandage. Cette expérience a été réalisée deux fois, une en condition de normoxie et une autre en hypoxie (30 % d'oxygène). Plusieurs biomarqueurs utilisés en écotoxicologie ont été suivis lors de ces contaminations. Ces biomarqueurs étaient d'une part des marqueurs physiologiques (catalase, glutamine synthétase (GS) et glutathion-S-transférase (GST)) et d'autre part des paramètres hématologiques.

Aux jours 0, 1, 3 et 7 de chacune des expériences, 21 animaux par condition ont été analysés. Trois pools de sept animaux ont été réalisés pour chaque condition. L'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique (**Annexes 2.1, 2.2**) et plusieurs paramètres hématologiques (mortalité cellulaire, phagocytose, activité estérase, pourcentage de granulocytes) ont été analysés.

En normoxie, les résultats montrent que le pourcentage de cellules positives pour les estérases diminue pour la famille « R » contaminée par rapport à la famille « R » témoin après sept jours de contact (**Figure 51a**). L'activité de phagocytose est également significativement inférieure pour les deux familles contaminées après sept jours de contact en comparaison aux témoins (**Figure 51b**). En normoxie, l'action des pesticides apparaît plus importante que l'origine génétique des individus.

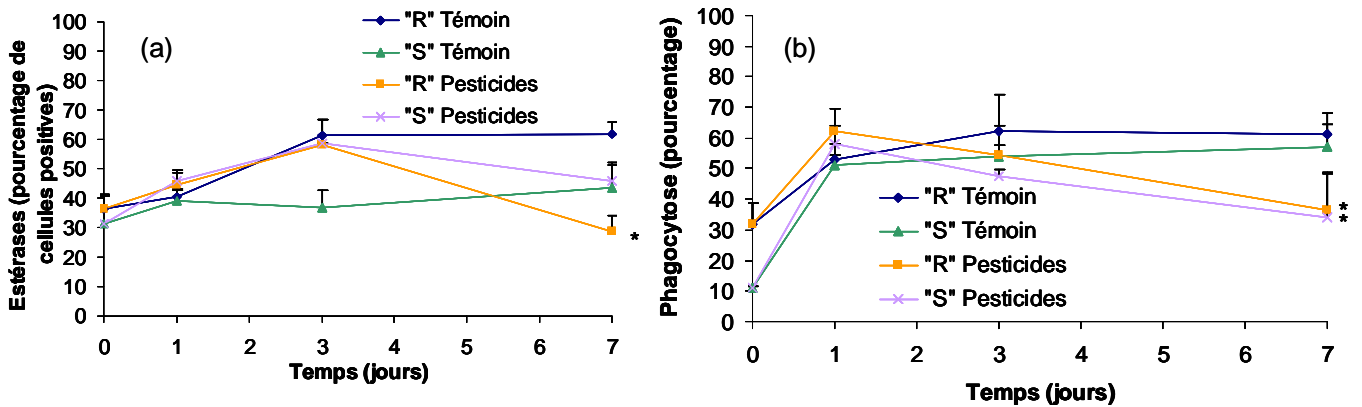


Figure 51 : évolution des paramètres hématocytaires pour les familles « R » et « S » en absence et en présence de pesticides en fonction du temps en condition de normoxie : pourcentage de cellules positives pour les estérases (a) et capacité de phagocytose (b). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : $p < 0.05$.

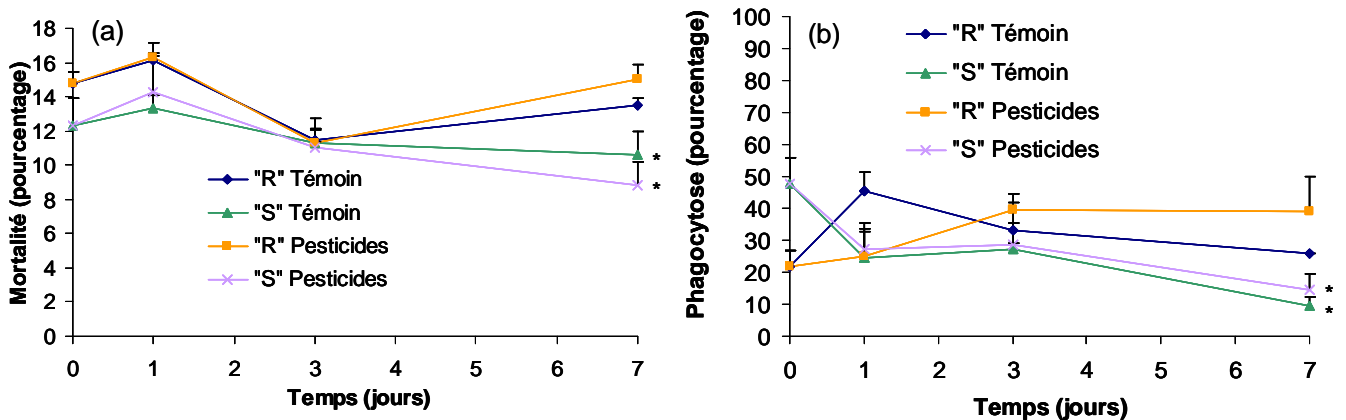


Figure 52 : évolution des paramètres hématocytaires pour les familles « R » et « S » en absence et en présence de pesticides en fonction du temps en hypoxie : pourcentage de la mortalité cellulaire (a) et capacité de phagocytose (b). N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : $p < 0.05$.

En hypoxie, après sept jours de contact, la mortalité hémocytaire est significativement inférieure chez les animaux « S » par rapport aux huîtres « R », en présence et en absence de pesticides (**Figure 52a**). Le même résultat est observé pour la phagocytose (**Figure 52b**). L'évolution des paramètres hémocytaires est donc différente en hypoxie par rapport à la normoxie : dans le cas d'un stress respiratoire, l'origine génétique des individus a plus d'effet que la présence de polluants (Géret *et al.*, en préparation).

L'analyse des autres biomarqueurs (catalase, GS et GST) réalisée par l'équipe du laboratoire IFREMER Nantes d'Ecotoxicologie a permis de montrer que les réponses étaient également différentes en fonction des conditions : en présence de pesticides, la catalase diminue à J7 chez les « S » en normoxie. Les valeurs de la GST sont plus importantes chez les « S » contaminés en hypoxie en comparaison aux « S » témoins à J1 et J7. Chez les deux familles, la GS diminue quelle que soit la condition d'oxygénation en présence de pesticides (Quirion, 2004). D'autres analyses montrent que pendant ces expériences, les « R » et les « S » bioaccumulent le glyphosate dans les mêmes proportions (2.9-3.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à J7), mais son métabolite, l'AMPA, est seulement retrouvé chez les « R » (6-6.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à J7), ce qui induit davantage d'adduits à l'ADN chez les « R ». La présence de pesticides provoque une diminution des dinoflagellés et des diatomées : une diminution de la nourriture peut représenter un facteur de stress supplémentaire (Burgeot *et al.*, 2005) (Géret *et al.*, en préparation).

L'objectif de cette étude était d'acquérir, par le biais d'un plan d'expérience permettant de croiser plusieurs conditions, une connaissance des variations d'activité de biomarqueurs en réponse à un mélange de pesticides à un stress hypoxique.

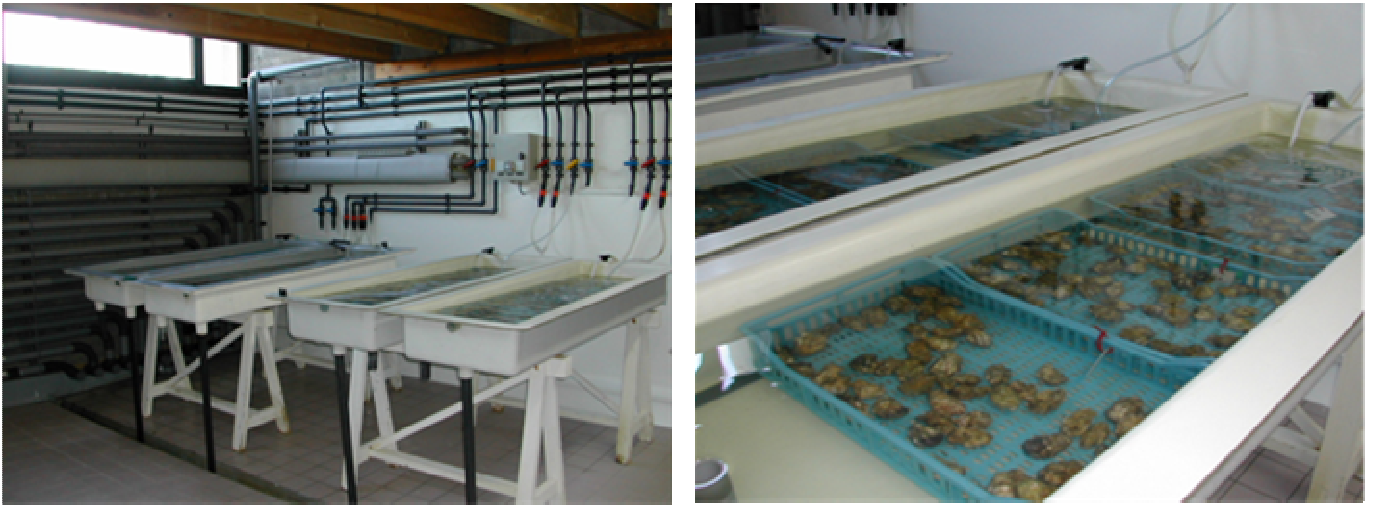


Figure 53 : aperçu du dispositif expérimental. Source : B. GAGNAIRE.

	Carbaryl	Diuron	Atrazine	Terbutylazine	Alachlore	Métolachlore	Glyphosate	Fosétyl al
Cc solution-mère (g/L)	0.2	4	0.5	1	2	2	2	2
Cc solution-mère (mM)	1	17	2	4	7	7	12	7
Cc finale dans les 100 L (µg/L)	0.05	0.5	0.7	0.6	0.8	0.6	0.7	0.6
Cc finale dans les 100 L (µM)	0.25	2	3	2.5	3	2	4	2

Tableau 12 : récapitulatif des différentes concentrations des huit pesticides utilisés dans le mélange dans la solution-mère et dans le bac de 100 L au final.

L'expérience réalisée à la station IFREMER Bouin (Vendée) ayant montré un effet du mélange de huit pesticides sur la phagocytose, cette étude a été poursuivie à la station de La Tremblade. Dans un premier temps, il était nécessaire de confirmer l'action des pesticides sur certaines activités hématocytaires. Pour cela, trois expériences ont été réalisées, en se rapprochant au maximum des conditions d'expérimentation utilisées à la station IFREMER Bouin.

IV.2. Matériel et Méthodes

IV.2.1. Animaux et protocole d'exposition aux pesticides

Les huîtres « R » et « S » ont d'abord été acclimatées pendant une semaine en montant la température de 1 à 2°C par jour pour atteindre une température finale de 19-20°C. Deux raceways ont été utilisés : un pour le témoin et un pour les animaux au contact des pesticides. Les huîtres ont été réparties dans les casiers à raison de quatre casiers par bac (deux pour les « R » et deux pour les « S ») (**Figure 53**). Chaque bac contenait 200 huîtres (100 « R » et 100 « S »). L'eau alimentant les bacs durant la totalité de l'expérience a été stockée le premier jour de l'expérience. La salinité a été relevée. Une fois répartie dans les bacs à raison de 100 L d'eau par bac, l'eau était chauffée par un système de résistances avec thermostat de manière à obtenir une température de 19-20°C. Un bullage a été installé dans chaque bac. L'apport en nourriture a été réalisé avec du *Chaetoceros gracilis*, diatomée dont la taille est proche de *Skeletonema costatum* (utilisée à Bouin). La concentration d'algues a été calculée chaque jour de manière à obtenir une concentration finale de 5.10^4 cellules.mL⁻¹, soit 5.10^9 cellules dans les 100 L. La contamination a duré sept jours.

Le mélange de huit molécules (atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-alumimium, terbuthylazine, diuron, carbaryl) a été réalisé à partir de solutions-mères individuelles fortement concentrées (**Tableau 12**). Dix millilitres de ce mélange ont été ajoutés à 1990 mL d'eau de mer, puis les deux litres ont été répartis sur la longueur du bac recevant les pesticides. Les concentrations finales des pesticides étaient inférieures à 1 µg.L⁻¹ (**Tableau 12**). L'eau a été changée quotidiennement, ainsi que les pesticides et la nourriture. Les huîtres mortes ont été retirées. Trois échantillons d'eau ont été conservés à l'occasion du premier renouvellement d'eau : avant le changement d'eau dans le bac contenant les pesticides, 30 minutes après le rajout des pesticides, et dans le bac témoin. Cent millilitres de chaque échantillon ont été analysés par le Pôle Analytique des Eaux (PAE) afin de déterminer les concentrations réelles de pesticides. Les échantillons ont été analysés par extraction sur phase solide et désorption par la phase mobile du système chromatographique ; l'analyse a été réalisée par le système analytique de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (Durand, communication personnelle).

Cette expérience a été réalisée trois fois.

1. Récepteurs et ligands	2. Transduction	3. Modification du cytosquelette	4. Dégradations post-phagocytaires et mécanismes de protection cellulaire	Référence
G-protein coupled receptor 48 Ficoline Galectine 4 Galectine 8 LBP/BPI LPS/β-1,3-glucan	Protéine Vav-3 Importine-α Importine-β ECSIT Protéine DOCK 180 c-Src kinase cdc-like kinase 2	Ankyrine Cofiline Filamine Protéine Rho	Isocitrate déshydrogénase α-N-Acétyl Cystéine Précurseur de Cathepsine L α-2-macroglobuline Tissue Inhibitor Métallo-Protéinase Superoxyde dismutase Lysozyme Défensine	Actine Actine cytosquelettique Facteur d'élongation 18S 28S

Tableau 13 : récapitulatif des gènes ciblés et des gènes de référence utilisés dans cette étude (en RT-PCR semi-quantitative et en PCR en temps réel).

Composés	Concentrations détectées (µg/L)				%G présence à 30 min	%G présence à 24h
	Concentrations théoriques (µg/L)	Eau du témoin	Eau contaminée Incubation 30 min	Eau contaminée Incubation 24h		
Terbutylazine	0.6	<0,005	0.292	0.234	48.66	39
Atrazine	0.7	<0,015	0.56	0.471	80	67.3
Diuron	0.5	<0,035	0.176	0.11	35.2	22
Alachlore	0.8	<0,065	0.27	0.101	33.75	12.6
Métolachlore	0.6	<0,002	0.054	0.033	9	5.5
Glyphosate	0.7	<0,05	<0,05	<0,05	7.14	0.32

Tableau 14 : concentrations mesurées dans l'eau pour six composés sur huit dans le témoin, 30 minutes après le changement d'eau et 24 h après et pourcentages de présence du composé dans l'eau en fonction du temps.

IV.2.2. Etude des paramètres hémoctaires en cytométrie de flux

A T = 1, 3 et 7 jours, l'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique chez 20 animaux par condition (« R » témoin, « R » pesticides, « S » témoins et « S » pesticides) (**Annexes 2.1, 2.2**). Au temps 0, jour d'ajout des pesticides, seuls 20 animaux « R » et 20 « S » ont été analysés. Pour chaque condition, quatre pools de cinq animaux ont été constitués. La concentration hémoctaire a été mesurée et ramenée à 10^6 cellules.mL⁻¹ en utilisant de l'EDMAS (**Annexe 3.2**). Six paramètres hémoctaires (mortalité hémoctaire, activités estérases, production d'EOR, présence de lysosomes, phagocytose et pourcentage de granulocytes) ont été évalués en cytométrie de flux (**Annexe 2.4**). Les résultats ont été analysés statistiquement (**Annexe 2.3**).

IV.2.3. Extraction d'ARN et analyses en PCR

A T = 7 jours, l'hémolymphe de 20 huîtres par condition a été prélevée dans la cavité péricardique (**Annexe 2.2**). Les ARN des hémocytes ont été extraits, leur concentration a été mesurée en DO (**Annexe 2.5.1**) et leur qualité a été contrôlée sur gel d'électrophorèse (**Annexe 2.5.2**). Lors de la première expérience, les ARN ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative (**Annexe 2j**). Lors de la deuxième et de la troisième expérience, les ARN ont été traités par la DNase (**Annexe 2.5.3**), transformés en ADNc par transcription inverse (**Annexe 2.5.4**) et analysés par PCR en temps réel (**Annexe 2g**). Pour ces analyses, le gène 18 S a servi de gène de référence (CV = 4.3 %).

La démarche suivie pour sélectionner les gènes étudiés dans ce travail a consisté à choisir des gènes pouvant être impliqués dans les mécanismes de défense et plus particulièrement dans la phagocytose. Ce phénomène est complexe et de nombreux gènes sont impliqués dans son déroulement. La phagocytose peut être divisée en quatre phases : liaisons des molécules à leurs récepteurs (phase 1), transduction du signal (phase 2), modifications du cytosquelette (phase 3) et dégradations post-phagocytaires et mécanismes de protection cellulaire (phase 4). Le travail a consisté à analyser les banques d'EST (Expressed Sequenced Tags) disponibles pour *C. gigas* et de déterminer par une analyse bibliographique lesquels pouvaient être impliqués dans l'une des quatre phases de la phagocytose. Vingt-cinq gènes au total ont été identifiés (six pouvant intervenir dans la première phase, sept dans la deuxième, quatre dans la troisième et huit dans la quatrième phase) (**Tableau 13**). Le travail a aussi permis de définir cinq gènes pouvant être utilisés comme gènes de références ou « housekeeping genes » (**Tableau 13**).

		Mortalité	Granulocytes	Estérases			ROS			Lysosomes			Phagocytose
				Cellules négatives	Population 1	Population 2	Cellules négatives	Population 1	Population 2	Cellules négatives	Pop 1	Pop 2	
Expérience 1	R	T<P à 7 jrs **		T>P à 3 jrs **				T<P à 3 jrs	T>P à 3 jrs **				T>P à 7 jrs *
	S		T>P à 3 jrs *					T<P à 3 jrs ***	T>P à 3 jrs *				
	ANOVA 2 facteurs						T<P à 3 jrs ***	T<P à 3 jrs *** R<S à 3 jrs **	T>P à 3 jrs *** R>S à 3 jrs *				R>S tt et à 7 jrs *
Expérience 2	R	T>P à 7 jrs *	T>P à 1 jrs **										T>P à 7 jrs *
	S						T>P **						T>P *
	ANOVA 2 facteurs	R<S à 1 jrs *	R<S à 1 jrs **	R>S *			T>P à 1 jrs * R>S à 1 jrs *	R<S à 1 jrs *					T>P *
Expérience 3	R					T>P à 3 jrs *							T>P **
	S			T<P à 3 jrs *									T>P à 7 jrs *
	ANOVA 2 facteurs		T>P à 3 jrs *		T<P *		T<P à 1 jrs * R>S tt et à 1 jrs ***	R<S à 1 jrs *					T>P tt et à 7 jrs ** *
Pour les 3 expériences	R	T>P **											
	S		T>P à 3 jrs *										
	ANOVA 2 facteurs												T>P *

Tableau 15 : résultats obtenus pour les trois réplicats de l'expérience *in vivo* de mise en contact d'huîtres « R » et « S » avec un mélange de pesticides à des concentrations environnementales. T : animaux témoins, P : animaux contaminés aux pesticides. * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001. « ANOVA deux facteurs » correspond aux analyses réalisées sur les paramètres hémoctaires des animaux « R » et « S » regroupés. « T>P » sans indication de temps signifie que ce résultat est obtenu pour l'ensemble des temps d'analyses.

IV.3. Résultats

La salinité a varié pour les trois expériences : elle était de 24 ‰ pour la première expérience, de 28 ‰ pour la deuxième et de 31 ‰ pour la troisième.

IV.3.1. Concentrations des pesticides dans l'eau

Les concentrations de pesticides effectivement retrouvées dans l'eau sont éloignées des valeurs nominales : le pourcentage de présence 30 minutes après le changement pour la terbuthylazine, le diuron et l'alachlore sont respectivement de 48.6 %, 35.2 % et 33.75 % (**Tableau 14**). Pour le métolachlore et le glyphosate, les pourcentages sont extrêmement faibles : 9 % et 7.14 % respectivement (**Tableau 14**). Seule l'atrazine présente un fort pourcentage de présence (80 %) (**Tableau 14**). Vingt-quatre heures après le changement d'eau, les concentrations des composés diminuent par rapport aux concentrations retrouvées 30 minutes après le changement (**Tableau 14**).

IV.3.2. Effets des pesticides sur les paramètres hématologiques

La mortalité hématologique montre des résultats différents en fonction de l'expérience considérée : elle est plus importante pour les « R » contaminés lors de la première expérience, et plus importante dans les « R » témoins dans la deuxième expérience et en considérant l'ensemble des expériences (**Tableau 15**). Le pourcentage de granulocytes présente des variations différentes suivant l'expérience considérée, mais sur l'ensemble des expériences, il diminue en présence de pesticides chez les « S » après trois jours de contamination (**Tableau 15**). Le pourcentage de cellules positives pour les estérases varie peu, mis à part une diminution de la population 2 (cf première partie, **Figure 41**) à trois jours pour les « R » contaminés lors de la troisième expérience (**Tableau 15**). Le pourcentage de cellules fortement positives (population 2) (cf première partie, **Figure 43**) pour les EOR ne varie que pendant la première expérience en diminuant pour les animaux contaminés des deux familles à trois jours (**Tableau 15**). Le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes varie peu. La phagocytose présente des variations au cours des trois expériences. Elle est moins importante pour les animaux contaminés par rapport aux témoins pour les « R » lors des trois expériences et pour les « S » lors de la deuxième et de la troisième expérience (**Tableau 15**). En considérant les données des trois expériences (lot et temps), une différence significative apparaît entre animaux témoins et contaminés ($T > P$, **Tableau 15**).

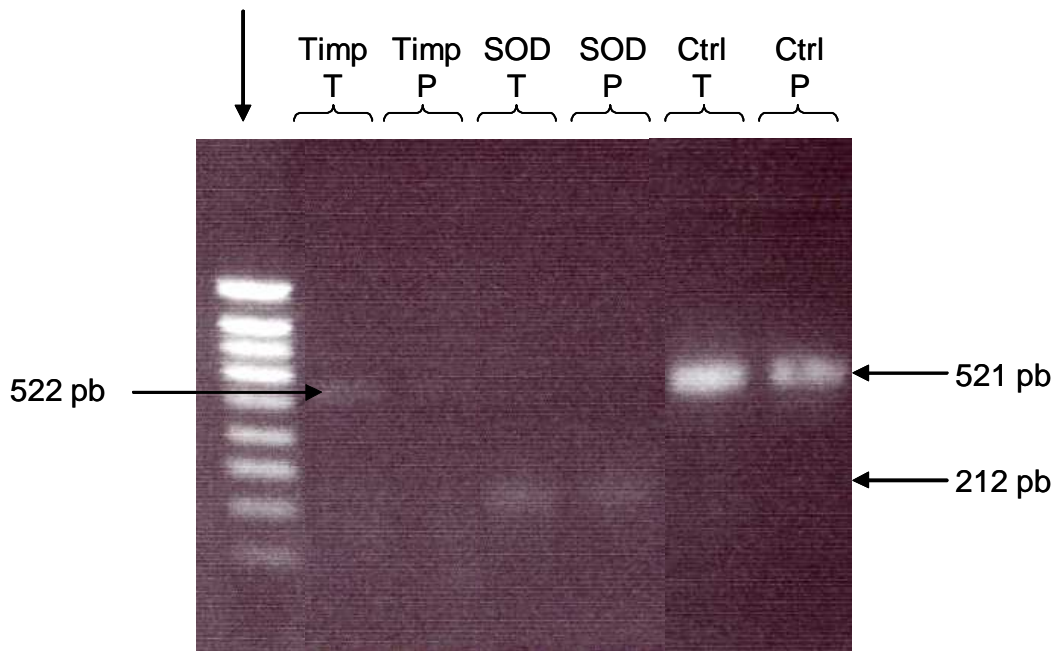


Figure 54 : gel d'électrophorèse des produits de RT-PCR correspondant aux gènes TIMP, SOD et ARN 18 S (Ctrl) pour l'échantillon provenant du témoin (T) et celui provenant des animaux contaminés (P). Les tailles des fragments correspondent aux tailles attendues pour ces produits.

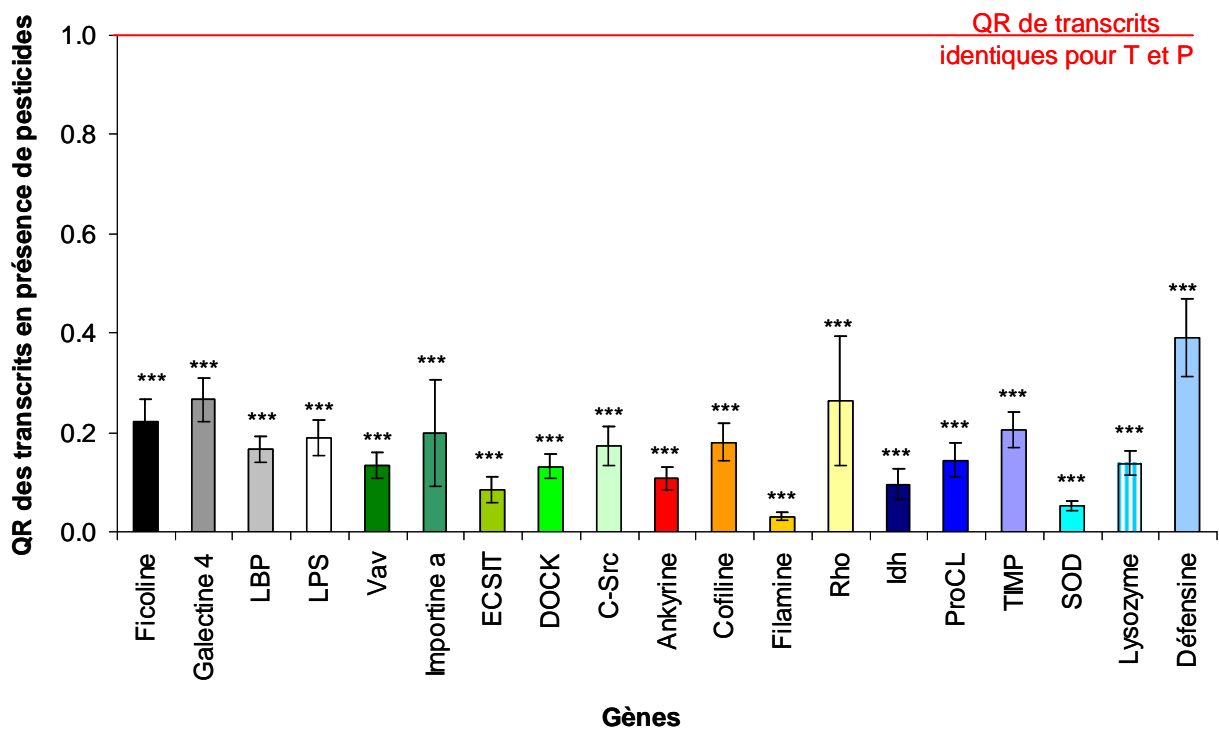


Figure 55 : quantités relatives (QR) (normalisées par le gène 18 S) des transcrits des 19 gènes sélectionnés dans les hémocytes des animaux exposés aux pesticides pendant sept jours lors de la troisième expérience. N = 3 réplicats intra-expérimentaux et 2 000 randomisations ; l'erreur standard est représentée. *** : $p < 0.001$.

IV.3.3. Effets des pesticides sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose

Lors de l'analyse en RT-PCR semi-quantitative, l'expression de deux gènes appartenant au quatrième groupe parmi les 21 suivis varie entre les ARN provenant des huîtres témoins et ceux provenant d'animaux contaminés aux pesticides après 40 cycles de PCR : TIMP et SOD. Pour chacun de ces deux gènes, l'expression est plus faible en présence de pesticides en comparaison au témoin (**Figure 54**). L'expression du gène de référence (ARN 18 S) varie peu entre les deux conditions (**Figure 54**).

Lors des analyses en PCR en temps réel, seuls les échantillons provenant de l'expérience 3 ont pu être étudiés. Les 19 gènes suivis sont sous-exprimés en présence de pesticides ($p < 0.001$) (**Figure 55**).

IV.4. Discussion

L'utilisation importante de pesticides en agriculture est à l'origine de sévères pollutions environnementales et représente des risques potentiels pour la santé. Une quantité importante de pesticides et de leurs résidus a été mise en évidence dans les légumes, le lait et la viande au cours des dernières années (Banerjee *et al.*, 1996). L'introduction de nouveaux pesticides, plus toxiques et se disséminant rapidement dans l'environnement a fait naître le besoin d'identifier précisément de leurs effets potentiels sur la santé humaine (Banerjee *et al.*, 1996). La plupart des études sur les pesticides ont porté sur les altérations enzymatiques, les effets pathologiques globaux, et leurs propriétés mutagènes et potentiellement carcinogènes. Cependant, malgré l'intensité de l'utilisation des pesticides le long des côtes, peu d'études ont investigué leurs effets sur des animaux marins dans des conditions expérimentales (Galloway & Depledge, 2001) et encore moins d'études ont porté sur des mélanges de pesticides (Faust *et al.*, 2001).

Le mélange utilisé dans cette étude est composé de huit pesticides (carbaryl, diuron, atrazine, terbuthylazine, alachlore, métolachlore, fosétyl aluminium et glyphosate). Ces molécules ont été sélectionnées car elles sont épandues en quantités importantes au printemps et en été dans la région de Marennes-Oléron et sont retrouvées régulièrement dans les eaux du bassin aux concentrations utilisées dans l'expérience (Léonard, 2002) (**Figure 35**).

IV.4.1. Toxicité des pesticides utilisés dans le mélange

Les pesticides utilisés dans ce travail sont en majorité des herbicides. On peut s'attendre à ce que les herbicides présentent peu de danger pour les vertébrés et les invertébrés. Comparés aux insecticides, les herbicides montrent moins de toxicité sur les organismes animaux (Bellas *et al.*, 2005).

Cependant, différents effets peuvent être associés à des herbicides. Chez *C. gigas*, l'atrazine est connue pour sa génotoxicité (Bouilly *et al.*, 2003), ses actions perturbatrices du développement embryonnaire (Robert *et al.*, 1986) et elle induit une mortalité différentielle selon la composition allélique des animaux (Moraga & Tanguy, 2000). L'atrazine inhibe *in vitro* la production d'interféron- γ , de TNF- α et d'IL-5 chez les cellules humaines (Hooghe *et al.*, 2000). La terbuthylazine a un effet négatif sur la reproduction et la respiration du ver rouge de Californie, *Eisenia andrei* (Viswanathan, 1997), mais n'est pas génotoxique (Gebel *et al.*, 1997). L'alachlore peut s'avérer génotoxique (Gebel *et al.*, 1997). Il ne produit aucun effet *in vitro* sur les fonctions immunitaires humaines (Flaherty *et al.*, 1992), mais induit la production de TNF- α et inhibe celle d'interféron- γ et de NO chez les macrophages de souris (Hong *et al.*, 2004). Le métolachlore peut induire des dommages aux chromosomes sur des cultures de lymphocytes humains à fortes concentrations (Roloff *et al.*, 1992). Le diuron inhibe l'embryogénèse et la croissance larvaire de l'oursin-pierre, *Paracentrotus lividus*, à fortes concentrations, mais pas celle de l'ascidie jaune, *Ciona intestinalis* (Bellas *et al.*, 2005). Il peut être tératogène à fortes doses, mais n'est pas mutagène (Giacomazzi & Cochet, 2004). Le diuron inhibe la production d'interféron- γ , de TNF- α et d'IL-5 (Hooghe *et al.*, 2000). Le glyphosate a peu d'effet sur le métabolisme (Tanguy *et al.*, 2005a) et le développement (His *et al.*, 1999) de *C. gigas* et n'est pas dangereux pour l'homme (Williams *et al.*, 2000). Cependant, cette molécule provoque des aberrations chromosomiques, un effet mutagène et un stress oxydatif dans des cultures cellulaires de lymphocytes bovins (Lioi *et al.*, 1998a).

Le mélange contient également du carbaryl (insecticide) et du fosétyl-aluminium (fongicide). Chez les vertébrés, le carbaryl peut diminuer la production d'anticorps (Banerjee *et al.*, 1996), la GSH (Banerjee *et al.*, 2001), la production d'interleukine, de NO et de TNF- α (Casale *et al.*, 1993; Hong *et al.*, 2004) et augmenter la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (Casale *et al.*, 1993). Il peut augmenter la sensibilité de salmonidés à des maladies parasitaires (Dunier & Siwicki, 1993). Le fosétyl aluminium est modérément toxique vis-à-vis de deux algues vertes (Ma *et al.*, 2002) (**Annexe 1e**).

IV.4.2. Effets des mélanges de polluants

La majeure partie des expériences menées en condition de laboratoire sont effectuées le plus généralement en utilisant un seul polluant (Fournier *et al.*, 2001; Boutet *et al.*, 2002). Or, dans l'environnement, les animaux sont confrontés à des mélanges complexes de polluants (Moore, 2002). Les expériences réalisées dans le cadre de ce travail tendent donc à se rapprocher des conditions rencontrées par les huîtres dans le milieu. Cependant, les huit pesticides utilisés ne sont pas exhaustifs des polluants rencontrés dans le milieu marin (RNO, 2002). L'étude des effets de

mélanges est complexe, car il peut y avoir des interactions entre molécules. Ces interactions dépendent également des mécanismes d'action des différentes molécules du mélange (Faust *et al.*, 2001). Une étude a montré qu'un mélange de 18 triazines était plus toxiques sur la croissance d'algues que les 18 molécules utilisées individuellement (Faust *et al.*, 2001). Ceci a également été démontré concernant les effets toxiques d'insecticides sur les thymocytes de souris (Olgun *et al.*, 2004), de pesticides sur l'AChE chez les copépodes (Forget *et al.*, 2003) et de HAPs sur les fonctions hématocytaires de *M. edulis* (Grundy *et al.*, 1996a). L'atrazine et l'alachlore ont induit une génotoxicité sur des cellules osseuses de souris lorsque les deux molécules étaient présentes simultanément, alors qu'aucun effet n'avait été observé lors de tests individuels (Meisner *et al.*, 1992). Même avec des molécules appartenant à la même famille, les effets peuvent être différents : une étude sur le ver rose, *Eisenia fetida*, rapporte que l'atrazine, contrairement à la simazine, augmente la toxicité du chlorpyrifos (insecticide), en augmentant la production de métabolites toxiques (Lydy & Linck, 2003). Les mélanges de polluants peuvent également conduire à des effets antagonistes. Cela a été démontré dans des modèles de vertébrés et d'invertébrés. La toxicité de mélanges de PCBs Arochlor envers les immunoglobulines de souris est moins grande que la toxicité de toutes les molécules du mélange testées séparément (Harper *et al.*, 1995). La toxicité du mercure et du cadmium sur les paramètres immunitaires cellulaires et humoraux chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, est diminuée par la présence simultanée de zinc (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999). Une étude rapporte que le zinc et le cadmium (Breitmayer *et al.*, 1984) peuvent diminuer la toxicité du mercure envers *M. edulis* et son accumulation dans les tissus (Gutierrez-Galindo & Breitmayer, 1981; Breitmayer *et al.*, 1984).

IV.4.3. Mesure de concentrations des pesticides dans l'eau

La mesure des concentrations réelles en pesticides dans l'eau de l'expérience a montré des concentrations plus faibles que celles attendues. Cependant, cette perte semble être généralement constatée. Lors des expériences réalisées à Bouin, des mesures de pesticides dans l'eau avaient été effectuées, et les résultats ont montré également de fortes pertes des composés (Géret, communication personnelle). De plus, dans des expériences de contamination *in vivo* de *C. gigas* avec de l'atrazine, une perte de concentration d'environ 70 % par rapport à la concentration attendue a été observée (Tanguy *et al.*, 2005a). Ces pertes sont probablement dues à l'adsorption des composés sur les parois des bacs, à leur évaporation ou à leur dégradation. Cependant, le fait d'obtenir des concentrations plus faibles que celles attendues peut également venir de la préparation des pesticides et d'erreurs dans la pesée. Nous avons choisi de réduire au maximum le nombre de dilutions. Enfin, la perte observée peut également être due au fait que les pesticides sont métabolisés par les huîtres. Ils sont très peu bioaccumulés, mais peuvent être transformés en

d'autres composés, ce qui réduit la concentration de la molécule-mère (Giacomazzi & Cochet, 2004).

IV.4.4. Effets des pesticides sur les paramètres hématocytaires

Six paramètres hématocytaires (mortalité cellulaire, pourcentage de granulocytes, phagocytose, pourcentage de cellules positives pour les estérases, présence de lysosomes et production d'EOR) ont été mesurés pendant les sept jours de contamination avec le mélange de pesticides.

Des effets contradictoires des pesticides ont été observés sur la mortalité des hémocytes pour les huîtres « R ». Un autre mélange de pesticides (lindane, dieldrine, endosulfan, aldicarb, metribuzine et atrazine) n'a induit une diminution de la viabilité des splénocytes du crapaud à griffes, *Xenopus laevis*, après sept jours de contact qu'à de fortes concentrations (Christin *et al.*, 2004).

Les pesticides ont induit une diminution du pourcentage de granulocytes, mais pour des familles différentes en fonction de l'expérience. Dans tous les cas, cette diminution n'apparaissait qu'après un ou trois jours de contamination, et à sept jours aucune différence n'a été observée. Ce type d'effet transitoire face à une stimulation en condition contrôlée et de rétablissement après un certain temps d'acclimatation a déjà été observé chez la lymnée des étangs, *Lymnaea stagnalis*, pour la phagocytose, suggérant une possible restauration des fonctions cellulaires (Russo & Lagadic, 2004). Peu d'effets des pesticides ont été observés sur les activités estérases. Le mélange contient pourtant du carbaryl, insecticide de la famille des carbamates, connu pour inhiber les activités acétylcholinestérases et carboxylestérases comme cela a été démontré chez différentes espèces de bivalves (Mora *et al.*, 1999b; Alves *et al.*, 2002; Galloway *et al.*, 2002). Cependant, la seule acétylcholinestérase décrite dans les branchies de *C. gigas* a été démontrée comme insensible aux carbamates et aux produits organophosphorés (Bocquené *et al.*, 1997). La sonde utilisée dans cette étude (FDA) permet de détecter les activités estérases non spécifiques. Les pesticides utilisés dans le mélange ne semblent pas avoir d'effets sur ces activités.

Les effets des pesticides sur la production d'EOR se sont avérés différents suivant l'expérience considérée. Lors de la première expérience, les pesticides ont diminué le pourcentage de cellules fortement positives après trois jours de contamination. Ce résultat est en contradiction avec la littérature qui rapporte une augmentation des EOR induite par les pesticides (Banerjee *et al.*, 2001). Aucun effet du mélange de pesticides n'a été observé sur le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes. Les pesticides peuvent cependant affecter la membrane lysosomale (Banerjee *et al.*, 2001; Tanguy *et al.*, 2005a).

Parmi tous les paramètres hématocytaires testés, seule la phagocytose montre des résultats reproductibles dans les trois expériences, quelque soit le type d'animal (« R » ou « S »). Le mélange de pesticides a induit une diminution de cette activité après sept jours de contact et sur l'ensemble

de l'expérience. En considérant les données des trois expériences, cet effet est retrouvé. Ce résultat confirme les précédents résultats obtenus dans les expériences réalisées à la station IFREMER Bouin (cf IV.1). Cette étude est la première à mettre en évidence de manière répétable un effet d'un mélange de pesticides à concentrations environnementales sur la phagocytose chez l'huître creuse, *C. gigas*. Parmi les molécules constituant le mélange, l'atrazine a montré un effet négatif sur la phagocytose chez *Lymnaea stagnalis* (Russo & Lagadic, 2004). Cependant, aucun effet de cette molécule a été démontré sur la phagocytose ni sur aucun autre paramètre hémoducal de *C. gigas*, *in vivo* et *in vitro* lorsque cette molécule était testée seule (Gagnaire *et al.*, 2003). L'absence d'effet a également été rapportée chez la carpe commune, *Cyprinus carpio* (Cossarini-Dunier *et al.*, 1988; Dunier, 1991; Dunier & Siwicki, 1993). L'effet de l'atrazine sur les paramètres immunitaires ne semble donc pas être retrouvé chez toutes les espèces. La phagocytose chez *Eisenia fetida* a été inhibée par du carbaryl (Cooper & Roch, 2003). Le glyphosate a provoqué une diminution de l'activité phagocytaire chez la carpe *Cyprinus carpio* (Terech-Majewska *et al.*, 2004). Pris individuellement, plusieurs pesticides utilisés dans cette étude peuvent moduler la phagocytose. De plus, le même mélange de pesticides testé *in vitro* a également induit une modification de la phagocytose alors que les molécules composant le mélange n'ont induit aucun effet en tests individuels (Gagnaire *et al.*, sous presse a). Ces résultats semblent montrer que dans le cas du mélange de huit pesticides utilisé dans cette étude, il y a pu avoir une interaction positive entre les molécules.

D'autres molécules ont des effets sur la phagocytose. Les pesticides organochlorés tels que le DDT et le lindane ont des effets sur la réponse immunitaire chez les vertébrés en diminuant la phagocytose, la production d'anticorps et en augmentant la sensibilité aux maladies (Snieszko, 1974; Dunier, 1991; Wong *et al.*, 1992; Dunier & Siwicki, 1993; Koner *et al.*, 1998; Voccia *et al.*, 1999). La phagocytose peut également être modulée chez les bivalves par la dieldrine et le chlordane (Anderson *et al.*, 1981; Larson *et al.*, 1989). Le trichlorphon, un insecticide organophosphoré, induit une diminution de la phagocytose des neutrophiles et du lysozyme chez *Cyprinus carpio* (Siwicki *et al.*, 1990). Le PCP et le chlorothalonil induisent une diminution de la production d'EOR et de NADPH et de la phagocytose chez les bivalves (Alvarez & Friedl, 1992; Baier-Anderson & Anderson, 1996, 2000). La littérature rapporte également la modulation d'autres paramètres hémoducals par les pesticides. L'exposition de *C. gigas* à un mélange de pesticides (100 µg.L⁻¹ d'atrazine, 1 µg.L⁻¹ de diuron et 1 µg.L⁻¹ d'isoproturon) diminue l'agrégation hémoducal spontanée (Auffret & Oubella, 1997). L'atrazine augmente *in vivo* le nombre d'hémocytes circulants chez des gastéropodes pulmonés d'eau douce (la lymnée palustre, *Lymnaea palustris*, et *Lymnaea stagnalis*) (Russo & Lagadic, 2000, 2004).

Le même mélange de pesticides utilisé au cours de cette étude induit une augmentation de la phagocytose *in vitro*, alors qu'une diminution apparaît *in vivo*. Ceci peut s'expliquer par le fait que les procédures expérimentales sont différentes : les expériences *in vitro* ne tiennent pas compte du métabolisme général de l'organisme. Elles sont réalisées sur des cellules isolées. Dans le cadre d'expériences *in vivo*, réalisées sur l'organisme entier, des processus différents rentrent en ligne de compte, notamment la métabolisation des pesticides par l'animal. La métabolisation peut augmenter ou diminuer la toxicité des composés. Certains des métabolites des pesticides utilisés dans cette étude sont plus toxiques que les molécules-mères. C'est le cas de l'alachlore et du métolachlore, moins toxique que leurs métabolites (6-diéthylaniline et 2-éthyl-4-méthylaniline) vis-à-vis de *Vibrio fischeri* (Osano *et al.*, 2002). Le métabolite principal du carbaryl est le 1-naphthol, qui est aussi le métabolite du naphthalène et qui est plus toxique que le carbaryl sur des cyanobactéries, le mélange des deux étant encore plus toxique que chacun des composés individuellement (Obulakondaiah *et al.*, 1993). Le 3,4-dichloroaniline, métabolite du diuron, est beaucoup plus toxique pour les organismes aquatiques que ce dernier et peut induire de l'aneuploïdie (Giacomazzi & Cochet, 2004). Cependant, pour d'autres composés, les métabolites sont moins toxiques que les molécules-mères. C'est le cas de l'éthane sulfonate (métabolite de l'alachlore) (Heydens *et al.*, 1996), de la dééthylatrazine (métabolite de l'atrazine) (Arru *et al.*, 1997) et de l'AMPA (acide aminométhylphosphonique, métabolite du glyphosate) (Williams *et al.*, 2000).

Peu de différences sont apparues entre les familles « R » et « S ». Ces familles ont également été étudiées dans les expériences *in situ* rapportées dans la quatrième partie. L'influence de l'origine génétique sera discutée dans cette partie. Dans le cadre des expériences *in vivo* réalisées à la station IFREMER La Tremblade, il est possible de conclure que l'origine génétique n'a pas d'influence sur les valeurs des paramètres hématocytaires en présence de pesticides dans des conditions de normoxie. Des différences étaient apparues dans les expériences de contamination en hypoxie (cf IV.1).

IV.4.5. Effets des pesticides sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose

Les 19 gènes suivis en PCR en temps réel ont montré une sous-expression en présence du mélange de pesticides. Ce résultat confirme les résultats obtenus en cytométrie de flux. Les gènes suivis ont en effet été sélectionnés sur la base de leur implication possible dans le mécanisme de phagocytose. Plusieurs gènes appartenant à différentes phases de la phagocytose ont été identifiés. Les gènes dont l'expression a été modifiée par les pesticides appartiennent aux quatre différentes phases de la phagocytose (**Tableau 13**). Cependant, ces résultats concernant l'expression de gènes n'ont pu être obtenus que pour une seule des trois expériences.

La ficoline est une molécule humorale du système immunitaire inné présente chez les chordés ; elle possède une activité lectine liant les résidus N-acétylglucosamine (Matsushita & Fujita, 2001, 2002; Fujita *et al.*, 2004). La galectine 4 fait partie de la famille des galectines qui jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire, l'adhésion cellulaire, la progression des cancers et des processus de développement (Leffler *et al.*, 2004). Ce sont des lectines qui contiennent des domaines liant les résidus β -galactosides (Mitta *et al.*, 2005). Ces deux protéines interviennent dans la phagocytose (cf rappels bibliographiques, IV.2.2).

Le complexe LBP/BPI est composé des protéines LBP (LPS binding protein) et BPI (bactericidal/permeability-increasing protein), deux protéines mammaliennes reliées ayant une forte affinité pour les LPS. Elles sont présentes dans les granules des leucocytes polymorphonucléaires dont la fonction est la phagocytose et la destruction extra-cellulaire de micro-organismes (Beamer *et al.*, 1998). La protéine LBP/BPI active la cascade de réponse proPO (Mitta *et al.*, 2005). La protéine liant les LPS et les β -1,3-glucan ou LGBP est suspectée de jouer un rôle important dans la défense innée chez les crustacés et les insectes car elle induit la dégranulation des granulocytes et active la cascade de réponse proPO (Smith & Söderhäll, 1991; Marmaras *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2005). Les niveaux de PO augmentent lors du début de l'infection de *R. decussatus* par *Perkinsus olseni*, puis diminuent (Munoz *et al.*, 2006). La LGBP est connue pour être sur-exprimée lors d'infections bactériennes chez la crevette et le produit de cette protéine peut jouer un rôle critique dans les interactions hôte/parasite (Tanguy *et al.*, 2004). Les pesticides, en induisant une sous-expression de ces protéines, pourraient induire une réduction de l'efficacité des défenses. Cependant, la LGBP a été détectée comme sur-exprimée chez des huîtres contaminées au glyphosate ou avec un mélange d'atrazine, de diuron et d'isoproturon (Tanguy *et al.*, 2005a) ou encore avec des HAPs (Boutet *et al.*, 2004).

La protéine Vav-3, dont le rôle exact est inconnu, appartient à la famille des Vav, famille de protooncogènes exprimée spécifiquement dans les cellules du système hématopoïétique et impliquée dans la cascade de signalisation des lymphocytes B et T (Fujikawa *et al.*, 2003; Almarza *et al.*, 2004). Les protéines Vav peuvent réguler les réarrangements du cytosquelette d'actine. L'importine- α fait partie de la famille des importines, dont les récepteurs NLS (séquence de localisation nucléaire) reconnaissent le signal des protéines kariophiliques du cytosol, ce qui permet leur migration dans le noyau et qui conduit à l'activation des lymphocytes (Andrade *et al.*, 2003). La protéine DOCK180 agit dans l'organisation du cytosquelette, la phagocytose et l'apoptose (Cote & Vuori, 2002). La c-Src kinase (c-terminal src kinase) fait partie de la famille des Src tyrosines kinases ; la cascade de phosphorylation des tyrosines est essentielle pour l'activation des macrophages et de la phagocytose (Suzuki *et al.*, 2000). L'ankyrine est un élément clé dans la structure du cytosquelette. Elle peut jouer un rôle dans le déclenchement des maladies (Lambert &

Bennett, 1993). La cofiline est une protéine dépolymérisant l'actine de petite taille (« actin depolymerizing factor »); elle fait partie de la cascade de signalisation d'activation des lymphocytes T (Lee *et al.*, 2000). Les filamines sont des protéines de liaison à l'actine qui permettent son assemblage et son désassemblage. Elles existent dans les macrophages. Elles peuvent interagir avec les glycoprotéines et les intégrines (Van der Flier & Sonnenberg, 2001). Les protéines Rho sont des petites GTPases. Elles régulent l'organisation de l'actine, l'adhésion et la protection cellulaire, la motilité, l'expression de gènes et le trafic membranaire. Elles jouent un rôle important sur la membrane plasmique et la remodelisation du cytosquelette pendant l'intégration de la particule lors de la phagocytose (Chimini & Chavrier, 2000). La sous-expression de ces huit molécules par les pesticides peut donc conduire à un déficit de la phagocytose. L'expression de l'importine- α diminue également chez *C. gigas* en présence de HAPs (Boutet *et al.*, 2004).

L'ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways) est un intermédiaire conservé dans l'évolution des cascades de signalisation et de transduction Toll/IL-1 et Rel/NF- κ B, d'importance majeure dans les réponses immunitaires innée et dans le développement. L'ECSIT est impliqué dans la régulation de MEKK-1 (MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinase kinase-1) (Kopp *et al.*, 1999). Chez les vertébrés, les MAPK représentent une famille de sérine-thréonine protéines kinases exprimées dans toutes les cellules eucaryotes en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires et impliquées dans la transduction des signaux bactériens (Canesi *et al.*, 2002a). Chez *M. galloprovincialis*, la transduction du signal provoqué par la reconnaissance d'*E. coli* semble impliquer en particulier la p38 MAPK, qui intervient chez les leucocytes mammaliens dans la régulation de la production d'EOR (Canesi *et al.*, 2002c; Canesi *et al.*, 2002a). Une étude a démontré dans les hémocytes d'huîtres creuses, *C. gigas*, injectées avec des bactéries l'existence d'un facteur de transcription impliqué dans la cascade de transduction de signaux Rel/NF- κ B (*Cg*-Rel) (Montagnani *et al.*, 2004). La sous-expression de l'ECSIT par les pesticides peut conduire à une capacité réduite de répondre aux agressions par des agents infectieux.

L'isocitrate déshydrogénase fournit le NADPH pour la production de GSH afin de défendre la cellule contre l' O_2^- (Isocitrate + $NADP^+$ + $2H^+$ = 2-oxoglutarate + NADPH + H^+ + CO_2) (Wang *et al.*, 1997; Yoshihara *et al.*, 2001; Kim & Park, 2003). La SOD fait partie des enzymes anti-oxydantes qui protègent les cellules contre les EOR toxiques produits à l'issue de la flambée oxydative et possède une forte affinité pour les formes actives de l'oxygène (cf rappels bibliographiques, IV.1.6.5). La sous-expression de ces deux gènes par les pesticides peut conduire à une diminution de la défense de la cellule contre les EOR. Ceci a été généralement constaté comme effet des pesticides (Banerjee *et al.*, 2001). Cependant, l'expression de la cavortine¹ est augmentée

¹ La cavortine ou permine possède un domaine SOD et est également impliquée dans l'agrégation (Scotti *et al.*, 2001).

lors de l'exposition à un mélange d'atrazine, de diuron et d'isoproturon (Tanguy *et al.*, 2005a).

La procathepsine L est le précurseur de la cathepsine L. Les cathepsines lysosomales B, L, H et D sont des endopeptidases importantes dans la dégradation des protéines intracellulaires, la reconnaissance de l'antigène et le turnover accéléré des protéines dans de nombreuses conditions pathologiques (Kominami *et al.*, 1991). La cathepsine L joue un rôle dans la dégradation des protéines dans le lysosome, dans la carcinogénèse et dans la digestion (Hu & Leung, 2004). Le fait qu'elle soit sous-exprimée en présence de pesticides pourrait conduire à une diminution des activités de dégradation post-phagocytaires, ce qui n'a pas été confirmé par l'analyse en cytométrie de flux. Cependant, la procathepsine L a vu son expression augmenter chez des huîtres contaminées aux HAPs (Boutet *et al.*, 2004) ou au glyphosate (Tanguy *et al.*, 2005a) et l'expression d'une protéine lysosomale a augmenté lors de l'exposition à un mélange d'atrazine, de diuron et d'isoproturon (Tanguy *et al.*, 2005a).

La protéine TIMP (tissue inhibitor metalloproteinase) est un inhibiteur de protéases. Ces molécules jouent un rôle dans la digestion de nutriments et dans de nombreux processus extra-cellulaires tels que la réponse infectieuse (Mitta *et al.*, 2005). Chez les invertébrés, les inhibiteurs de protéases peuvent être synthétisés durant la réponse humorale pour inactiver les protéases telles que les métalloprotéinases secrétées par les pathogènes. Un déséquilibre entre les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs peut être impliqué dans le développement de maladies (Montagnani *et al.*, 2001). La TIMP de l'huître n'est exprimée que dans les hémocytes et les ARNm sont fortement accumulés après une blessure ou un test d'épreuve avec des bactéries (Gueguen *et al.*, 2003), laissant penser que TIMP joue un rôle dans la réparation des blessures et dans les mécanismes de défense (Montagnani *et al.*, 2001). L'induction d'une sous-expression en présence de pesticides peut être associée à une diminution des mécanismes de défense.

Le lysozyme est une enzyme à activité bactéricide présente chez de nombreux animaux et dans l'hémolymphe de nombreux bivalves (cf rappels bibliographiques, IV.2.1 ; **Annexe 1d**). La défensine est un peptide anti-bactérien (cf rappels bibliographiques, IV.2.7.2). Les huîtres exposées aux pesticides peuvent donc présenter une diminution de leur activité bactéricide. L'expression du lysozyme a également diminué chez des huîtres contaminées aux HAPs (Boutet *et al.*, 2004).

IV.4.6. Remarques sur la technique de PCR en temps réel

Plusieurs remarques sur la technique de PCR en temps réel peuvent être formulées à l'issue de ce travail. Les gènes de référence utilisés (18 S, facteur d'élongation ou actine) ont globalement présenté des variations lors du traitement aux pesticides. Les gènes de référence, ou « housekeeping genes », sont utilisés car leur synthèse est réalisée dans tous les types de cellules nucléées car ils sont nécessaires à la survie. La synthèse de ces molécules est considérée comme variant très peu en

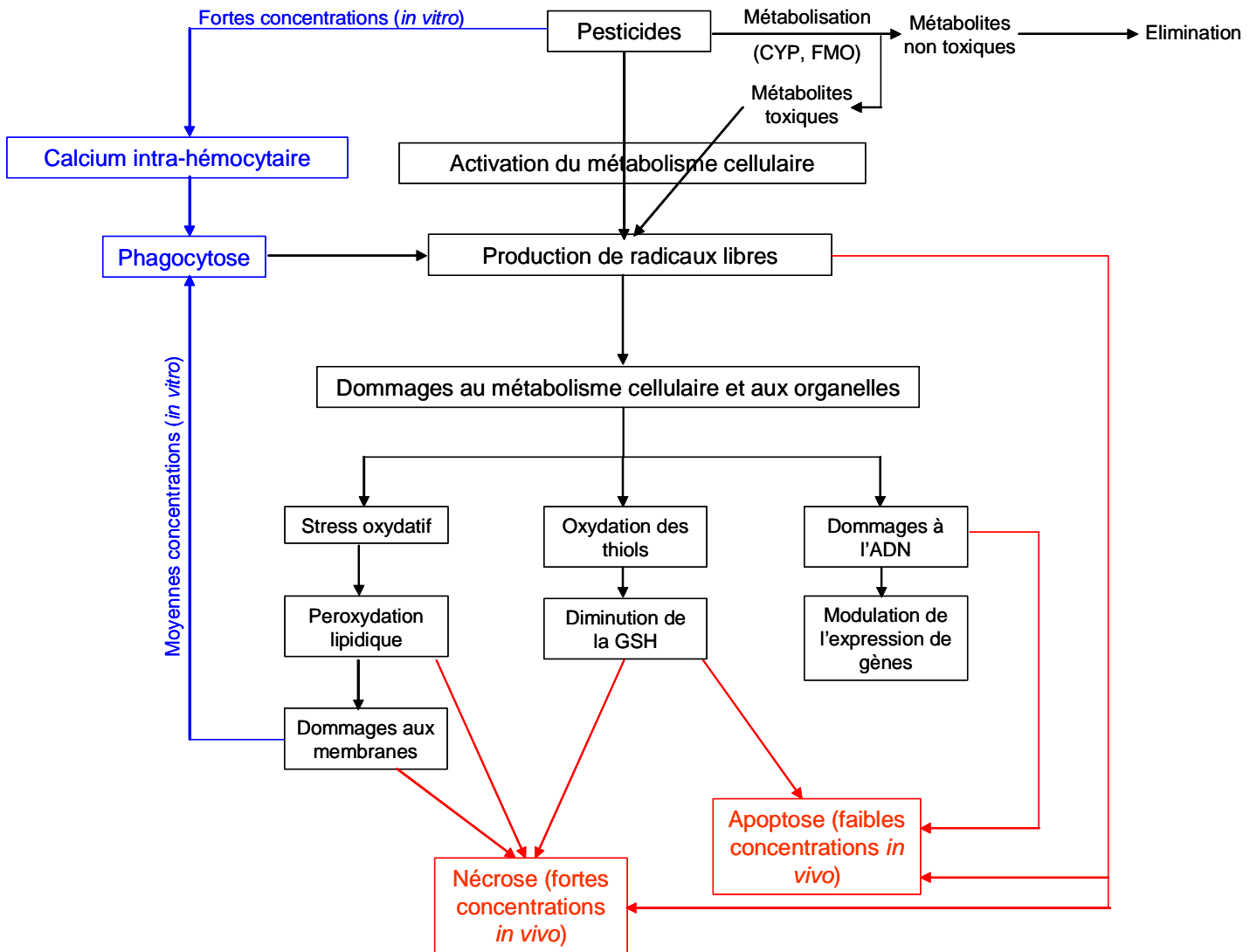


Figure 56 : mécanisme d'action des pesticides (modifié d'après Banerjee *et al.*, 2001). En noir : mécanismes d'action connus ; en rouge : aboutissement à la mort cellulaire ; en bleu : hypothèse de l'effet des pesticides sur la phagocytose.

comparaison à celles des autres molécules et, du fait de leur situation ubiquiste dans l'organisme, est considérée comme constante (Thellin *et al.*, 1999). Cependant, ces gènes peuvent voir leur expression varier en fonction de la situation car ces protéines ne sont pas seulement impliquées dans le métabolisme basal de la cellule, mais participent également à d'autres fonctions (Thellin *et al.*, 1999). L'utilisation de gènes comme références doit donc être examinée avec précaution, en considérant le type de cellule et le métabolisme cellulaire. Une étude rapporte que les ARN 18 S ou 28 S sont de bons standards internes pour la PCR en temps réel (Thellin *et al.*, 1999). Cependant, dans ce travail, le gène 18 S a souvent présenté des variations significatives entre le témoin et l'échantillon contaminé. C'est pourquoi le facteur d'élongation a été majoritairement utilisé comme gène de référence. Ceci a déjà été réalisé dans une autre étude chez *C. gigas* (Fabioux *et al.*, 2004; Huvet *et al.*, 2004; Bacca *et al.*, 2005). D'autres études ont utilisé l'actine (Huvet *et al.*, 2003). Cependant, une étude a rapporté que l'actine et le facteur d'élongation 2 étaient modulés par l'exposition à des pesticides (Tanguy *et al.*, 2005a). L'expression de l'actine et du facteur d'élongation 1 peuvent également être modifiées par les HAPs (Boutet *et al.*, 2004) ou par l'exposition à *P. marinus* chez *C. virginica* et chez *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004). Le choix du gène de référence apparaît donc comme primordial et doit être défini avant de commencer les analyses. Ce gène serait sans doute spécifique à chaque type d'expérience considéré.

La technique de PCR en temps réel est actuellement en plein développement et est de plus en plus utilisée dans tous types d'expériences. Cependant, les remarques formulées précédemment peuvent nous faire réfléchir sur l'intérêt d'utiliser la PCR en temps réel et sur sa sensibilité, qui apparaît comme un atout, mais qui peut aussi se transformer en contrainte. Certains auteurs défendent la sensibilité de la technique de PCR en temps réel et son intérêt dans l'étude des gènes (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002; Rees *et al.*, 2003; Storey, 2004). Cependant, bien que la PCR en temps réel soit la méthode la plus sensible pour mesurer l'abondance de transcrits, il peut exister de multiples sources d'erreur précédemment citées (lors de la purification de l'ARN et de la transcription reverse) et pendant le déroulement de la PCR, notamment au niveau de l'efficacité des couples d'amorces, qui peut varier à chaque PCR. L'analyse des données est basée sur un certain nombre d'hypothèses qui ne sont pas forcément toujours vérifiées lors de la mesure. De plus, plusieurs méthodes existent pour analyser les données et ces méthodes ne permettent pas forcément d'aboutir aux mêmes conclusions (Skern *et al.*, 2005).

IV.4.7. Mécanismes d'action des pesticides

Dans le but d'élucider les mécanismes d'action des pesticides sur la phagocytose, une étude a été menée en parallèle avec le même mélange de pesticides et leur effet sur le calcium intra-hémocytaire. Le calcium est un second messager impliqué en particulier dans les fonctions de

défense. Des travaux récents ont permis de mettre au point une méthode pour suivre les stocks de calcium intra-hémocytaire en cytométrie de flux (Aton *et al.*, 2006). Ces travaux ont montré que le mélange de pesticides a modifié la phagocytose et a diminué *in vitro* le calcium intra-hémocytaire aux plus fortes concentrations testées (Ambert, 2005). A des concentrations plus faibles, aucune modification du calcium hémocytaire n'a été mise en évidence, alors que des effets ont été trouvés sur la phagocytose (Ambert, 2005). Les composés organochlorés interagissent avec la plupart des systèmes biologiques et affectent les fonctions cellulaires (récepteurs, transport au niveau de la membrane cellulaire et activation enzymatique) (Banerjee *et al.*, 1996). Cependant, les pesticides n'interagissent pas directement avec les composants de la membrane cellulaire. Ils induisent la production d'enzymes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques chez les vertébrés (cytochrome P450, FMO, transférases) (Hodgson *et al.*, 1995). Les effets biologiques des pesticides sont initiés par les interactions entre une substance et des macromolécules spécifiques telles que des enzymes, des membranes, des cytokines et des acides nucléiques (Banerjee *et al.*, 2001). Le métabolisme de certaines classes de pesticides conduit à la production d'EOR et à une réduction des antioxydants tissulaires. Les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les herbicides stimulent la peroxydation lipidique des membranes et le stress oxydatif en induisant la production d'EOR et le cytochrome P450, en inhibant des enzymes contrôlant les EOR (SOD) ou les antioxydants (GSH) (Banerjee *et al.*, 2001). De nombreux pesticides peuvent induire l'apoptose des cellules à de faibles concentrations (<100 μ M) et la nécrose à de fortes concentrations (> 300 μ M) (Banerjee *et al.*, 2001). Une étude chez les thymocytes de souris a montré que les insecticides induisent une mort cellulaire par apoptose et nécrose (Olgun *et al.*, 2004).

Les travaux conduits jusqu'alors ont permis de montrer (1) que la présence d'un mélange de pesticides induit une diminution de la capacité de phagocytose des hémocytes au niveau cellulaire et (2) qu'une approche moléculaire permet de montrer une sous-expression de gènes pouvant être impliqués dans la phagocytose. Il est possible d'obtenir en laboratoire une modulation de certaines activités hémocytaires en présence d'un mélange de pesticides à des concentrations environnementales. D'après les différentes données de la littérature et les résultats observés dans ces travaux, il est possible de proposer un mécanisme d'action général pour les pesticides (**Figure 56**).

V Contamination *in vivo* d'huîtres avec du chlorure de mercure

Le chlorure de mercure est une molécule immunotoxique. Il provoque l'apoptose chez les cellules de mammifères (Kim & Sharma, 2004, 2005). Cette molécule a été utilisée dans le même type d'expériences que les pesticides afin de disposer d'une molécule ayant un mode d'action différent qui pourrait servir de référence.

V.1. Matériel et Méthodes

V.1.1. Animaux et protocole expérimental

Les huîtres utilisées provenaient d'un pool de six familles « R ». Elles ont d'abord été acclimatées de la même manière que pour les expériences menées avec les pesticides. Trois raceways ont été utilisés : un pour le témoin, un pour les animaux au contact du mercure à la plus faible concentration (50 ng.L⁻¹) et un pour la plus forte concentration (250 ng.L⁻¹). Les huîtres ont été réparties dans les casiers à raison de trois casiers par bac. Chaque bac contenait 200 huîtres. La gestion de l'eau et de la nourriture a été décrite au paragraphe IV.2. Du fait de la forte capacité d'évaporation du mercure et afin de protéger l'atmosphère de la pièce, des plaques en plexiglas ont été placées sur les bacs.

Deux solutions-mères de chlorure de mercure à 250 mg.L⁻¹ et 50 mg.L⁻¹ ont été préparées dans de l'acide nitrique 14 N. Ces solutions ont été diluées au 1/100^{ème} dans de l'eau distillée. Dix millilitres de ces solutions ont été ajoutés à 1990 mL d'eau de mer, puis les deux litres ont été répartis sur la longueur des bacs. L'eau a été changée quotidiennement, ainsi que le chlorure de mercure et la nourriture. De la même manière que pour les pesticides, trois échantillons d'eau ont été conservés à l'occasion d'un des renouvellements d'eau (avant le changement d'eau, 30 minutes après le rajout du mercure, dans le bac témoin) et ont été analysés par le PAE. Les échantillons ont été minéralisés, entraînés par un courant gazeux et dosés à l'état de vapeur monoatomique par spectrométrie de fluorescence atomique à 254 nm (Durand, communication personnelle).

Cette expérience a été réalisée trois fois.

V.1.2. Etude des paramètres hématocytaires en cytométrie de flux

A T = 1, 3 et 7 jours, l'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique de 20 animaux par condition (témoin, c1 (50 ng.L⁻¹), c2 (250 ng.L⁻¹)) (Annexe 2.1, 2.2). Au temps 0, jour d'ajout du

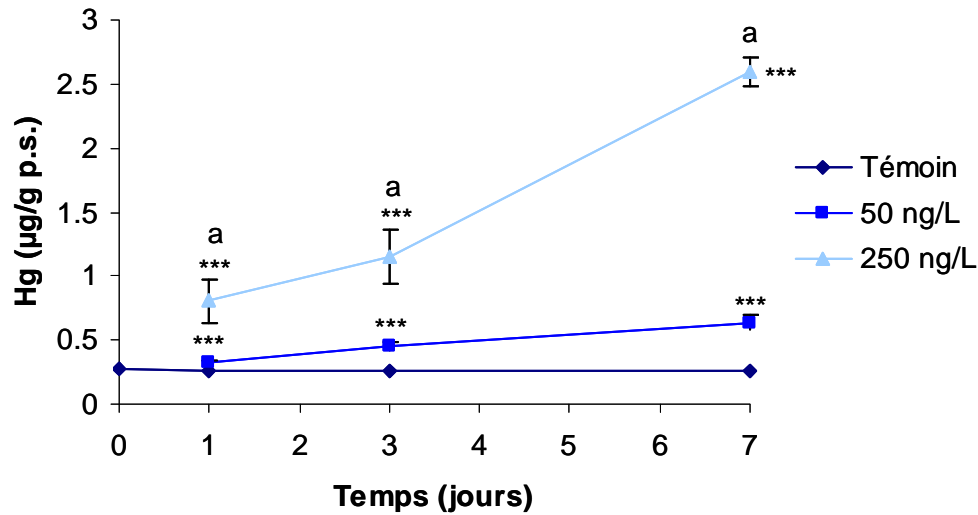


Figure 57 : concentration de mercure en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. dans les huîtres témoins et exposées aux deux concentrations ($50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ et $250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) de chlorure de mercure pendant sept jours. $N = 4$ réplicats. Les barres représentent la déviation standard. *** : $p < 0.001$ (différences entre une concentration et le témoin). a : $p < 0.01$ (différences entre les deux concentrations).

Concentrations théoriques	Concentrations détectées ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
Témoin	< 30
$50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ à 30 min	< 30
$50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ après 24h	< 30
$250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ à 30 min	140
$250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ après 24h	< 30

Tableau 16 : concentrations de chlorure de mercure ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) mesurées dans le témoin, 30 minutes après le changement d'eau et 24 h après.

chlorure de mercure, seuls 20 animaux ont été analysés. Pour chaque condition, quatre pools de cinq animaux ont été constitués et ont été analysés de la même manière que décrit précédemment en cytométrie de flux (IV.2.2).

V.1.3. Extraction d'ARN et analyses en PCR en temps réel

A T = 7 jours, l'hémolymphe de 20 huîtres par condition a été prélevée dans la cavité péricardique (**Annexe 2.2**). Les ARN des hémocytes ont été extraits et analysés par PCR en temps réel comme décrit précédemment (IV.2.3). Pour ces analyses, le gène 18 S a servi de gène de référence (CV =3.1 %). Les 19 gènes recherchés appartiennent à quatre phases de la phagocytose (cf IV.2.3 **Tableau 13, Annexe 2g**).

V.1.4. Quantification du mercure dans les tissus des huîtres

Pour toutes les analyses, les animaux ont été poolés par cinq. Les analyses ont été réalisées sur la masse totale des huîtres, sans distinction d'organes. Les animaux ont d'abord été séchés dans une étuve. Ils ont ensuite été broyés par lots, à l'aide d'un mortier, d'un pilon et d'une passoire afin de ne retenir que les parties les plus fines. Le broyat a ensuite été pesé dans un bécher de manière à obtenir une valeur proche de 100 mg de poids sec. Pour chaque lot, quatre réplicats ont été réalisés. Les valeurs obtenues pour les échantillons ont été certifiées par la comparaison à un contrôle, Tort-2 (broyat sec d'hépatopancréas de homard).

Les quantifications de mercure ont été réalisées au Centre Commun d'Analyses (CCA) sur le site de l'Université de La Rochelle avec un l'Advanced Mercury Analyser (AMA 254, Altec). Le principe de la mesure est de sécher (120°C) et décomposer (montée en température de 0 à 900°C) les échantillons dans un flux d'oxygène de manière à faire évoluer le mercure vers sa forme vapeur ; les composés qui ne sont pas du mercure sont alors piégés sur le catalyseur (notamment les chlorures), puis les vapeurs de mercure sont piégées sur un amalgameur en or. Ensuite, le mercure est relargué par chauffage de l'amalgameur, et l'analyse se fait par le principe de la spectrométrie d'absorption atomique dans les cellules de mesure. Il en existe deux : une petite pour les quantités de mercure comprises entre 0 et 40 ng, et une plus grande pour les valeurs comprises entre 40 et 600 ng. La limite de détection du mercure total est de 0.005 µg.g⁻¹ p.s.

		Mortalité	Granulocytes	Estérases			ROS			Lysosomes			Phagocytose	Cellules circulantes
				Cellules négatives	Population 1	Population 2	Cellules négatives	Population 1	Population 2	Cellules négatives	Population 1	Population 2		
Expérience 1	Tous temps		T>50=250 **	T<250 *	T<50=250 **	T>50=250 **	T<50=250 **				T<250 *	T>50=250 **		
	1 jour		T>250 *		T=50<250 **	T=50>250 **		T=50>250 *	T>50=250 *				T<250 *	
	3 jours	T<250 *		T<250 *	T<50=250 *	T>50=250 *	T<250<50 **	T>250 *				T>250 *		
	7 jours												T>250 *	
Expérience 2	Tous temps										T=50<250 **	T=50<250 **		T=50>250 **
	1 jour			T>50=250 *							T=50<250 *	T>250 *		T>250 *
	3 jours										T=50<250 *	T=50>250 *		T=50>250 *
	7 jours													
Expérience 3	Tous temps	50<250 *												
	1 jour										T<50=250 *			
	3 jours													
	7 jours	T=50<250 **	T>50 *							T>50 *	T<50 *			

Tableau 17 : résultats obtenus pour les trois réplicats de l'expérience *in vivo* de mise en contact d'huîtres « R » avec du chlorure de mercure à 50 ng.L⁻¹ et 250 ng.L⁻¹. T : animaux témoins, 50 : animaux contaminés avec 50 ng.L⁻¹ de chlorure de mercure, 250 : animaux contaminés avec 250 ng.L⁻¹ de chlorure de mercure. * : p<0.05 ; ** : p<0.01.

V.2. Résultats

V.2.1. Dosage de mercure dans les tissus

Les résultats montrent une augmentation significative de la concentration en mercure dans les tissus avec le temps pour les deux concentrations utilisées (50 et 250 ng.L⁻¹) (**Figure 57**). Dès le premier jour de contact, les huîtres présentent des concentrations supérieures au témoin pour les deux concentrations de mercure dans l'eau (**Figure 57**). Il est possible de calculer les facteurs de bioconcentration du mercure à sept jours pour chaque concentration : $BCF = \frac{[Hg]_{\text{contaminé}} - [Hg]_{\text{témoin}} (\mu\text{g.g}^{-1})}{[HgCl_2]_{\text{eau}} (\mu\text{g.mL}^{-1})}$. Le BCF est de 9 360 pour la concentration 250 ng.L⁻¹ et de 7 680 pour la concentration 50 ng.L⁻¹.

V.2.2. Concentrations du chlorure de mercure dans l'eau

Les mesures des concentrations de chlorure de mercure dans l'eau montrent une perte de mercure pour les deux concentrations (**Tableau 16**). Dans le bac à 50 ng.L⁻¹, la concentration réelle de chlorure de mercure est au maximum la moitié de celle attendue 30 minutes après le changement d'eau. La perte est d'autant plus importante 24 h après le changement d'eau (**Tableau 16**). Cependant, la limite de détection de 30 ng.L⁻¹ ne permet pas d'avoir des informations plus précises.

V.2.3. Effets du mercure sur les paramètres hématocytaires

Les paramètres hématocytaires présentent des réponses différentes entre les trois expériences (**Tableau 17**). La mortalité hématocytaire présente peu de variations, mais est ponctuellement plus importante chez les animaux contaminés avec 250 ng.L⁻¹ de HgCl₂ (**Tableau 17**). Le pourcentage de granulocytes diminue pour les deux concentrations par rapport au témoin lors de l'analyse tous temps confondus et après un jour pour la première expérience (**Tableau 17**). Le pourcentage de cellules fortement positives pour les estérases (cf première partie, **Figure 41**) diminue pour les deux concentrations par rapport au témoin lors de l'analyse tous temps confondus et à un et trois jours pour la première expérience uniquement (**Tableau 17**). Le pourcentage de cellules fortement positives pour les EOR (cf première partie, **Figure 43**) présente des variations significatives lors de la première expérience uniquement (**Tableau 17**). La population de cellules fortement marquées pour les lysosomes (cf première partie, **Figure 45**) diminue à 250 ng.L⁻¹ lors des deux premières expériences (**Tableau 17**). La phagocytose présente peu de variations. Le nombre de cellules circulantes diminue chez les animaux contaminés à 250 ng.L⁻¹ lors de la deuxième expérience seulement (**Tableau 17**).

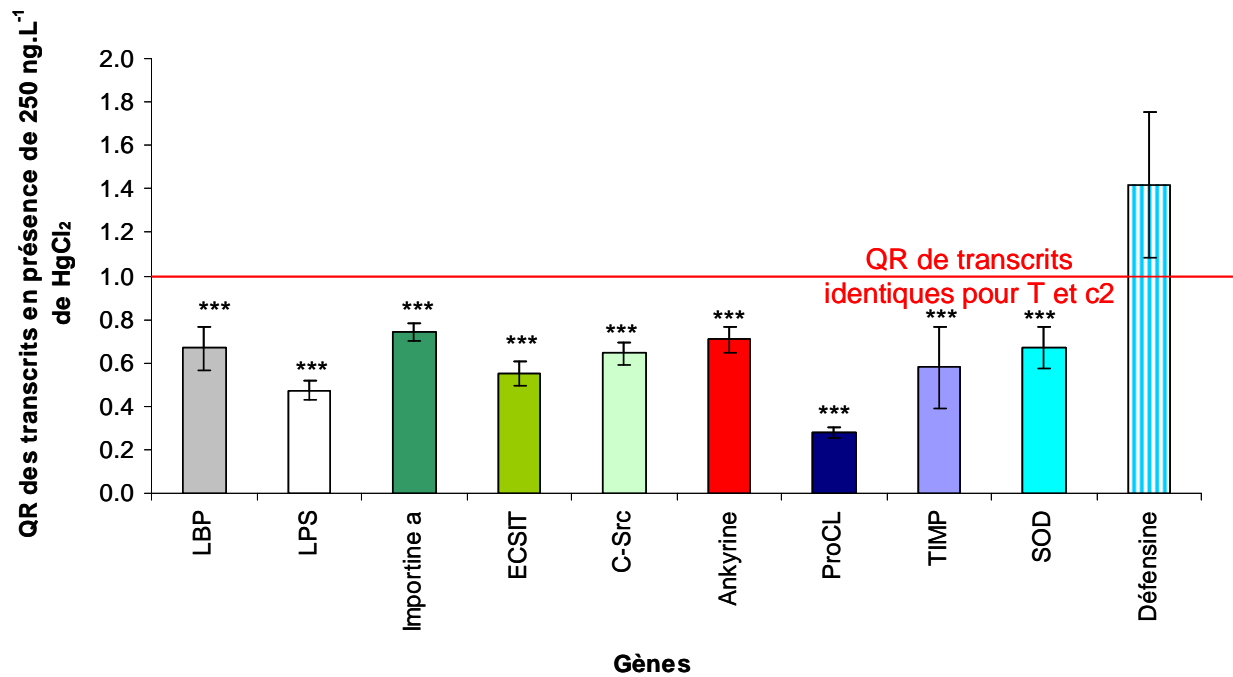


Figure 58 : quantités relatives (QR) (normalisées par le gène 18 S) des transcrits de onze gènes sélectionnés dans les hémocytes des animaux exposés à 250 ng.L⁻¹ de chlorure de mercure pendant sept jours. N = 3 réplicats intra-expérimentaux et 2 000 randomisations ; l'erreur standard est représentée. *** : p<0.001.

V.2.4. Effets du mercure sur l'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans la phagocytose

Seuls les échantillons provenant de la première expérience ont pu être étudiés en PCR en temps réel. Les quantités d'ARN disponibles n'ont permis de suivre que l'expression de dix gènes et ce uniquement pour les ARN provenant du témoin et de la concentration maximale (250 ng.L⁻¹). Parmi ces gènes, les quantités relatives de transcrits de neuf gènes sont sous-exprimés chez les animaux contaminés à 250 ng.L⁻¹ par rapport au témoin (p<0.001) (LBP et LPS pour la 1^{ère} phase ; importine- α , ECSIT et c-Src pour la 2^{ème} phase ; ankyrine pour la 3^{ème} phase ; procathepsine L, TIMP et SOD pour la 4^{ème} phase) (**Figure 58**). Seule la défensine ne montre pas de variations.

V.3. Discussion

Le mercure est connu pour sa forte toxicité et sa bioaccumulation dans de nombreux organismes (Cossa *et al.*, 1990). Le mécanisme général de la bioaccumulation, la méthylation du mercure, ses effets létaux et son écotoxicité ont été précédemment décrits (Cossa, 1985; Cossa *et al.*, 1990; Jonnalagadda & Rao, 1993; Moszczyński, 1997; Gagnaire, 2002; Casas, 2005).

Le chlorure de mercure est bioaccumulé dans les tissus, ce qui n'est le cas d'aucun des huit pesticides utilisés dans ce travail (cf IV.3.3). Le mercure s'accumule rapidement dans les tissus des huîtres, car la concentration est significativement supérieure chez les animaux contaminés dès le premier jour de contact. Les valeurs obtenues chez les huîtres contaminées à 250 ng.L⁻¹ atteignent 2.6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s. en fin d'expérience, ce qui est supérieur aux valeurs retrouvées dans les huîtres du Bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime) et au seuil fixé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la consommation (200 μg de mercure méthylé par jour pour un individu adulte). Ces valeurs sont également supérieures aux concentrations rapportées chez *C. virginica* sur des sites pollués dans la Baie de Tampa et de Pensacola aux Etats-Unis (Fisher *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003) ou chez *M. edulis* dans le lagon de Venise (Lowe & Fossato, 2000). Les valeurs de mercure obtenues chez les huîtres contaminées et sont proches de celles rencontrées chez les bivalves présents sur des sites contaminés.

Comme dans l'expérience impliquant des pesticides, il a été rapporté une forte diminution de la concentration du polluant dans l'eau par rapport à celle attendue. Ceci peut s'expliquer par la forte capacité du mercure à s'adsorber sur les parois et à s'évaporer (Cossa *et al.*, 1990).

Notre étude rapporte peu d'effets du mercure sur l'ensemble des paramètres hématocytaires suivis. Une augmentation de la mortalité a été parfois observée. Le mercure a induit une augmentation *in vivo* de la mortalité des hémocytes de *Mya arenaria* (Fournier *et al.*, 2001) et *in vitro* chez *C. gigas* (Gagnaire *et al.*, 2004). Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé pour les trois expériences. Le

pourcentage de granulocytes, le nombre d'hémocytes ainsi que les populations fortement marquées pour les estérases, les EOR et les lysosomes ont parfois diminué pour la plus forte concentration de mercure. Cependant, ces résultats ne sont pas reproductibles d'une expérience à l'autre et il est donc difficile de conclure à une véritable action du mercure sur les paramètres hématologiques. Le mercure peut augmenter *in vitro* la déstabilisation de la membrane des lysosomes chez *M. edulis* (Marchi *et al.*, 2004). La phagocytose n'a pas présenté de variation. Pourtant, ce paramètre est souvent modulé en présence de mercure. La phagocytose des hémocytes de plusieurs espèces de bivalves est activée *in vitro* par de faibles doses de HgCl₂ et de CH₃HgCl et inhibée par de fortes doses (Cheng & Sullivan, 1984; Brousseau *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002). Cette diminution a également été démontrée *in vivo* chez *Mya arenaria* (Fournier *et al.*, 2001). Plusieurs paramètres immunitaires (phagocytose, EOR, prolifération lymphocytaire, production d'IgM) sont diminués par le mercure lors d'une exposition *in vivo* chez *Oncorhynchus mykiss* (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999).

Le mercure est connu pour son immunotoxicité : il détruit les microtubules et augmente la concentration intracellulaire de calcium (Viarengo *et al.*, 1994), le lysozyme (Fletcher, 1986), la production d'EOR, l'expression des gènes du TNF- α et d'IL-1, et la peroxydation lipidique (Moszczynski, 1997; Kim & Sharma, 2003; Kim & Sharma, 2005), active la MAPK p38 (Kim & Sharma, 2005), diminue le contenu des cellules en GSH et la phagocytose (Contrino *et al.*, 1988) et induit l'apoptose (Shenker *et al.*, 2000; Araragi *et al.*, 2003; Kim & Sharma, 2003, 2004).

Le chlorure de mercure avait été choisi dans le cadre de ces expériences comme molécule toxique de référence. Avec les conditions expérimentales utilisées, il n'a pas été possible de confirmer cette toxicité au niveau cellulaire. Cependant, les concentrations étaient assez faibles et le temps d'exposition était court.

L'expression de neuf gènes potentiellement impliqués dans la phagocytose a été modulée par le chlorure de mercure à 250 ng.L⁻¹. Ces gènes appartiennent aux quatre différentes phases de la phagocytose (**Tableau 13**). A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté l'effet du mercure sur l'expression de gènes pouvant être impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas*. Une étude a rapporté l'effet du mercure sur l'expression de gènes de *C. virginica*. Le mercure a induit la modulation de l'expression de gènes assimilés à la cytokine, la pernine (catégorie de SOD), la cathepsine L, l'isocitrate déshydrogénase et des facteurs apoptotiques (Peatman *et al.*, non publié). Cependant, le sens des variations d'expression liées au mercure n'est pas précisé. Nos résultats montrent que malgré les faibles variations observées en cytométrie de flux des paramètres cellulaires, des effets précoces sont observés au niveau moléculaire. Il est possible d'envisager que si l'expérience avait duré plus longtemps, des effets auraient également pu être observés au niveau cellulaire.

VI Modulation des fonctions hématocytaires et sensibilité aux agents infectieux

Le but de ce travail était d'une part d'étudier la relation entre polluants, maladies infectieuses et système immunitaire afin d'approcher au maximum les conditions rencontrées dans l'environnement et d'autre part, de déterminer si les paramètres hématocytaires utilisés étaient des marqueurs du système immunitaire. En effet, dans les zones d'estuaire, les huîtres sont soumises de manière récurrente aux apports de polluants et doivent lutter contre les maladies infectieuses. Il convient donc de déterminer si la présence de contaminants modifie la sensibilité des animaux aux agents infectieux et que dans un milieu fortement contaminé, le risque de voir apparaître une maladie infectieuse est supérieur par rapport à une zone non ou peu polluée.

Deux grands types de maladies infectieuses sont particulièrement étudiés chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* au LGP : les bactéries du genre *Vibrio* (*Vibrio splendidus* plus particulièrement) d'une part, et des herpesvirus d'autre part, plus particulièrement OsHV-1, qui induit des maladies chez les larves et le naissain de *C. gigas*.

VI.1. Matériel et Méthodes

Les expériences ont débuté par une contamination des huîtres avec le mélange de pesticides de la même manière que décrit précédemment (cf IV.2.1). Après sept jours de contamination, les animaux ont été anesthésiés, puis injectés avec un couple de bactéries (souches 31 et 32) isolées d'épisodes de mortalité estivale de *C. gigas* et induisant de fortes mortalités en injection expérimentale supérieures aux mortalités induites par les deux bactéries individuellement (Gay, 2004).

VI.1.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes 31 et 32 (*V. splendidus*) ont été cultivées séparément à 20°C pendant 24 h en boîte de Pétri contenant du milieu Zobell solide (**Annexe 3.1**). Après 24 h, les bactéries ont été repiquées séparément dans 5 mL de milieu Zobell liquide (**Annexe 3.1**) et cultivées sous agitation pendant 24 h à température ambiante. Un volume égal de chaque suspension a été prélevé, et les deux volumes ont été mélangés. La concentration bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique à 540 nm avec un spectrophotomètre (UV-160, Shimadzu®). Si la valeur obtenue est supérieure à 1, la concentration est alors estimée à 10^9 bactéries.mL⁻¹. En fonction des expériences, un certain nombre de millilitres de culture ont été centrifugés 30 min à 2 000 g. Le culot a été repris



Figure 59 : infection expérimentale : injection de bactéries 31 + 32 dans le muscle adducteur de l'huître.

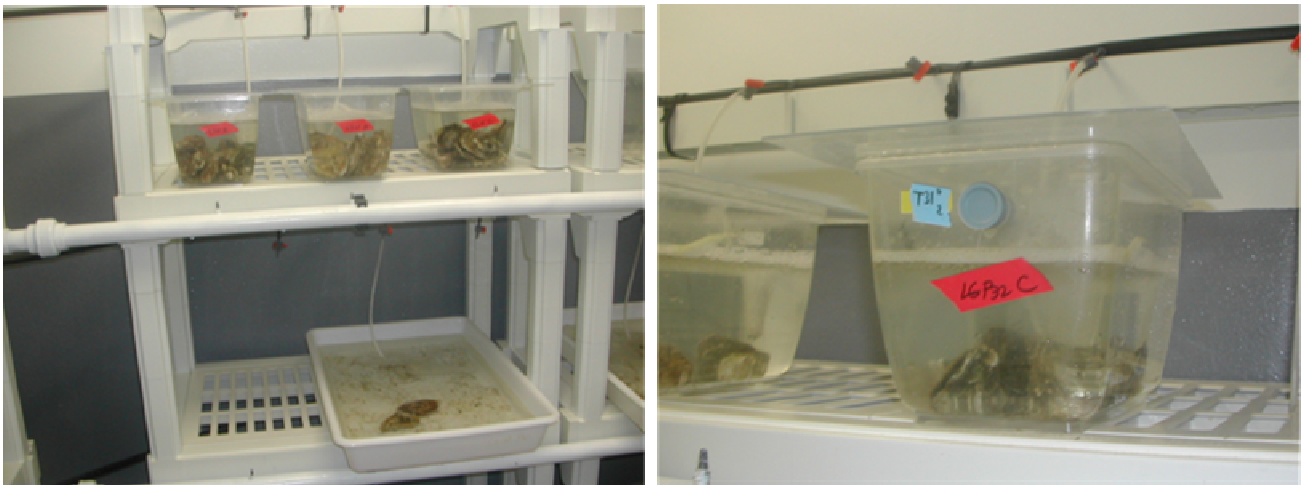


Figure 60 : aperçu du dispositif pour les infections expérimentales. Photo de gauche en haut et photo de droite : bacs contenant les huîtres après injection. Photo de gauche en bas : bac où les huîtres sont anesthésiées avant l'injection.

Type d'expérience	Concentrations finales de bactéries 31 + 32 utilisées	Témoin utilisé	Temps post-injection analysés	Type d'analyses effectuées à chaque temps post-injection
Détermination des concentrations de bactéries à utiliser	2.10 ⁸ 4.10 ⁷ 2.10 ⁷ 2.10 ⁶	-	2 h 4 h 24 h 48 h 72 h 120 h 144 h 168 h	suivi mortalités
Contamination pesticides + injection	2.10 ⁷	EDMAS	4 h 24 h 48 h 72 h	suivi mortalités + à 4 h et 24 h : extraction ARN
Contamination pesticides + injection	4.10 ⁷	EDMAS	4 h 10 h 24 h	suivi mortalités + extraction ARN

Tableau 18 : types d'expériences réalisées avec les injections de bactéries.

dans un nombre calculé de millilitres d'EDMAS (**Annexe 3.2**), la concentration finale variant en fonction des expériences (**Tableau 18**).

VI.1.2. Injection dans le muscle adducteur

Avant les expériences d'injection, les huîtres ont été placées dans une solution à 50 g.L^{-1} de MgCl_2 (250 g de MgCl_2 , 2 L d'eau de mer et 3 L d'eau douce), supplémentée en phytoplancton (*Isochrysis* sp.), pendant 2 à 3 h avec un bullage. Le chlorure de magnésium a pour effet de bloquer le muscle adducteur, valves ouvertes. Un volume de 50 μL de la solution finale de bactéries ou d'EDMAS a alors été injecté dans le muscle adducteur (**Figure 59**). Après injection, les animaux ont été répartis dans les aquariums (30 à 45 par aquarium), en conditions statiques avec un bullage, en duplicats pour chaque condition. Les aquariums ont été remplis la veille de chaque expérience avec 2.5 L d'eau de mer filtrée sur 0.45 μm et la salle était climatisée à 20°C (**Figure 60**). L'eau n'a pas été changée, mais du phytoplancton était ajouté chaque jour dans chaque aquarium. L'expérimentation a été arrêtée au bout de quelques jours (nombre variable suivant l'expérience considérée) (**Tableau 13**).

VI.1.3. Suivi de la mortalité

Des expériences ont d'abord été menées sans contamination par les pesticides afin de déterminer quelles étaient les mortalités occasionnées par différentes concentrations du couple de bactéries 31 + 32 en différents temps post-injection (2 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 144 h et 168 h). Différentes concentrations finales de bactéries par individu ont été testées en duplicats : 2.10^8 , 4.10^7 , 2.10^7 et 4.10^6 . Ces concentrations correspondent à l'ensemble des deux bactéries ; étant en concentrations équivalentes dans le mélange, la concentration de chaque bactérie est la moitié de celle indiquée précédemment. Ces expériences ont été réalisées trois fois. Dans les expériences d'injection précédées d'une contamination, la mortalité a été évaluée pour les différentes conditions.

VI.1.4. Extraction d'ARN et analyses en PCR en temps réel

Lors des expériences d'injection précédées d'une contamination, l'hémolymphe de 10 huîtres de chaque condition et pour chaque duplicat a été prélevée dans le muscle adducteur à différents temps post-injection (4 h, 10 h ou 24 h) (**Annexe 2.2**). Les ARN des hémocytes ont été extraits, leur concentration a été mesurée en DO (**Annexe 2.5.1**) et leur qualité a été contrôlée sur gel d'électrophorèse (**Annexe 2.5.2**). Les ARN ont été traités par la DNase (**Annexe 2.5.3**), transformés en ADNc par transcription inverse (**Annexe 2.5.4**) et analysés par PCR en temps réel (**Annexe 2.6**). L'expression de 19 gènes a été suivie (cf IV.2.3 **Tableau 13**, **Annexe 2g**).

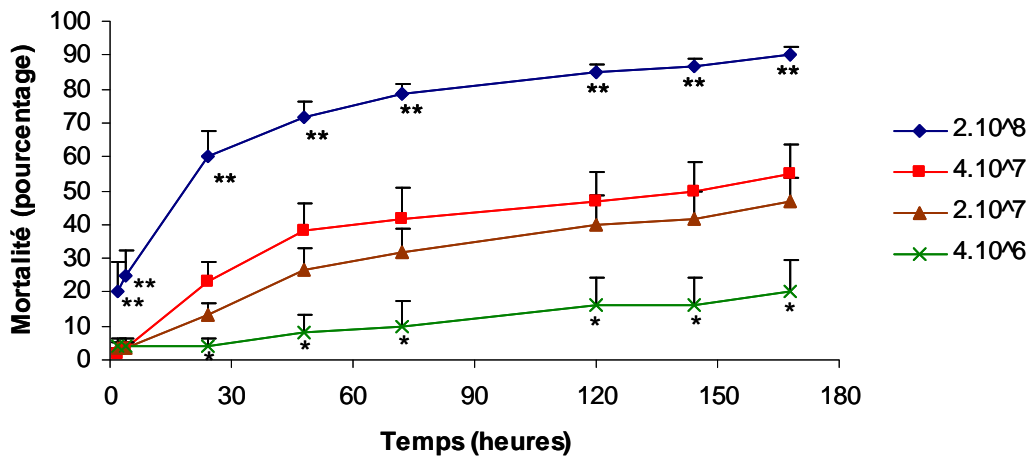


Figure 61 : pourcentage des mortalités induites par différentes concentrations du couple de bactéries (2.10^8 , 4.10^7 , 2.10^7 et 4.10^6) à différents temps post-injection (2 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 144 h et 168 h). N = 6 réplicats. Les barres représentent l'erreur standard. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

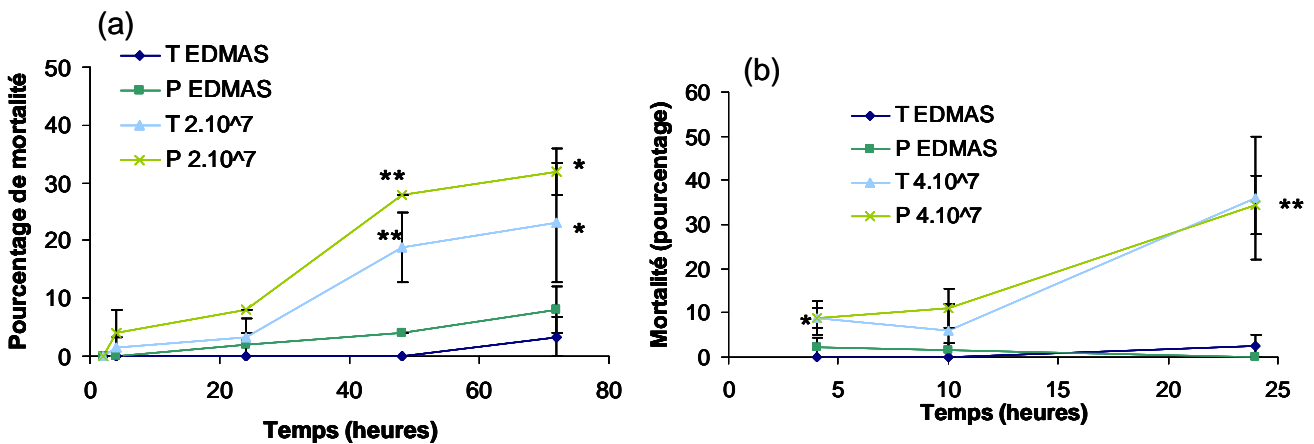


Figure 62 : pourcentages de mortalité obtenus lors d'expériences de contamination aux pesticides suivie d'une injection d'EDMAS ou de bactéries 31 + 32 à une concentration finale de (a) 2.10^7 bactéries par individu ou (b) 4.10^7 bactéries par individu. N = 2 réplicats. Les barres représentent l'erreur standard. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

(a) L'ANOVA a montré que tous temps confondus, la mortalité des huîtres contaminées (P) est supérieure à celle des huîtres témoins (T) ($p = 0.0119$, non représenté).

VI.2. Résultats

VI.2.1. Expériences d'injection sans contamination : suivi de la mortalité

L'injection de 4.10^7 et 2.10^7 bactéries par individu engendre entre 46.6 % et 55 % de mortalité à 168 h post-injection (**Figure 61**). Cependant, du fait de la variabilité entre les réplicats, les différences entre ces deux doses ne sont pas significatives. L'injection de 4.10^6 bactéries par individu provoque des mortalités significativement plus faibles que les autres concentrations : la mortalité est de 20 % à 168 h post-injection (**Figure 61**). L'injection de 2.10^8 bactéries par individu provoque des mortalités significativement supérieures : dès 2 h post-injection, la mortalité atteint 20 % alors qu'elle n'est que de 1.6 - 4 % pour les autres concentrations. A 168 h post-injection, la mortalité est de 90 % pour cette concentration (**Figure 61**).

VI.2.2. Expériences d'injection après contamination aux pesticides

Dans ces expériences, quatre conditions ont été étudiées (deux aquariums par condition) : huîtres (1) témoins injectées avec l'EDMAS, (2) témoins injectées avec les bactéries, (3) contaminées aux pesticides injectées avec l'EDMAS, (4) contaminées aux pesticides injectées avec les bactéries.

VI.2.2.1. Suivi de la mortalité

Après une contamination des huîtres aux pesticides, des injections de bactéries à la concentration 4.10^7 et 2.10^7 bactéries par individu ont fait l'objet de plusieurs expériences différentes.

Lors de l'injection de 2.10^7 bactéries par individu, la mortalité est significativement supérieure pour les huîtres témoins (T) et contaminées (P) injectées avec des bactéries par rapport à celles injectées avec de l'eau de mer à 48 h et 72 h post-injection (respectivement 28 % et 32 % pour les P injectées avec les bactéries, 18.9 % et 23.1 % pour les T injectées avec les bactéries, 0 - 8 % pour les huîtres T et P injectées avec de l'EDMAS) (**Figure 62a**). A 2 h, 4 h et 24 h post-injection, aucune différence n'est observée (**Figure 62a**). L'analyse de variance montre que tous temps confondus, la mortalité des huîtres contaminées (P) est supérieure à celle des huîtres témoins (T) quelle que soit la nature de l'injection (EDMAS ou bactéries) ($p < 0.05$).

Lors de l'injection de 4.10^7 bactéries par individu, la mortalité est significativement supérieure pour les huîtres témoins (T) et contaminées (P) injectées avec des bactéries par rapport à celles injectées avec de l'eau de mer à 4 h et 24 h post-injection (respectivement 8.8 % et 34.4 % pour les P injectées avec les bactéries, 8.7 % et 36.1 % pour les T injectées avec les bactéries, 0 - 2.5 % pour les huîtres T et P injectées avec de l'EDMAS) (**Figure 62b**). Aucune différence de mortalité n'est rapportée entre les huîtres témoins et contaminées aux pesticides.

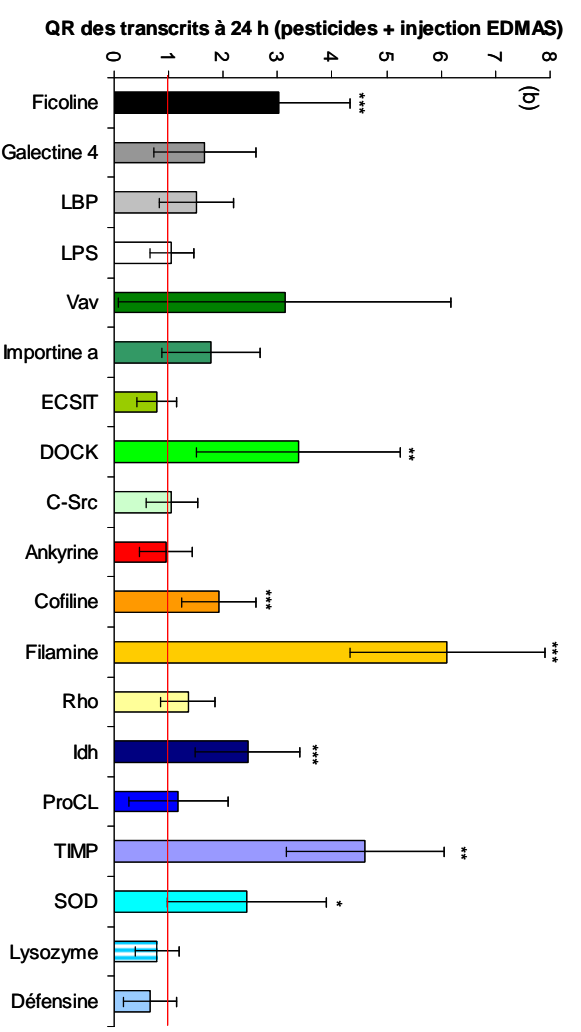
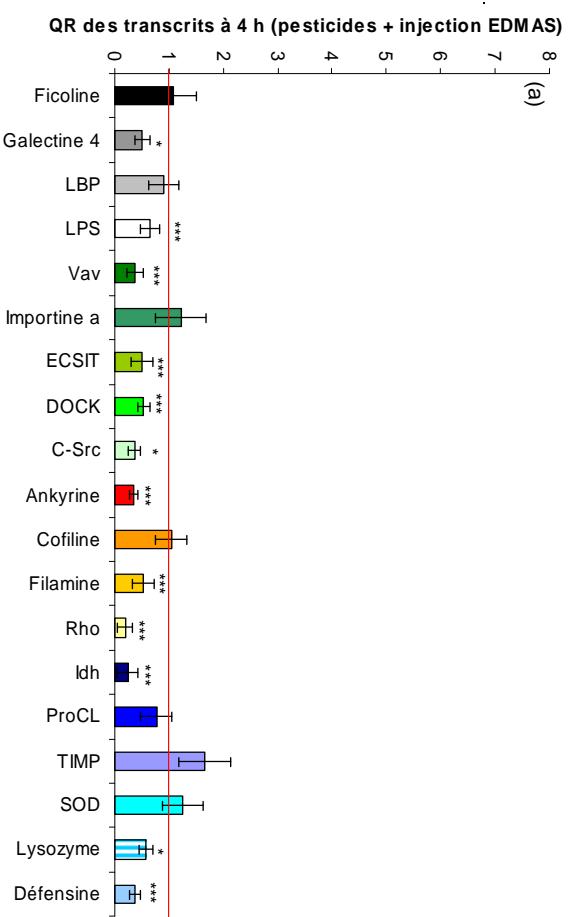


Figure 63 : quantités relatives (QR) des transcrits des gènes dans les hémocytes des animaux exposés aux pesticides en comparaison aux huîtres témoins 4 h (a) et 24 h (b) après injection d'EDMAS. N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. Le trait rouge correspond à une quantité de transcrits identique entre T et P (QR = 1).

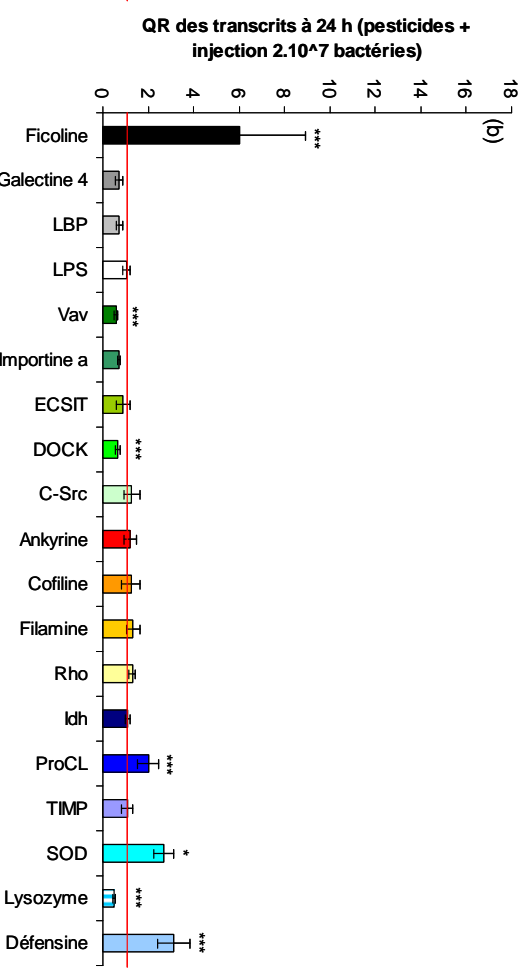
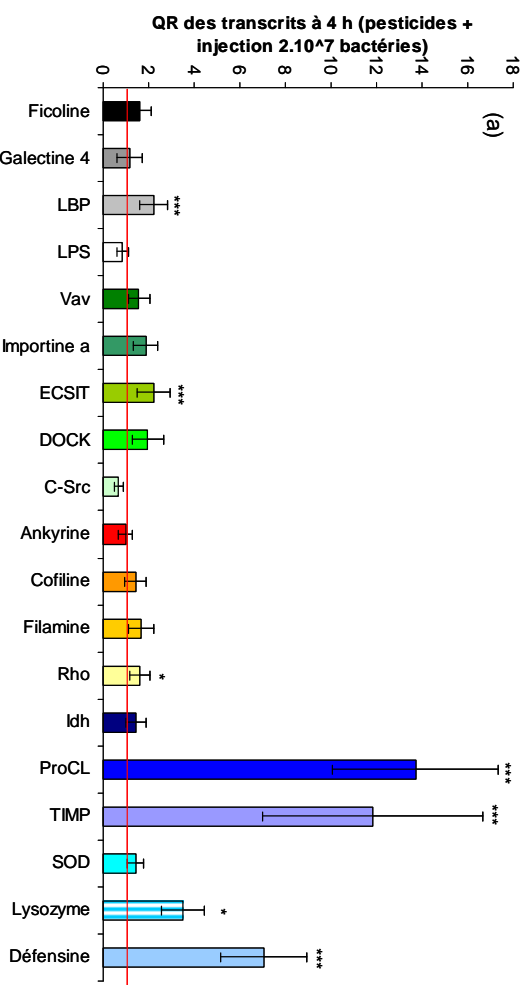


Figure 64 : quantités relatives (QR) des transcrits des gènes dans les hémocytes des animaux exposés aux pesticides en comparaison aux huîtres témoins 4 h (a) et 24 h (b) après injection de 2.10^7 bactéries. N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. Le trait rouge correspond à une quantité de transcrits identique entre T et P (QR = 1).

VI.2.2.2. Suivi de l'expression de gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense

Les expressions des gènes lors des expériences d'injection d'eau de mer après sept jours de contamination aux pesticides ont été normalisées avec le gène du facteur d'élongation (CV = 2.56 % à 4 h et 6.94 % à 24 h). A 4 h post-injection d'EDMAS, les quantités relatives de transcrits de 12 gènes sont significativement sous-exprimées par rapport au témoin (galectine et LPS pour la 1^{ère} phase ; Vav, ECSIT, Dock et c-Src pour la 2^{ème} phase ; ankyrine, filamine et Rho pour la 3^{ème} phase ; isocitrate déshydrogénase, lysozyme et défensine pour la 4^{ème} phase) (**Figure 63a**). A 24 h post-injection, les quantités relatives de transcrits de sept gènes, dont trois communs avec ceux modifiés à 4 h post-injection, sont significativement sur-exprimées par rapport au témoin (ficoline pour la 1^{ère} phase ; Dock pour la 2^{ème} phase ; cofiline et filamine pour la 3^{ème} phase ; isocitrate déshydrogénase, TIMP et SOD pour la 4^{ème} phase) (**Figure 63b**).

Les expressions des gènes lors des expériences d'injection de 2.10^7 bactéries par individu après sept jours de contamination aux pesticides ont été normalisées avec le gène du facteur d'élongation (CV = 3.04 % à 4 h et 4.02 % à 24 h). A 4 h post-injection, les quantités relatives de transcrits de sept gènes sont significativement sur-exprimées par rapport au témoin (LBP pour la 1^{ère} phase ; ECSIT pour la 2^{ème} phase ; Rho pour la 3^{ème} phase ; procathepsine L, TIMP, lysozyme et défensine pour la 4^{ème} phase) (**Figure 64a**). A 24 h post-injection, les quantités relatives de transcrits de quatre gènes, dont trois communs avec ceux modifiés à 4 h post-injection, sont également significativement sur-exprimées par rapport au témoin (ficoline pour la 1^{ère} phase ; procathepsine L, SOD et défensine pour la 4^{ème} phase). Trois gènes sont également sous-exprimés par rapport au témoin (Vav et Dock pour la 2^{ème} phase ; lysozyme pour la 4^{ème} phase) (**Figure 64b**).

Les expressions des gènes lors des expériences d'injection de 4.10^7 bactéries par individu après sept jours de contamination aux pesticides ont été normalisées avec le gène du facteur d'élongation (CV = 4.2 % à 4 h et 4.88 % à 24 h). A 4 h post-injection, les quantités d'ARN disponibles n'ont permis de suivre que l'expression de 14 gènes. Les quantités relatives de transcrits de sept gènes sont significativement sous-exprimées par rapport au témoin (ficoline et galectine pour la 1^{ère} phase ; c-Src pour la 2^{ème} phase ; ankyrine pour la 3^{ème} phase ; SOD, lysozyme et défensine pour la 4^{ème} phase) et sur-exprimées par rapport au témoin pour un gène, l'ECSIT (2^{ème} phase) (**Figure 65a**). A 24 h post-injection, les quantités relatives de transcrits de 14 gènes sur 19 recherchés, dont six communs avec ceux modifiés à 4 h post-injection, sont significativement sur-exprimées par rapport au témoin (ficoline, galectine et LBP pour la 1^{ère} phase ; Vav, importine α et c-Src pour la 2^{ème} phase ; ankyrine, cofiline et filamine pour la 3^{ème} phase ; procathepsine L, TIMP, SOD, lysozyme et défensine pour la 4^{ème} phase) (**Figure 65b**).

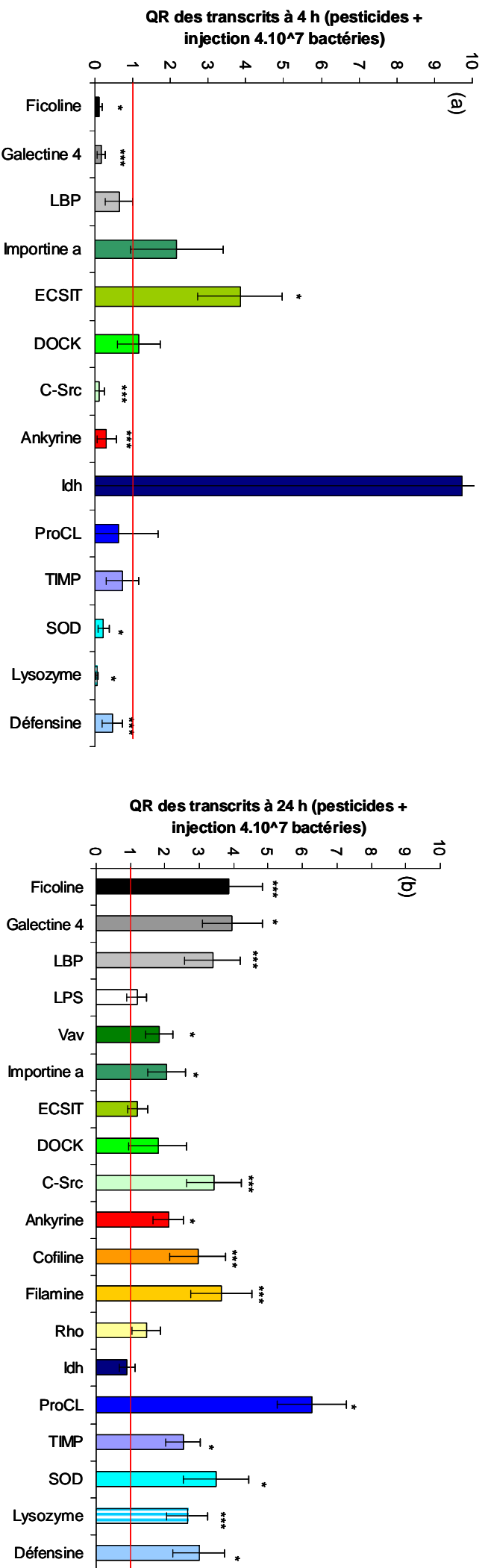


Figure 65 : quantités relatives (QR) des transcrits des gènes dans les hémocytes des animaux exposés aux pesticides en comparaison aux huîtres témoins 4 h (a) et 24 h (b) après injection de 4.10⁷ bactéries. N = 3 réplicats ; l'erreur standard est représentée. * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001. Le trait rouge correspond à une quantité de transcrits identique entre T et P (QR = 1).

VI.3. Discussion

Des études réalisées au LGP de La Tremblade ont permis d'établir une collection de 125 souches de *Vibrio* potentiellement virulents, isolés à partir de lots d'huîtres subissant des épisodes de mortalités estivales et appartenant aux groupes *V. splendidus* et *V. aesturianus* (Gay, 2004). Lors de tests en infection expérimentale de ces souches, individuellement ou par couple, des interactions positives (collaboration) ou négatives (antagonisme) ont été observées entre certaines souches (Gay *et al.*, 2004a). Notamment, cette étude a montré que le taux de mortalité induit par le couple de deux souches nommées 31 et 32 (appartenant au groupe *V. splendidus*) était significativement supérieur à celui induit par les souches 31 et 32 inoculées individuellement (Gay *et al.*, 2004a). Cependant, la cause de ce phénomène de collaboration est inconnue. Nous avons choisi d'étudier l'effet de ce couple lors des expériences de contamination avec des pesticides.

Une étude réalisée précédemment au laboratoire a permis de caractériser les altérations tissulaires et les localisations des bactéries après injection du couple 31 et 32 (Gay *et al.*, 2004b). Le muscle adducteur est le seul organe présentant systématiquement des altérations (Gay *et al.*, 2004b). Au niveau macroscopique, le muscle présente une faiblesse. Cette faiblesse a également été constatée lors des expériences réalisées dans cette étude. Au niveau microscopique, les bactéries sont présentes à la périphérie du muscle adducteur ou dans le tissu conjonctif l'entourant, alors que l'organe tout entier présente des lésions. Cependant, ces lésions, caractérisées par des cellules musculaires rondes et la condensation des fibres musculaires, sont plus nombreuses dans la partie translucide du muscle (**Figure 66**) (Gay *et al.*, 2004b). Chez quelques rares individus, une intense leucocytose a pu être observée au sein des faisceaux musculaires (Gay *et al.*, 2004b).

Une étude en cytométrie de flux réalisée sur le contact entre différentes souches de *Vibrio* (dont 31 et 32) et les hémocytes de *C. gigas* a démontré l'apparition d'une population cellulaire (« C ») composée de cellules de plus grande complexité lors des contacts avec les bactéries, virulentes ou non, mais plus importante dans le cas des bactéries virulentes (**Figure 67**) (Gay, 2004). D'autre part, le taux de cellules ayant phagocyté des bactéries était supérieur pour la souche 32, et la mortalité hémocytaire était supérieure pour les souches 31 et/ou 32 (Gay, 2004).

Dans nos expériences, nous n'avons pas utilisé la baignade pour infecter les huîtres car cette technique s'est révélée inefficace pour transmettre cette maladie (Gay *et al.*, 2004b). Les bactéries ont été injectées dans le muscle adducteur. Cette approche a déjà été réalisée dans le cadre d'infections expérimentales (Gay *et al.*, 2004a; Huvet *et al.*, 2004; Allam *et al.*, 2006). Cependant, les injections peuvent également être effectuées dans la cavité palléale (Hauton *et al.*, 2001; Tanguy *et al.*, 2004), la cavité péricardique (Renault *et al.*, 1995a; Hervio *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004a, b) ou la gonade (Suzuki *et al.*, 1998). Les études précédentes ont montré que la mortalité apparaît

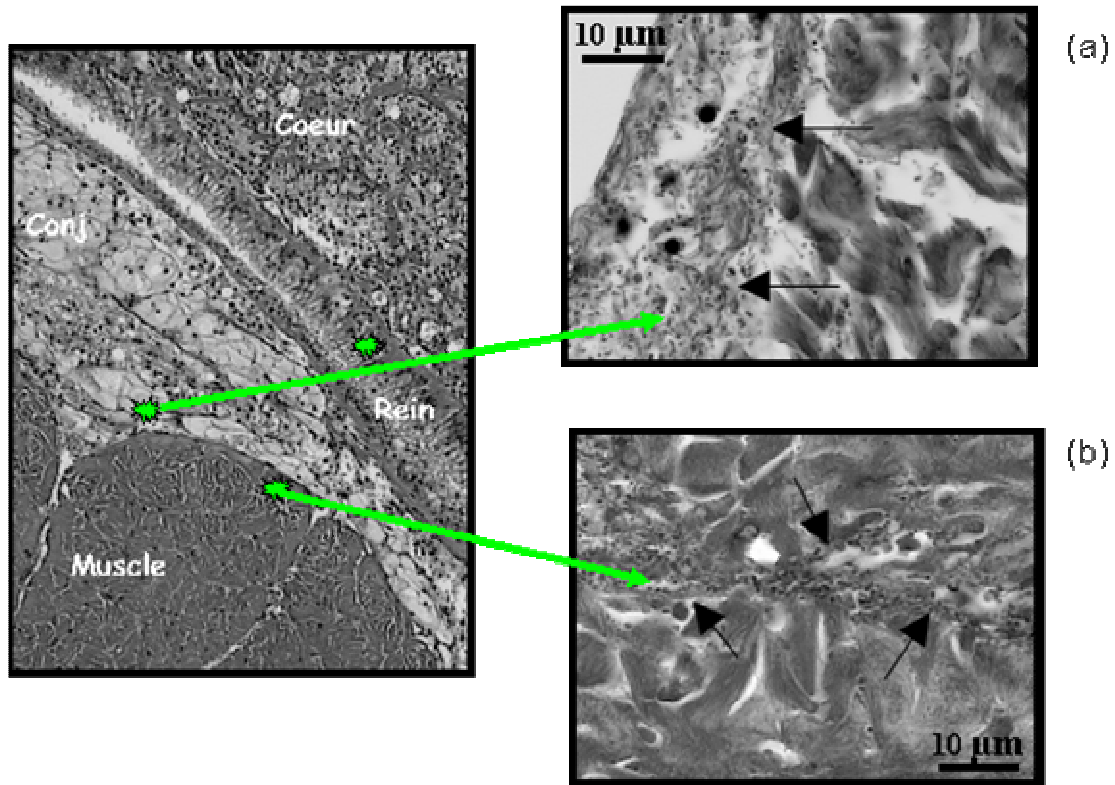


Figure 66 : localisation des bactéries (flèches noires) après les infections expérimentales par injection dans le muscle adducteur : (a) entre les fibres musculaires à la périphérie du muscle adducteur ; (b) dans le tissu conjonctif autour du muscle adducteur. Source : (Gay *et al.*, 2004b).

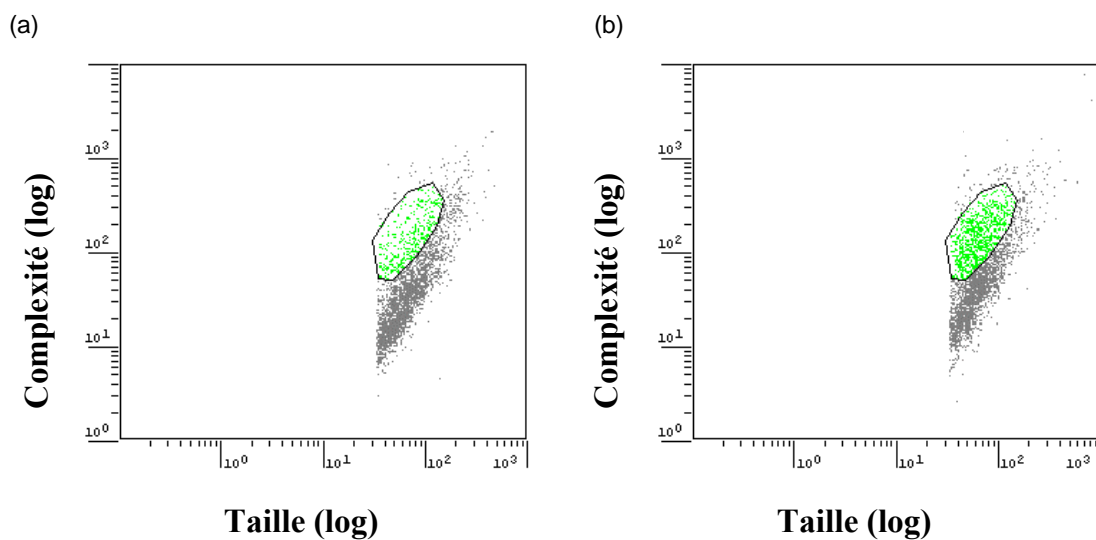


Figure 67 : population "C" (zone verte) sur un cytogramme taille/complexité apparaissant suite à un contact des hémocytes avec la souche 125 (a) ou avec les souches 31+32 (b).

après sept jours suite à une injection dans la cavité palléale et après 24 h suite à une injection dans le muscle adducteur (Gay *et al.*, 2004b). Comme nous cherchions à obtenir une réponse rapide, l'injection dans le muscle adducteur a été choisie. Les bactéries ont été injectées après anesthésie des huîtres par du chlorure de magnésium. Cette technique peut altérer les fonctions de l'hôte, mais dans la mesure où tous les animaux (y compris ceux injectés avec de l'eau de mer) ont subi le même conditionnement, il est possible de comparer les résultats. Certaines études d'infection expérimentale sont basées sur la réalisation d'une ouverture dans la coquille, cet orifice étant ensuite rebouché avec de la résine (Hauton *et al.*, 2001).

Les expériences préliminaires visant à déterminer les quantités de bactéries à utiliser pour les expériences d'injection après contamination ont montré que les mortalités induites par le couple de bactéries 31 et 32 sont importantes : 24 h après l'injection, les mortalités varient entre 15 % et 22 % lorsque les doses injectées étaient de $2 \cdot 10^7$ CFU (colony forming unit).animal⁻¹ ou $4 \cdot 10^7$ CFU.animal⁻¹ et de 60 % pour la dose $2 \cdot 10^8$ CFU.animal⁻¹. Cette dernière dose provoquant d'importantes mortalités, il apparaît difficile d'observer d'éventuelles différences de mortalité entre animaux témoins et contaminés. La dose la plus faible ($4 \cdot 10^6$ CFU/animal) ne provoquant à l'inverse quasiment aucune mortalité a également été écartée. Les deux doses retenues ont donc été $2 \cdot 10^7$ CFU.animal⁻¹ et $4 \cdot 10^7$ CFU.animal⁻¹. En effet, les pourcentages de mortalité à sept jours induits par ces deux concentrations étaient proches de 50 %. Les expériences ont donc permis de déterminer une DL50 à sept jours pour ces bactéries. Une inoculation d'une si grande quantité de bactéries n'est pas représentative d'un phénomène d'infection se produisant dans le milieu. Cependant, cette dose a été retenue car, dans le cadre de nos expériences de courte durée, il était nécessaire d'induire une réponse du système immunitaire (Hauton *et al.*, 2001).

Les travaux précédents ont montré que la mortalité liée au couple 31 et 32 apparaît 24 h après l'injection et qu'elle atteint 60 % à 72 h post-injection (Gay *et al.*, 2004a, b). Pour la même dose de bactéries injectées ($4 \cdot 10^7$ CFU.animal⁻¹), nous avons rapporté des mortalités plus faibles (40 %) à 72 h post-injection. Les travaux sur les infections expérimentales utilisent souvent des doses fortes de bactéries. Il faut injecter entre 150 000 (Renault *et al.*, 1995a) et 10^6 (Hervio *et al.*, 1995) CFU de *B. ostreae* pour voir apparaître une mortalité d'*O. edulis* après deux à trois mois. L'injection de 10^9 bactéries de *Vibrio anguillarum* ne provoque pas de mortalité chez *O. edulis* (Hauton *et al.*, 2001). L'injection de 10^6 CFU de *P. marinus* ne provoque pas de mortalité chez *C. gigas* et *C. virginica* (Tanguy *et al.*, 2004). L'injection de $8 \cdot 10^6$ CFU d'un birnavirus chez l'huître perlière japonaise, *Pinctada fucata*, induit une mortalité après 48 h (Suzuki *et al.*, 1998). L'injection de $5 \cdot 10^7$ CFU de *V. tapetis* chez *R. philippinarum* induit une mortalité de 14 % à sept jours post-

injection. Cependant, les mêmes quantités de *V. tapetis* et de *V. anguillarum* n'induisent pas de mortalité chez *M. mercenaria* et *C. virginica* (Allam *et al.*, 2006).

Les résultats de cette étude montrent qu'après injection d'EDMAS, la mortalité des animaux contaminés aux pesticides était plus importante que celle des animaux témoins (**Figure 62**). Cependant, ce résultat n'est pas reproductible car dans le cadre d'une autre expérience, aucune différence de mortalité n'a été démontrée entre T et P (**Figure 62**).

Les résultats ont également rapporté qu'après une injection de 2.10^7 CFU.animal⁻¹, la mortalité des animaux contaminés aux pesticides était plus importante que celle des animaux témoins (**Figure 62**). Ce résultat n'a pas été retrouvé après injection de 4.10^7 CFU.animal⁻¹. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les pesticides peuvent modifier la sensibilité de l'hôte en termes de mortalité. Cette différence ne serait plus visible lorsque la dose de bactéries injectée est trop forte.

Certains des paramètres évalués au cours de ce travail ont présenté une importante variabilité entre expérimentations. Ainsi, le taux de mortalité à 24 h après injection dans le muscle adducteur du couple 31 et 32 variait suivant les expérimentations de 10 à 40 % (données non montrées). Ceci pose le problème de la maîtrise de la variabilité lors de la manipulation d'organismes pathogènes. Le fait de partir de nouvelles sous-cultures des bactéries pour chaque expérience peut être critiqué car toutes les sous-cultures ne semblent pas présenter la même virulence. La croissance des bactéries a été mesurée par lecture de DO, mais nous n'avions pas de moyens pour vérifier la virulence des cultures. Nous avons utilisé des huîtres maintenues en structure expérimentale de leur naissance à leur utilisation, ce qui peut réduire la variabilité inter-individuelle présente chez les bivalves (Bachère *et al.*, 1991; Pipe *et al.*, 1995a; Gay, 2004). De plus, les bactéries sont présentes en quantité importante dans l'hémolymphe d'animaux sains (Canesi *et al.*, 2002b). Chez *C. gigas*, une étude a démontré qu'il existe 10^8 bactéries.mL⁻¹ dans les fèces, 10^7 bactéries.mL⁻¹ dans les sucs gastriques, 10^5 bactéries.mL⁻¹ dans le stylet cristallin et 10^4 bactéries.mL⁻¹ dans les branchies, les fluides du manteau, les diverticules digestifs et dans le muscle adducteur. Parmi ces bactéries, 37 % sont des *Pseudomonas* et 14 % des *Vibrio* (Kueh & Chan, 1985). Le fait d'injecter des bactéries pathogènes dans un organisme où de nombreuses bactéries commensales sont présentes rend plus complexe la compréhension des mécanismes d'action des bactéries pathogènes. Dans notre modèle, nous ne connaissons pas les interactions entre ces différents types de bactéries.

Dans toutes les expériences de contamination suivies d'injection de bactéries, les expressions de gènes chez les animaux contaminés ont été comparées à celles des animaux témoins. Nous ne pouvons donc examiner que l'effet des pesticides sur les gènes différenciellement exprimés entre les animaux contaminés et les témoins injectés tous deux avec les bactéries ou l'EDMAS. En aucun cas

nous ne pouvons étudier l'effet des bactéries ou de l'EDMAS sur les gènes exprimés chez les témoins seuls ou chez les animaux contaminés seuls.

Parmi tous les gènes suivis, ceux correspondant à la défensine, au lysozyme, à la SOD et à la ficoline ont été les plus fréquemment modulés lors des expériences d'injection (respectivement cinq, cinq, quatre et quatre fois). Ces gènes ont été sélectionnés afin de proposer des hypothèses pouvant expliquer les mécanismes d'action des pesticides sur la réponse aux agents pathogènes. Les gènes correspondant à la procathepsine L et à TIMP, bien que moins souvent modulés (3 fois), ont été sélectionnés également car leur implication dans les réactions aux maladies est documentée.

Après sept jours de contamination aux pesticides et quatre heures après une injection d'eau de mer, l'expression des gènes dans les animaux contaminés par rapport aux animaux témoins est du même type que l'expression obtenue après sept jours de contamination seuls. En effet, sans injection, les 19 gènes sont sous-exprimés ; quatre heures après l'injection d'eau de mer, 12 gènes sont sous-exprimés. Sept gènes ont donc vu leur expression retourner au même niveau que pour les témoins. Parmi ces gènes, trois appartiennent à la 4^{ème} phase de la phagocytose, qui est la phase de réactions post-phagocytaires et mécanismes de protection cellulaire (TIMP, SOD et procathepsine L). TIMP intervient dans les réactions à une agression et dans la guérison des blessures. Une étude a démontré que chez *C. gigas*, les ARNm de TIMP sont accumulés dans les hémocytes trois à six heures après une blessure de la coquille et le maximum est atteint après neuf heures (Montagnani *et al.*, 2001). L'injection peut donc provoquer une réaction chez les animaux. Il est possible de poser l'hypothèse que comme la substance injectée n'est pas nocive (eau de mer), tous les animaux, qu'ils aient été contaminés par les pesticides ou non, sont capables de réagir face à la blessure et de produire des molécules telles que TIMP leur permettant de guérir cette blessure.

Quatre heures après l'injection de 2.10^7 bactéries par individu, la réponse des gènes est différente en comparaison à l'expression quatre heures après l'injection d'eau de mer ou à l'expression après la contamination sans injection : sept gènes sont sur-exprimés en présence de pesticides en comparaison au témoin, alors que la réponse dans les autres conditions est une sous-expression de gènes induite par les pesticides. Les gènes tels que TIMP, la défensine, le lysozyme et la procathepsine L ont vu leur expression augmenter chez les animaux contaminés en comparaison aux témoins. Aucun de ces gènes n'est sur-exprimé par les animaux contaminés quatre heures après injection d'eau de mer. Les pesticides, en présence de bactéries, ont donc favorisé l'expression de ces quatre gènes.

Vingt-quatre heures après l'injection d'eau de mer, sept gènes sont sur-exprimés chez les animaux contaminés par rapport aux témoins (dont TIMP, SOD et ficoline) alors que 12 gènes sont sous-exprimés différenciellement et sept gènes non différents 4 h après l'injection. Vingt quatre heures

après l'injection de 2.10^7 bactéries par individu, plusieurs gènes sont sur-exprimés chez les animaux contaminés en comparaison aux témoins (dont la ficoline, la défensine, la SOD, la procathepsine L). Ceci est comparable aux résultats de l'expression des gènes obtenus 24 h après l'injection de 4.10^7 bactéries où 14 gènes (dont la ficoline, TIMP, la défensine, le lysozyme, la SOD, la procathepsine L) ont été sur-exprimés dans les échantillons contaminés par rapport au témoin. Quelle que soit la substance injectée, le gène correspondant à la ficoline a été sur-exprimé. La ficoline semble donc correspondre à une réponse liée à l'injection, mais non spécifique des bactéries. Aucune relation n'a été démontrée entre la quantité de ficoline et des infections respiratoires chez des enfants (Atkinson *et al.*, 2004). D'autres gènes (TIMP, SOD, lysozyme, défensine et procathepsine L) ont été sur-exprimés par les animaux contaminés seulement en présence de bactéries.

Il ressort de ces résultats que les pesticides semblent favoriser l'expression de gènes tels que TIMP, la SOD, le lysozyme, la défensine et la procathepsine L. Des sur-expressions de certains de ces gènes dans le cadre d'une infection ont été rapportées dans la littérature. Une étude a montré que l'injection d'un cocktail de quatre *Vibrio* (10^8 CFU.mL⁻¹) chez *C. gigas* a induit une augmentation de la quantité d'ARNm de TIMP en comparaison avec l'injection d'eau de mer (Montagnani *et al.*, 2001). Une étude a montré que la concentration des défensines était plus élevées chez des patients atteints de maladies du poumon que chez des patients sains (Ashitani *et al.*, 1998). Les défensines sont retrouvées à un niveau élevé dans le cas de septicémie et de méningites (Ashitani *et al.*, 1998). Les cathepsines B, D et L sont présentes en quantités élevées après une infection à *Pseudomonas aeruginosa*, agent d'une maladie pouvant conduire à la nécrose de la cornée (Dong *et al.*, 2001). Le lysozyme augmente dans le cas d'une infection de *R. philippinarum* à *V. tapetis* (Allam *et al.*, 2000; Allam *et al.*, 2006). La SOD protège les cellules des EOR et est sécrétée lorsque la production de ceux-ci augmente, par exemple dans le cas d'une infection (Ge *et al.*, 2004). L'expression de la SOD a été augmentée chez *C. virginica* infectée par *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004). Des protéines impliquées dans la réponse aux LPS ont été sur-exprimées chez la planorbe, *Biomphalaria glabrata*, lors de l'exposition au parasite *Schistosoma mansoni* (Miller *et al.*, 2001; Raghavan *et al.*, 2003) ou *Echinostoma caproni* (Mitta *et al.*, 2005).

Une plus grande expression de ces gènes pourrait donc être interprétée comme une meilleure défense des animaux face à l'infection bactérienne après une contamination aux pesticides. Cependant, la forte expression de ces gènes lors d'infections a également été démontrée comme corrélée à des dommages à l'hôte, une sur-expression pouvant intervenir dans la pathogénèse et le développement des lésions.

Les mécanismes adaptatifs développés par les organismes supérieurs pour faire face aux agressions sont si complexes qu'ils peuvent être à l'origine d'une infinie variété de désordres pathologiques, par un ensemble multifactoriel de circonstances aboutissant à un cercle vicieux, où des mécanismes initialement développés pour la défense de l'organisme se révèlent puissamment pathogènes (Revillard, 1998). L'inflammation est une réponse normale et immédiate à l'infection ou aux dommages tissulaires qui est destinée à éradiquer les agresseurs et permettre de réparer les tissus (cf rappels bibliographiques, IV.1.1). La réaction inflammatoire est bénéfique lorsque ce phénomène est contrôlé. Dans l'inflammation « bénéfique », les événements cellulaires suivent une séquence prédéfinie : les neutrophiles migrent rapidement vers le site de la blessure, le temps de contact avec les cellules endothéliales est minime, les sécrétions des neutrophiles sont contrôlées et, une fois l'agent pathogène détruit, la réponse cesse (Haslett *et al.*, 1989). Le processus inflammatoire est fortement régulé, impliquant à la fois des signaux qui initient et maintiennent cette inflammation et des signaux qui terminent le processus (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Un déséquilibre entre ces deux types de signaux peut laisser l'inflammation sans contrôle, résultant en des dommages cellulaires et tissulaires (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Des lacunes dans le contrôle des processus inflammatoires peut initier des mécanismes d'amplification conduisant à une inflammation permanente (Haslett *et al.*, 1989). Les réactions inflammatoires sont délétères car elles agissent directement contre les tissus normaux à la place ou en plus d'agir contre les pathogènes (Hakim, 1993). Une inflammation excessive peut conduire, dans ses formes les plus sévères, causer des décompensations physiologiques, des dysfonctions d'organes et la mort (Levy, 1996; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

Chez les vertébrés, la réaction inflammatoire est à l'origine des signes et des lésions tissulaires d'un grand nombre de maladies et représente elle-même une cause majeure de mortalité. A la suite d'une infection bactérienne, l'inflammation créée par l'hôte est souvent responsable de la plus grande partie des dommages aux tissus et des symptômes de la maladie (Mims, 1987). La mise en jeu des mécanismes immunitaires de défense anti-infectieuse peut conduire à une réaction inflammatoire généralisée entraînant, dans ses formes les plus graves, au syndrome inflammatoire aigu systémique (SIAS), majoritairement observé dans le cadre d'infections bactériennes (Bhatia & Mochhala, 2004). Les réponses inflammatoires peuvent également conduire à des dysfonctionnements d'organes lors de septicémies ou de chocs hémorragiques (Bhatia & Mochhala, 2004). Un autre exemple d'un effet néfaste de l'inflammation sur les tissus de l'hôte est la septicémie. La septicémie est une expression systémique de l'activation généralisée des défenses de l'hôte. Elle est le reflet de l'interaction entre les systèmes pro- et anti-inflammatoires et de l'activation incontrôlée du système immunitaire qui peut conduire à des dysfonctions d'organes et la mort (Pinsky, 2004).

Les polluants tels que les pesticides semblent donc modifier la réponse de l'hôte aux pathogènes en provoquant une sur-expression de gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense. Par analogie avec ce qui existe chez les organismes supérieurs, il est possible de considérer que cette sur-expression deviendrait néfaste pour l'hôte en provoquant des dommages tissulaires. Cependant, les mécanismes par lesquels l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, répond aux agents infectieux restent largement inconnus.

Les cathepsines sont impliquées dans les réactions inflammatoires, mais leur activité excessive ou prolongée ou inappropriée peut créer des effets néfastes dans le corps (Sugawara, 2005). L'infection due à *Pseudomonas aeruginosa* induit une inflammation qui peut se poursuivre par des atteintes de la cornée liées à une augmentation de la quantité de cathepsines (plus la quantité de cathepsines augmente, plus les lésions sont importantes) (Dong *et al.*, 2001). Les défensines humaines peuvent être responsables en partie de la pathogénèse de maladies du poumon (Ashitani *et al.*, 1998). Des études ont montré qu'une sur-expression de la SOD peut être létale aux cellules mammaliennes (McCord & Edeas, 2005). Il apparaît que la SOD agit en tant que protecteur des tissus jusqu'à un certain point, au-delà duquel la protection est perdue et les blessures sont exacerbées, conduisant à une peroxydation lipidique (McCord & Edeas, 2005). Les TIMP sont retrouvés à des niveaux élevés pendant les hépatites et leur augmentation est reliée à des dommages aux hépatocytes (Flisiak *et al.*, 2005). Certaines molécules peuvent également être relarguées lors d'une inflammation et peuvent être à l'origine de dommages à l'hôte. L'oxyde nitrique (Bogdan, 2001; Wahl *et al.*, 2003) et les EOR (Ge *et al.*, 2004) peuvent être autotoxiques et contribuer aux dommages tissulaires. Les cytokines et les facteurs NF- κ B peuvent également être responsables de dommages tissulaires lors d'une inflammation importante (Victor *et al.*, 2004).

Certains gènes n'ont pas montré de régulation d'expression lors de l'injection de bactéries (LPS, isocitrate déshydrogénase, protéine Rho). Cependant, cela ne veut pas dire qu'ils ne sont pas impliqués dans la réponse immunitaire, car ils peuvent (1) être régulés en réponse à d'autres tests d'épreuve bactériens que celui réalisé ici, (2) être régulés à un autre niveau que celui de la transcription ou (3) être des gènes immunitaires non régulés. Les études à venir devraient focaliser sur leur implication potentielle dans le système immunitaire.

Chez les vertébrés, les études menées sur les effets de polluants et la sensibilité des animaux aux maladies ont permis d'identifier les mécanismes immunitaires qui étaient affectés. Lors de la contamination de souris par la dieldrine suivie de l'injection du virus MHV-3 (Mouse Hepatitis Virus 3), les réponses immunitaires des lymphocytes T sont supprimées et la mortalité des animaux

est importante (Fournier *et al.*, 1988). Une étude chez la souris a permis de montrer que le chlorure de mercure aggrave l'infection par le virus HSV-2 en augmentant la réplication et la dissémination du virus, ce qui correspond aux mécanismes de défense non-spécifiques, mais sans altérer son élimination, donc sans affecter les mécanismes spécifiques (Christensen *et al.*, 1996). Après une exposition de carpes *Cyprinus carpio* au cadmium et une infection par la douve du sang, *Sanguinicola inermis*, l'apparence ultrastructurale et le contenu cellulaire du thymus et du pronéphros étaient altérés (Hoole *et al.*, 2003). Chez la grenouille, *Rana pipiens*, une exposition à un mélange de six pesticides diminue la prolifération des lymphocytes T et ces animaux immunodéprimés présentent une augmentation de la prévalence d'un parasite trématode (Christin *et al.*, 2003).

Chez les mollusques bivalves, certains travaux ont tenté de relier la présence de contaminants et la sensibilité aux maladies infectieuses. Cependant, peu d'études ont essayé de relier l'ensemble à une modification du système de défense de l'hôte. Des relations entre effets sur les paramètres hématocytaires et augmentation de la sensibilité aux maladies ont été proposées, mais la démonstration n'a pas été réalisée. La contamination de *C. virginica* par du sédiment augmente l'intensité de l'infection à *P. marinus* et augmente également la susceptibilité des animaux à de nouvelles infections (Chu & Hale, 1994) mais aucun paramètre cellulaire ou humoral n'est modifié (Chu *et al.*, 2002). Le TBT augmente également la progression de cette même infection et la mortalité, mais sans affecter les activités de défense (Anderson *et al.*, 1996). D'autres études rapportent au contraire des modifications des paramètres cellulaires lors d'expériences similaires. La contamination de *M. edulis* avec du cadmium suivie d'une balnéation des animaux avec *V. tubiashii* résulte en l'augmentation du nombre d'hémocytes chez les animaux contaminés (Pipe & Coles, 1995). Dans la même expérience impliquant du cuivre, la production d'O₂⁻ est diminuée. De plus, dans les deux cas (cuivre et cadmium), la mortalité des animaux contaminés et mis en présence de *V. tubiashii* a augmenté, suggérant une suppression des défenses lors de l'exposition au polluant (Pipe & Coles, 1995), mais sans réellement le démontrer au niveau cellulaire. Une autre étude rapporte que lors d'une contamination avec du cuivre, du cadmium, du zinc ou du mercure suivie d'une balnéation avec un birnavirus, la mortalité de *Meretrix lusoria* était supérieure à celles des animaux seulement contaminés ou seulement mis en présence du virus (Chou *et al.*, 1998). Cependant, aucune information n'a été apportée sur la modification éventuelle des fonctions de défense. Une étude a rapporté des variations de la phagocytose lors de présence de contaminants et d'agent pathogènes. Une contamination avec de faibles concentrations de cuivre et une balnéation de *V. tubiashii* induit une augmentation de la phagocytose chez *M. edulis*, alors que la réponse est inversée lors de l'utilisation de concentrations plus élevées (Parry & Pipe, 2004).

Cette étude est la première à proposer un lien entre paramètres hématocytaires et système immunitaire chez les bivalves en démontrant qu'une diminution d'une activité de phagocytose de billes peut conduire à une augmentation de la sensibilité des huîtres à une maladie bactérienne.

Les paramètres hématocytaires représentent un modèle intéressant pour l'étude des interactions hôte/pathogène du fait de leur implication dans les mécanismes de défense. De nombreux auteurs ont observé des interactions entre des bactéries pathogènes et les hématocytes de mollusques lors d'expérimentations *in vitro* et/ou *in vivo*. Cependant, il apparaît nécessaire d'utiliser des outils différents, tels que le suivi de l'expression de gènes, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des pathogènes et les possibles interactions des polluants chez les bivalves (Snape *et al.*, 2004). Plusieurs études ont cherché à mettre en place de nouveaux biomarqueurs au niveau de l'expression des gènes, tels que la cathepsine D et les HSP70 (Carnevali & Maradonna, 2003) ou le cytochrome P450 1A, la vitellogénine et les MT (McClain *et al.*, 2003) chez le poisson. Les ARNm sont considérés comme un outil permettant d'identifier une exposition chimique (McClain *et al.*, 2003).

VII Conclusion

Les expériences *in vivo* ont permis de montrer que des facteurs environnementaux tels que la température et la salinité peuvent moduler les paramètres hématologiques à des valeurs extrêmes. Les résultats ont également montré que, lors d'une contamination *in vivo* à long terme au diuron, les paramètres hématologiques pouvaient être modulés, mais pouvaient également restaurer leurs niveaux d'activité et s'adapter de cette manière à la pollution chronique à laquelle ils étaient confrontés. Une contamination de courte durée au chlorure de mercure n'a pas induit d'effet répétable sur les paramètres hématologiques, mais a diminué l'expression de gènes pouvant être impliqués dans la phagocytose, laissant ainsi penser que les huîtres pourraient être sensibles à ce composé à plus long terme.

Les expériences *in vivo* sur un mélange de huit pesticides à des concentrations environnementales ont permis de confirmer l'effet des pesticides sur la phagocytose lors d'analyses en cytométrie de flux. Ce mélange a également provoqué une sous-expression de gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense et en particulier dans la phagocytose. Ces expériences ont permis d'établir un modèle d'affaiblissement de l'organisme qui a pu servir à la suite des expériences, à savoir l'étude de la relation entre présence de polluants et sensibilité de l'huître aux maladies infectieuses.

Dans ce cadre, des expériences d'injection de bactéries ont été réalisées après la contamination aux pesticides. Ces expériences ont rapporté une augmentation de l'expression de gènes pouvant être impliqués dans la phagocytose. Ce résultat peut être au premier abord considéré comme une meilleure réponse de l'hôte à l'infection. Cependant, la mortalité des animaux a également augmenté en présence de pesticides lors de l'injection de 2.10^7 bactéries. Nous avons démontré qu'avant l'injection de bactéries, la phagocytose des animaux contaminés était diminuée par rapport aux témoins. Dans ce contexte, il est alors possible de formuler l'hypothèse qu'une sur-expression de gènes peut être nocive pour l'organisme et être associée à la pathogénèse. Ainsi, des huîtres présentant des activités hématologiques diminuées en présence de pesticides peuvent présenter une différence de réponse à une maladie infectieuse de type bactérien.

L'expression de gènes suspectés d'être impliqués dans les mécanismes de défense s'avère être un biomarqueur d'intérêt dans le cadre de l'étude des effets de polluants sur les huîtres. Cependant, le mécanisme final de la réponse des animaux ne pourra être appréhendé que par l'étude de la traduction des ARNm en protéines (protéomique).

De nombreux facteurs tels que la concentration du polluant, la durée d'exposition, l'espèce utilisée et les cycles saisonniers incluant la reproduction peuvent influencer le système immunitaire et la sensibilité de l'hôte aux maladies (Pipe & Coles, 1995). Si les contaminants environnementaux exercent suffisamment d'influence sur le système immunitaire des bivalves pour augmenter leur sensibilité à des maladies infectieuses, ce phénomène doit être évalué et surveillé.

Les expériences *in vivo* permettent de suivre l'effet des polluants et en particulier de pesticides à l'échelle de l'individu. Cependant, ces expériences en laboratoires présentent des limites. Les données ne suffisent pas à établir un niveau exact de toxicité et à extrapoler à la notion de risque (Colosio *et al.*, 2005). Ces études sont à compléter par des études sur le terrain. Alors que les études en laboratoire permettent de prouver des liens entre une exposition à des polluants et un effet spécifique, les études sur le terrain restent le seul moyen de vérifier les relations de cause à effet proposées et le valider l'intérêt pour les populations (Galloway & Depledge, 2001).

Quatrième partie

Analyse *in situ* de paramètres hémocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*



I Introduction

La première description du phénomène de « mortalité estivale » de l'huître creuse, *C. gigas*, remonte à 1945 sur la côte Pacifique du Japon (Koganezawa, 1974). Ces mortalités massives (50 % à 60 % du cheptel) sont apparues simultanément dans plusieurs régions pendant la période estivale, associées à des températures élevées et des ressources trophiques importantes. Ces conditions sont favorables à une forte croissance et au développement de la gamétogénèse chez *C. gigas* (Imai *et al.*, 1965; Glude, 1974; Koganezawa, 1974). Les relations entre la maturation de la gonade, le métabolisme énergétique et les mortalités ont alors été explorées. Les mortalités semblaient être dues à « un désordre physiologique et des perturbations métaboliques liées à la formation de la gonade et à la ponte, aux températures de l'eau élevées et à l'eutrophisation » (Mori, 1979).

A la fin des années 50, des mortalités de *C. gigas* ont été rapportées pour la première fois sur la côte Ouest des Etats-Unis (Glude, 1974; Beattie, 1988; Cheney *et al.*, 2000). Des études ont également impliqué la maturation gonadique et la perte des réserves en carbohydrates (glycogène) dans ces épisodes de mortalité (Perdue *et al.*, 1981). Cette faible condition d'énergie pourrait conduire à augmenter la sensibilité des huîtres à différents facteurs de stress (hypoxie, augmentation de la salinité, prolifération de pathogènes, dus aux fortes températures). De cette époque datent les premiers programmes de sélection de souches et le développement d'huîtres triploïdes. Des familles issues de parents sélectionnés pour leur résistance accrue au phénomène de mortalités estivales présentaient une amélioration des taux de survie (Beattie *et al.*, 1980). Dans les années 1980, l'implication d'une bactérie, *Nocardia crassostrea*, a été proposée dans les épisodes de mortalité estivale aux Etats-Unis. Cependant, elle n'a pas été rapportée systématiquement lors les mortalités (Friedman *et al.*, 1999).

Les productions sur les côtes françaises d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont également subi périodiquement des mortalités depuis 20 ans (Renault *et al.*, 1994b; Gouletquer *et al.*, 1998; Soletchnik *et al.*, 1999). Les études ont pu conforté l'idée que ces mortalités résultent de facteurs multiples comprenant les fortes températures, le risque physiologique associé à la maturation, les pratiques culturelles, les pathogènes et les polluants (Renault *et al.*, 1994b; Gouletquer *et al.*, 1998; Soletchnik *et al.*, 1998b). Des mortalités importantes de juvéniles ont été rapportées en France en particulier en 1994 et 1995. La détection de virus de type herpès (OsHV-1) a été faite lors de ces épisodes de mortalité et laisse suspecter l'implication de ce virus dans les phénomènes observés (Renault *et al.*, 1994b). Cependant, si le pouvoir pathogène du virus a été clairement démontré au stade larvaire chez les huîtres (Renault *et al.*, 1995c), la démonstration reste à faire pour les juvéniles. Le virus OsHV-1 a également été rapporté récemment chez *C. gigas* en Californie

(Friedman *et al.*, 2005). Par ailleurs, des souches de *Vibrio* sont probablement responsables de certains épisodes de mortalités estivales. Des bactéries *V. splendidus* ou *V. aestuarianus* ont été isolées d'épisodes de mortalité (Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a) et ont induit des mortalités lors d'infections expérimentales (Lacoste *et al.*, 2001c; Waechter *et al.*, 2002; Gay, 2004). La sensibilité des huîtres aux bactéries *Vibrio* semble également liée à la maturation sexuelle (Gay, 2004). Cependant, aucun agent pathogène n'a été rapporté systématiquement lors des épisodes de mortalités estivales. Les agents infectieux tels que le virus de type herpès et les bactéries du genre *Vibrio* peuvent représenter une cause expliquant une partie des épisodes de mortalité.

Depuis 1996, les mortalités estivales de *C. gigas* sont étudiées dans le bassin de Marennes-Oléron (Lodato, 1997). Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer et les pratiques culturales ont été prises en compte. Malgré les variations inter-annuelles et inter-cheptels, la mortalité des huîtres élevées à proximité du sédiment est toujours supérieure de 20-30 % à la mortalité des huîtres élevées sur des tables plus éloignées du sédiment (Soletchnik *et al.*, 1999, 2003, 2005). L'allocation d'énergie à la reproduction et la croissance somatique et coquillère sont plus faibles à proximité du sédiment. Cette mortalité différentielle n'a cependant jamais été reliée avec la qualité du sédiment ou avec la quantité de matière organique présente dans la colonne d'eau.

En 2001, l'IFREMER a initié un projet pluridisciplinaire sur l'étude des mortalités estivales de *C. gigas* (MOREST, 2001-2005). Ce projet a permis d'étudier l'importance de différents facteurs en couplant des études en laboratoire et sur le terrain grâce à l'implication de nombreuses disciplines (génétique, physiologie, immunologie, écophysiologie, écotoxicologie et pathologie). Un programme de sélection de souches a été lancé dans le cadre du programme MOREST (Dégremont *et al.*, 2005). Il a été possible de produire des huîtres dites « résistantes » ou « R » présentant de faibles mortalités sur estran, et des huîtres « sensibles » ou « S », présentant de fortes mortalités sur estran. L'héritabilité de ce phénomène est apparue comme importante (chaque nouvelle génération présentait le même type de résultat). Cette différence de résistance entre souches suggère l'implication d'un facteur génétique dans ces événements de mortalité (Beattie *et al.*, 1980; Dégremont, 2003).

Le suivi de paramètres hématocytaires a trouvé logiquement sa place dans le programme MOREST. Il est basé sur l'hypothèse que les animaux présentant des mortalités possèdent des capacités de défense réduites. Les variations de l'environnement, en particulier la présence de polluants, peuvent être à l'origine de cette réduction des capacités de défense, pouvant rendre les animaux plus sensibles aux maladies infectieuses. Dans le cadre du programme MOREST, deux expériences de suivi d'animaux d'origines génétiques différentes placés sur le site atelier de Ronce Perquis (Charente-Maritime) ont été réalisées. Les paramètres hématocytaires de ces animaux ont été mesurés régulièrement tout au long des périodes d'étude.

II Suivi de paramètres hémoctaires en relation avec la maturation sexuelle et les mortalités estivales chez trois populations d'huîtres (DYNAMO, 2002) (Articles 3 et 4)

Article 3 : Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters (Aquaculture, sous presse) (cité dans le texte comme « Gagnaire *et al.*, sous presse b »)

Les résultats rapportés dans cet article proviennent d'une expérience intitulée DYNAMO (DYNamique de Mortalités), conduite à La Tremblade et mise en place par le LERPC (Laboratoire Environnement Ressources Poitou-Charentes, IFREMER) de mars à septembre 2002. Trois cheptels d'huîtres d'origines génétiques différentes (triploïdes, diploïdes d'écloserie et diploïdes de captage naturels) ont été mis en élevage sur l'estran (Ronces-les-Bains, Charente-Maritime) sur des tables à 15 ou 70 cm au-dessus du sol (**Figure 68**). Des prélèvements réguliers ont été effectués, et les paramètres hémoctaires (mortalité cellulaire, pourcentage de granulocytes, activités de type estérase, peroxydase et aminopeptidase, phagocytose) ont été évalués.

La mortalité des animaux apparaît après le 20 juin, soit pendant la période de maturation sexuelle des animaux. Elle est plus importante à 15 cm en comparaison à 70 cm (**Figure 69**). Le pourcentage de cellules positives pour les estérases est également supérieur à 15 cm. Les conditions environnementales semblent donc influencer les activités des hémoctes. A 15 cm, les huîtres à proximité du sédiment peuvent être soumises à une stimulation de leur système immunitaire plus intense qu'à 70 cm. A 15 cm, les animaux subissent un hydrodynamisme plus important qui entraîne une remise en suspension de matériel sédimentaire associée à la présence de nombreux agents (bactéries, virus, parasites). Ces agents sont certainement moins abondants dans la colonne d'eau (site 70 cm) du fait des mouvements de marées. Ceci pourrait expliquer en partie les plus fortes mortalités rencontrées à 15 cm. Une stimulation intense du système de défense pour des huîtres mises en élevage à proximité du sédiment pourrait correspondre à des activités hémoctaires élevées. Cependant, des activités hémoctaires élevées n'impliquent pas forcément une réponse plus efficace vis-à-vis des agents pathogènes chez des animaux dénués de mémoire immunitaire.

Les huîtres diploïdes d'écloserie présentent dans l'ensemble les niveaux d'activité hémoctaire les plus faibles et les mortalités les plus fortes (**Figure 69**). Les huîtres triploïdes présentent, au

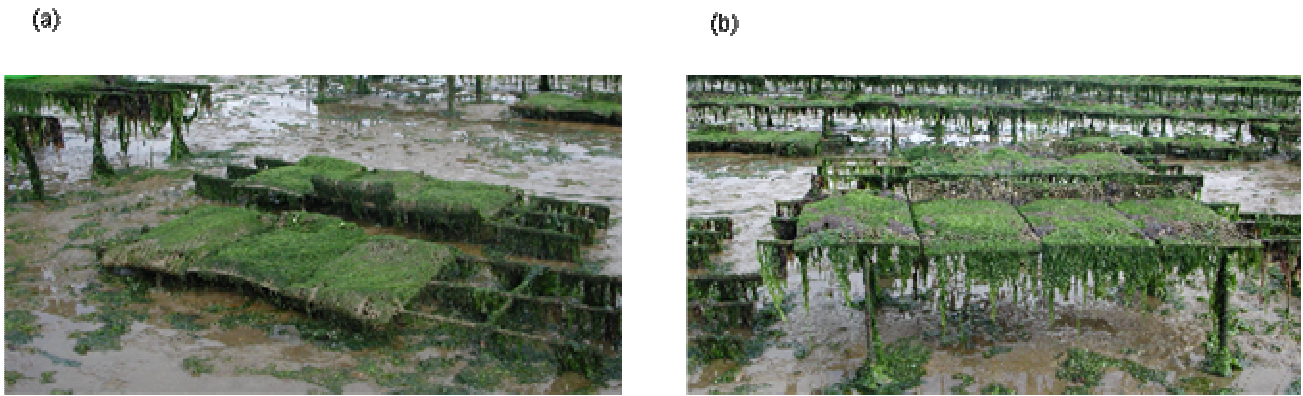


Figure 68 : poches d'huîtres placées sur les tables ostréicoles à différents niveaux par rapport au sédiment sur le site de Ronce perquis dans le cadre des expériences DYNAMO (2002) et DYNAMOR (2003). (a) : tables à 15 cm. (b) : tables à 70 cm. Source : IFREMER.

Cheptels	Triplo	Diplo CN	Diplo E
70 cm	-		
15 cm	-		+

Figure 69 : importance de la mortalité estivale en fonction des différents cheptels (triploïdes, diploïdes de captage naturel et d'écloserie) et des conditions de l'environnement (15 cm et 70 cm) en 2002 (DYNAMO).

contraire, de faibles mortalités (**Figure 69**) associées à de fortes valeurs de certains paramètres hématocytaires (phagocytose, pourcentages de cellules positives pour les estérases et les peroxydases, pourcentage de granulocytes). Les huîtres triploïdes ne présentent pas de maturation. Sans la maturation, la quantité d'énergie allouée aux mécanismes de défense peut être plus importante, ce qui pourrait expliquer les niveaux d'activités hématocytaires supérieurs chez les triploïdes. Les relations mises en évidence dans cette étude apportent des informations intéressantes sur les huîtres triploïdes, pour l'instant peu étudiées.



Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters

Beatrice Gagnaire^a, Patrick Soletchnik^b, Patrick Madec^b, Philippe Geairon^b,
Olivier Le Moine^b, Tristan Renault^{a,*}

^a IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France

^b IFREMER, Laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis-Charentais (LERPC), 17390 La Tremblade, France

Received 14 April 2005; received in revised form 6 October 2005; accepted 7 October 2005

Abstract

Summer mortality is an important economic concern for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, industry all over the world and particularly in France. Outbreaks appear when oysters are in gonadal maturation. Bivalve defence mechanisms against pathogen invasion are assumed by circulating cells, the hemocytes. A field experiment was conducted in the Marennes-Oleron Basin (Charente-Maritime, France) in order to monitor hemocyte parameters, gametogenesis and mortality rates among *C. gigas* during 7 months from March to September 2002. Diploid (from natural bed and from hatchery) and triploid oysters were placed at 15 cm or 70 cm above sediment at Marennes-Oleron Basin. Triploid animals were included because they are considered as sterile animals. Mortality rates were monitored and lipid contents were analysed in order to define sexual maturation stages. Hemocyte parameters (cell mortality, enzymatic activities and phagocytosis) for the three oyster groups were monitored by flow cytometry. Results were analysed by pooling data for the whole sampling period and by separating data in three periods related to the gametogenesis process (A, B and C). Mortality outbreak occurred during the ripe gamete period (B). Results showed that triploids presented the highest values for several hemocyte parameters and the lowest mortality rates. Differences between triploids and diploids were highest during the ripe gamete period. Relationships between oyster mortality, gonadal maturation and hemocyte parameters are discussed. This is the first study monitoring hemocyte parameters of wild diploid, hatchery bred diploid and triploid oysters reared in the field.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pacific oyster; *Crassostrea gigas*; Hemocyte activities; Flow cytometry; Diploids; Triploids; Summer mortality; Sexual maturation

1. Introduction

Important mortality outbreaks have been reported in *Crassostrea gigas* populations since the 1940s in Japan in different locations (Koganezawa, 1974), on the west coast of North America (Glude, 1974; Cheney et al., 2000) and on the French coasts since 15 years (Renault

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 76 29 49; fax: +33 5 46 76 26 11.

E-mail address: trenault@ifremer.fr (T. Renault).

et al., 1994; Gouletquer et al., 1998; Soletchnik et al., 1999). The syndrome is known as summer mortality. As worldwide bivalve production is mainly based on the Pacific oyster, summer mortality appears as a major concern for the shellfish industry (Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Beattie, 1988). Factors such as food limitation, oxygen depletion, salinity and temperature do not appear as single direct causes of the syndrome (Soletchnik et al., 1998). Moreover, outbreaks occur during oyster gametogenesis. Some authors suggest that mortalities occurring in Pacific oysters are the result of multiple factors, including elevated temperatures, physiological stress associated with gonadal maturation, aquaculture practices, pathogens and pollutants (Gouletquer et al., 1998). Therefore, it can be assumed that the background rate of mortality due to environmental conditions, and the physiological and genetic origin of the oysters, can be modified by infectious agents. As many filter-feeding benthic invertebrates, oysters are permanently exposed to various microorganisms. Efficient humoral and cellular defence mechanisms normally help to limit the proliferation of microorganisms in animals (Harris-Young et al., 1995; Cheng, 1996). Stress and disease outbreaks appear to be linked in molluscs (Friedman et al., 1999; Lacoste et al., 2001b). In vitro investigations reveal that noradrenaline, the main catecholamine released in oyster hemolymph during stress, exerts an inhibitory effect on immune functions such as phagocytosis and reactive oxygen species production (Lacoste et al., 2001a, 2002). As a consequence, possible relationships between environmental factors, physiological state of oysters, immune system and pathogens need further investigations.

Since 1996, summer mortality of Pacific oyster, *C. gigas*, has been studied in the south of Marennes-Oleron Bay (Charente-Maritime, France) (Lodato, 1997). Mortality of oysters reared near the sediment was significantly higher than mortality of oysters reared on racks (Soletchnik et al., 1999). Previous studies also showed allocation of energy to reproduction, and gain in shell and somatic tissue weight, to be lower near the sediment than on racks at 50 cm or 70 cm above the sea bed (Gouletquer et al., 1998; Soletchnik et al., 1999, 2003).

The Pacific oyster, *C. gigas*, possesses an open circulatory system (Cheng, 1981). Internal defence mechanisms of bivalves involve circulating blood cells, the hemocytes. These cells are considered to be the equivalent of vertebrate phagocytic cells because of their morphology and functions. Hemocytes are involved in the recognition of invading pathogens and in

their elimination by phagocytosis and encapsulation (Cheng, 1981; Fisher, 1986). Hemocyte activities have already been used for monitoring oyster immune capacities. Moreover, hemocyte parameter values can depend on oyster physiological status including sexual maturation.

Pacific oysters, *C. gigas*, are among the most widely cultured of all shellfish species. To help meet demand, advantages of increased sterility are currently being exploited during commercial growing of triploid *C. gigas* (Hawkins et al., 2000). Triploidy may be induced in shellfish by chemical or physical treatment which retain a polar body during early division of the egg, with the result that each cell nucleus contains one additional set of chromosomes (Beaumont and Fairbrother, 1991). Triploids can also be produced by crossing tetraploid males and diploid females (Nell, 2002). Triploidy is now widely used to obtain faster growth than diploids in shellfish. Gametogenesis is reduced in these animals. Triploid oysters invest less energy in gamete production, so more energy is available for somatic growth (Nell, 2002). Heterozygosity is higher, which could have positive influences on feeding rate, absorption efficiency and growth efficiency (Magoulas et al., 2000). Metabolic energy costs are lower than diploids, rendering triploids more resistant to stressful conditions (Garnier-Gere et al., 2002). However, difference in survival between triploids and diploids has been controversial.

As a part of a multiyear French research programme on summer mortalities in *C. gigas* oysters called MOR-EST, a focal study has been conducted on diploid and triploid oysters reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Bay (Charente-Maritime, France). Mortality rates were daily monitored and lipid contents analysed in order to define sexual maturation stages. Hemocyte parameters including granulocyte percentage, phagocytosis and percentages of cells possessing hydrolytic enzymes (esterases, peroxidases) were investigated using flow cytometry. This method appears well suited to morphological and functional characterisation of oyster hemocytes (Renault et al., 2001; Xue et al., 2001). These parameters are usually monitored in studies on bivalve hemocytes (Cheng et al., 1978; Beckmann et al., 1992; Carballal et al., 1997). Daily mortality was also monitored on all oyster groups. Lipid contents were also measured for all oyster groups and their analysis allowed to define sexual maturation status.

In the present paper, we have analysed the possibility that environmental conditions and physiological state of the oysters may alter hemocyte functions,

rendering the oysters more susceptible to infectious agents. Relationships between maturation stages and hemocyte parameters in three oyster groups (triploids, diploids from natural bed and hatchery diploids) and rearing levels above the sea bed were studied. Results were analysed firstly by pooling all data for the whole sampling period and, secondly, by separating data in three periods related to the gametogenesis process. The aim of this study was to identify possible relationships between gonadal maturation, oyster group, rearing level, hemocyte parameters and oyster mortality.

2. Materials and methods

2.1. Experimental set

The three groups of oysters : natural bed diploid oysters (D), hatchery diploid (Dh) and triploid (T) oysters. D were 1.5-year-old wild oysters from Marennes-Oleron Bay (French Atlantic coast). Dh were hatchery reared oysters from experimental hatchery of IFREMER (La Tremblade Charente Maritime, France). Triploid oysters (T) were produced by crossing tetraploid males and diploid females from a private hatchery. Oysters were grown in the south of the Marennes-Oleron Bay in bags placed on tables. Oysters were reared on "off bottom" culture racks, 15 cm (L1) and 70 cm (L2) above the sea bed from March to September 2002. Sampling dates were: May 14 and 28; June 6, 12, 20 and 26; July 3 and 25; August 8, 21 and September 11. Seawater temperature was recorded by "YSI" probe in 15-min steps from March to September 2002.

2.2. Oyster mortality

Oysters were deployed in mesh bags, at a starting density of 200 per bag, placed on iron racks. Live and dead oysters were counted at each sampling date in three bags per condition. Dead oysters were removed from bags. Percentage of mortality between each sampling date was afterwards transformed in daily rate by dividing per the number of days.

2.3. Lipid content analysis

Measurement of lipid content was carried out on the same animals used for hemocyte collection. Biochemical analysis of tissues was carried out on each batch in 3 replicated pools of 10 oysters for each level (L1 and L2) and oyster group (D, Dh and T). Lipids were extracted and purified according to a protocol previously described (Bligh and Dyer, 1959) and the analytical pro-

cedure was from Marsh and Weinstein (1966). Spectrophotometric analysis was conducted on an aliquot of ground tissues of each pool. Results are expressed in milligrams of lipids per gram of dry tissues. Dry tissue lipids have previously been shown to indicate the maturation level at the different sampling dates (Deslous-Paoli et al., 1981; Soletchnik et al., 1999, 2002). Maturation stages refer to a relative scale previously defined corresponding to gametogenesis in progress, ripe stage and post-spawning stage (Soletchnik et al., 1997).

2.4. Circulating hemocyte collection

After removing the shell by severing the adductor muscle, hemolymph was withdrawn directly from the pericardial cavity by puncture with a 1 mL syringe equipped with a needle (0.9×25 mm). For each oyster, 0.5 mL of hemolymph was withdrawn without any buffer. Hemolymph samples were conserved on ice during collection to prevent hemocyte aggregation (25). For each group (TL1, DL1, DhL1, TL2, DL2 and DhL2), 30 oysters were sampled at each date. The samples were combined into 3 pools of 10 oysters each to reduce inter-individual variation and to provide sufficient hemocytes to fulfil assay requirements.

2.5. Cell analysis by flow cytometry

Hemocytes were analysed with an EPICS XL 4 flow cytometer (Beckman Coulter) after hemocyte collection using previously described protocols (Xue et al., 2001; Auffret et al., 2002). For each hemocyte pool, 3000 events were counted. Results were depicted as cell cytograms indicating that the relative size (FSC value), the granularity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponded to the marker used. Presence of enzymes and phagocytosis were measured using FL1 (green fluorescence) and cell mortality using FL3 (red fluorescence).

Esterase and peroxidase activities were evaluated using commercial kits (Cell Probe™ Reagents, Beckman Coulter). Percentages of cells presenting enzymatic activities were defined on the basis of fluorescent cells among all cells. Each analysis required 200 µL of hemolymph and 20 µL of the corresponding kit reagent (FDA (fluorescein diacetate)-esterase and DFCH (dichlorofluorescein diacetate), PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)-oxidative burst). Hemocytes were then incubated in the dark at ambient temperature for 15 min for esterase and peroxidase detection. Hemocyte mortality (Hm) was quantified using 200 µL of hemolymph. Hemocytes were incubated in the dark for 30 min at 4 °C

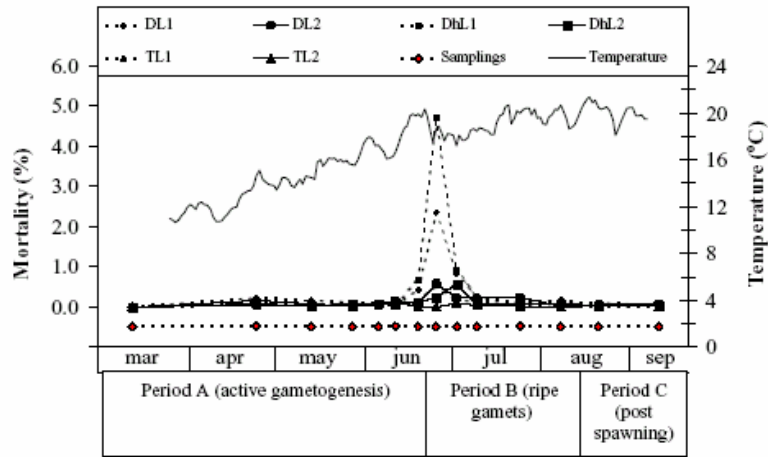


Fig. 1. Daily mortality rate of oyster groups: wild diploid oysters (D), hatchery bred diploid (Dh) and triploid (T) oysters reared on culture racks, L1 level (15 cm) or L2 level (70 cm) above the sediment.

with 10 μL of propidium iodide (PI, 1.0 mg mL^{-1} , Interchim). Morphological characteristics of hemocytes were also recorded: gates were realised on the SSC/FSC plot on the most granular and largest cells in order to determine a granulocyte population. Phagocytosis was measured in vitro as the proportion of cells that had ingested three or more fluorescent beads. Two hundred microliters of hemolymph were incubated for 1 h in the dark at ambient temperature with 10 μL of a 1/10 dilution of Fluorospheres[®] carboxylate-modified microspheres (diameter 1 μm , Interchim). The final concentration of beads was 10^8 beads mL^{-1} .

2.6. Statistical analysis

Statistical multi-way analysis of variance and least significant differences (LSD) post hoc test were realised

using Statgraphics version 5.1 software. Hemocyte parameters and cumulated mortalities were converted into r angular arc sinus $\sqrt{\text{value}}$ before analysis. However, figures were realised using non-transformed percentage values.

3. Results

3.1. Oyster mortality

A daily mortality rate, ranging from 2% to 5%, occurred in the two groups of diploid oysters at L1 level between June 21 and 26 (Fig. 1). Daily mortality of diploid oysters did not exceed 0.5% at L2. Mortality occurred after temperature had reached 18–19 °C for a few days. After a 7-month rearing period (March to September 2002), the highest cumulative mortality,

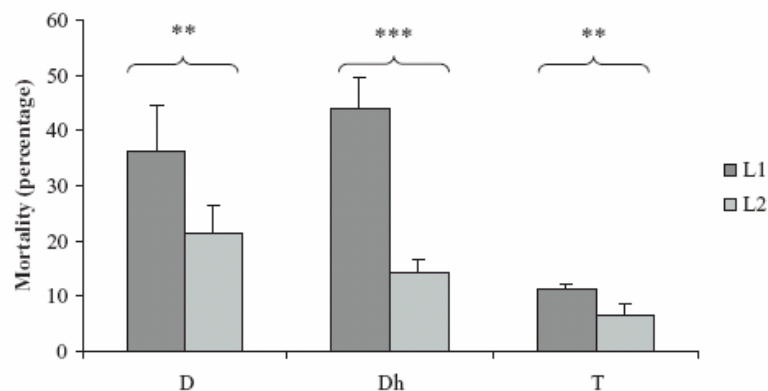


Fig. 2. Cumulative mortality of wild oysters (D), hatchery diploids (Dh) and triploids (T) reared on culture racks at 15 cm (L1) or 70 cm (L2). Values are means of three replicates. Bars are confidence limit at 95%. The post-hoc test gives $\text{TL2} < (\text{TL1} - \text{DhL2}) < (\text{DhL2} - \text{DL2}) < (\text{DL1} - \text{DhL1})$. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

36.2% and 43.8%, affected the DL1 and DhL1 groups, respectively (Fig. 2). Significant differences were reported between L2 and L1 cumulative mortality for each oyster population: 21.5% at L2 and 36.2% at L1 for wild diploids, 14.3% at L2 and 43.8% at L1 for hatchery diploids, and 6.5% at L2 and 11.3% at L1 for triploids (Fig. 2). Whatever the rearing levels, cumulative mortality in triploid oysters was significantly lower (Fig. 2).

3.2. Lipid content and definition of maturation stages

From March to mid May 2002, the mean lipid content was about 80–85 mg g⁻¹ for diploid and triploid

oysters (Fig. 3). Values then reached ~150 mg g⁻¹ at the end of June 2002 and remained at this level until spawning for the two groups of diploid oysters (D and Dh) (Fig. 3a and b). Lipid content did not exceed ~100 mg g⁻¹ for triploid oysters (Fig. 3c). After spawning in August 2002, lipid contents fell in diploids to 90 mg g⁻¹. Three periods A, B and C were defined on the basis of lipid contents in diploids. Period A was defined as the active gametogenesis (before mortality; May to June 20th), period B was defined as the ripe gamete period (after mortality; June 20th to August 8th), and period C was defined as the post-spawning period (August 8th to September 11th) (Fig. 3). The evolution of lipid contents was directly related to maturation

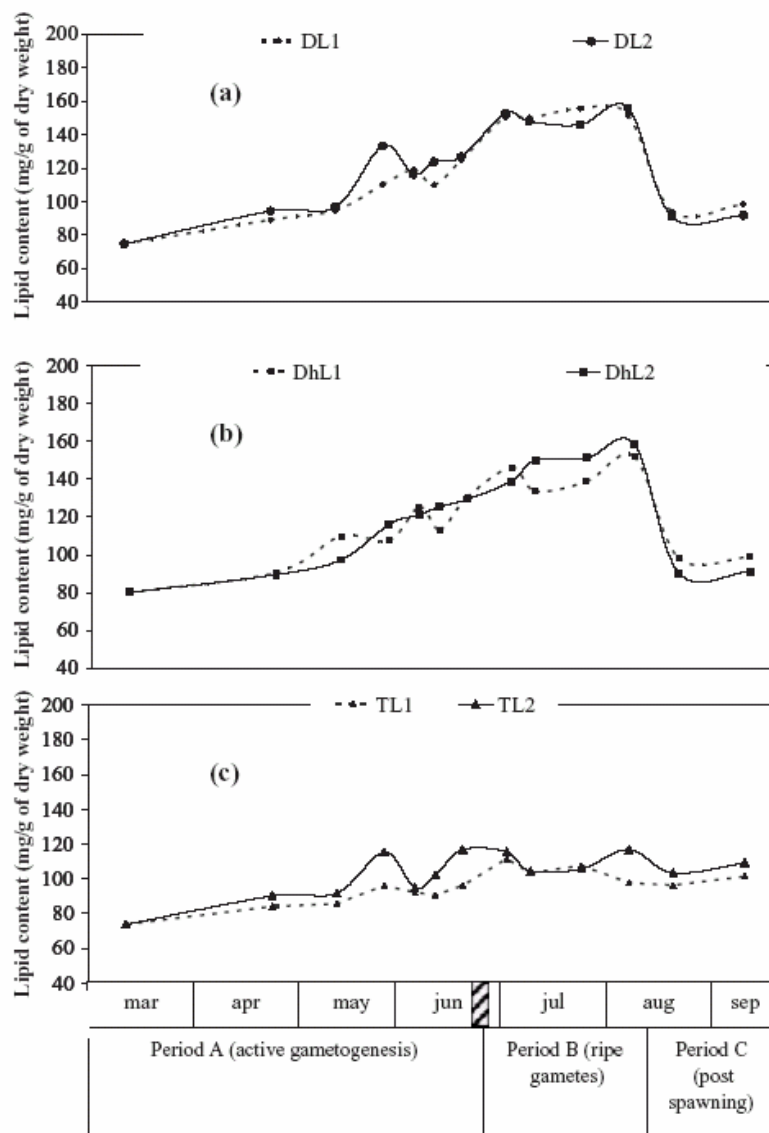


Fig. 3. Lipid content (mg g⁻¹) in the dry flesh along the experiment for wild diploids (D) (a), hatchery bred diploids (Dh) (b) and triploids (T) (c) reared at L1 and L2. Values are means of 3 replicates of 10 oysters. Hatched surface indicates the mortality period.

stage, with a maximal value just before spawning. Values for triploid oysters remained about 100 mg g^{-1} (Fig. 3c).

3.3. Hemocyte parameters: effect of sites and oyster groups

The first analysis was realised on the whole data, in order to study a potential difference between oyster groups or an effect of rearing level on the basis of hemocyte parameters. Two-way analysis of variance of each parameter was carried out. Thirty-three values were available for each hemocyte parameter. Results showed no effect of level ($p > 0.05$) for any of the hemocyte parameters (Fig. 4, Table 1). On the contrary, some parameters varied significantly among the three

oyster groups. Phagocytosis values were significantly higher for triploids than for diploids ($p < 0.0001$) (Fig. 4a, Table 1). For triploids, 36.7% (L1) and 29.5% (L2) of hemocytes presented phagocytosis activity. For diploids D, 21.8% (L1) and 25.0% (L2) of hemocytes presented phagocytosis activity. For diploids Dh, 20.2% (L1) and 16.4% (L2) of hemocytes presented phagocytosis activity. For diploids T, 20.2% (L1) and 16.4% (L2) of hemocytes presented phagocytosis activity (Table 1). Percentages of cells presenting a peroxidase activity differentiated T, D and Dh oysters ($T > D > Dh$, LSD test, $p < 0.0001$) (Fig. 4c, Table 1). Percentages of cells presenting an esterase activity and the granulocyte percentage were also significantly higher for triploids than for diploids ($p < 0.05$) (Fig. 1b,d, Table 1). Cell mortality permitted differentiation between triploid and diploid groups ($T < D = Dh$, Fig. 4f). However, this result was not significant ($p < 0.1$).

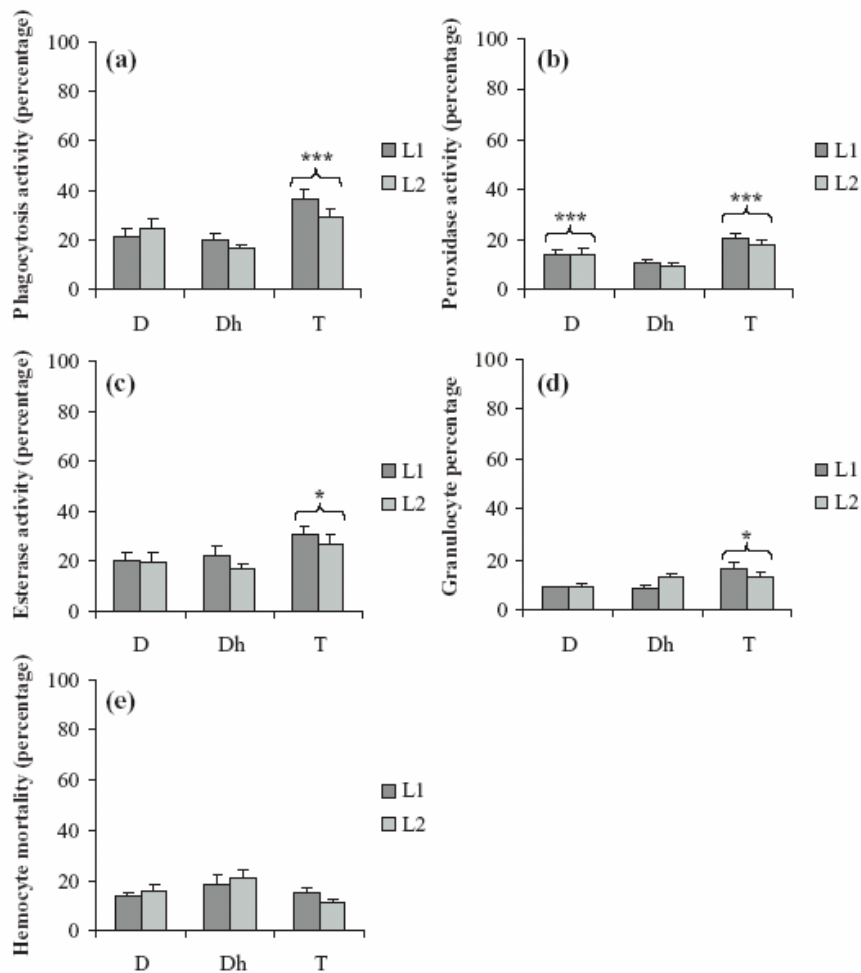


Fig. 4. Means and standard errors of the means of hemocyte parameters for the three oyster groups (D=diploids from natural bed, Dh=hatchery diploids and T=triploids) and both distances above sediment (L1=15 cm, L2=70 cm). (a) Percentage of cells that phagocytosed beads in vitro; (b) percentage of cells presenting a peroxidase activity; (c) percentage of cells presenting an esterase activity; (d) granulocyte percentage; (e) hemocyte mortality. Significant differences between groups are indicated with stars: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3.4. Relationships between hemocyte activities and gonadal maturation, oyster groups or rearing levels

The multi-way analysis of variance of hemocyte activities versus levels (L1 and L2), oyster groups (D, Dh and T) and maturation stages (A, B and C, Figs. 1 and 3) demonstrated a major effect of maturation. All the hemocyte activities showed lowest values during period A compared to B or C periods (Table 2, $p < 0.001$). "Oyster group" had a significant effect on phagocytosis, esterase and peroxidase activities and granulocyte percentage (Table 2, $p < 0.01$). Highest hemocyte activities were reported in triploid oysters. The rearing level had an effect only on esterase activity: values were significantly higher at L1 (Table 2, $p < 0.05$).

Phagocytosis values were maximal for triploid oysters during the A and B periods (21.3% and 48.1%, respectively) (Fig. 5a, Table 2). Phagocytosis values for natural bed diploids were 13.1% and 24.7% during the A and B periods and for hatchery diploids 9.0% and 22.0% during the A and B periods, respectively (Fig. 5a, Table 2). After spawning, in period C, triploids and diploids presented similar values of phagocytosis. The highest percentages of peroxidase and esterase positive cells were recorded for triploids in periods A and B (Fig. 2c and e, Table 2). Triploids presented the highest percentages of granulocytes during the three periods (A, B and C), with a maximum value (21.7%) in period C (Fig. 5b, Table 2).

Values were not statistically different between triploids and diploids for hemocyte mortality, but were lower for triploids in periods A and B (10.9% and 13.4%, Fig. 5d, Table 2) than for hatchery diploids in period B (32.%, Fig. 5d, Table 2). Hatchery diploids

Table 1
Multi-way analysis of variance of hemocyte parameters versus "level" (L1=15 cm and L2=70 cm) and "group" (D=diploids from natural bed, Dh=hatchery diploids and T=triploids)

Hemocytes activities	Level	Group
Phagocytosis activity	NS $p=0.3108$	T>Dh, D $p<0.0001$
Peroxidase activity	NS $p=0.5192$	T>D>Dh $p<0.0001$
Esterase activity	NS $p=0.1680$	T>Dh, D $p=0.0130$
Granulocyte percentage	NS $p=0.8780$	T>Dh, D $p=0.0203$
Hemocytes mortality	NS $p=0.9195$	NS $p=0.0522$

Significant effects are reported at 5% (*), 1% (**) and 1‰ (***) probability level. NS=no significant difference. Related LSD (least significant difference) post hoc tests are reported.

Table 2

Multi-way analysis of variance of hemocyte parameters versus "level" (L1=15 cm and L2=70 cm), "group" (D=diploids from natural bed, Dh=hatchery diploids and T=triploids) and maturation stage (gametogenesis=A, ripe gametes=B, post-spawning=C)

Hemocytes activities	Level	Group	Maturation stage
Phagocytosis activity	NS	T>Dh, D ***	A<B<C ***
Peroxidase activity	NS	T>D>Dh ***	A<B<C ***
Esterase activity	L1>L2 *	T>Dh, D **	A<B<C ***
Granulocyte percentage	NS	T>Dh, D **	A<B, C ***
Hemocytes mortality	NS	NS	A<B, C ***

Significant effects are reported at 5% (*), 1% (**) and 1‰ (***) probability level. NS=no significant difference.

presented the lowest activities for hemocyte parameters during period A and period C: phagocytosis activity (Fig. 5a, Table 2), percentage of peroxidase, esterase positive cells (Fig. 2c, e and f, Table 2) and percentage of granulocytes (Fig. 5b, Table 2). Hatchery diploids also presented the lowest activities for two parameters in period B: the lowest phagocytosis activity (Fig. 5a, Table 2) and percentage of peroxidase positive cells (Fig. 5c, Table 2).

4. Discussion

Field studies on summer mortality of *C. gigas* have been conducted in France for several years (Lodato, 1997; Gouletquer et al., 1998; Soletchnik et al., 1999, 2003, 2005). A mortality model comparing "on" and "off" bottom culture has been developed (Soletchnik et al., 2005). This model demonstrated an effect of proximity to sediment on oyster survival, called "sediment effect". This result was confirmed in the present experiment. Mortality of diploid oysters from natural bed was higher at rearing level L1 (15 cm) than at L2 (70 cm) (36.2% cumulative mortality versus 21.5% after a 6-month grow-out period). Mortality of wild diploid oysters was also nearly doubled in 1997 on the same site, with 8–19% and 23–33% for L2 and L1, respectively (Soletchnik et al., 1999). Mortality rates for "off" and "on" bottom culture were 8–15% and 40–50% in 2000 and 10% and 28% in 2001, respectively (Soletchnik et al., 1997). In 2000 and 2001, mortality outbreaks occurred in June after an increase of seawater temperature above 19 °C. Other studies conducted in USA reported mortality outbreaks during the same period (June and July) (Perdue et al., 1981; Cheney et al., 2000).

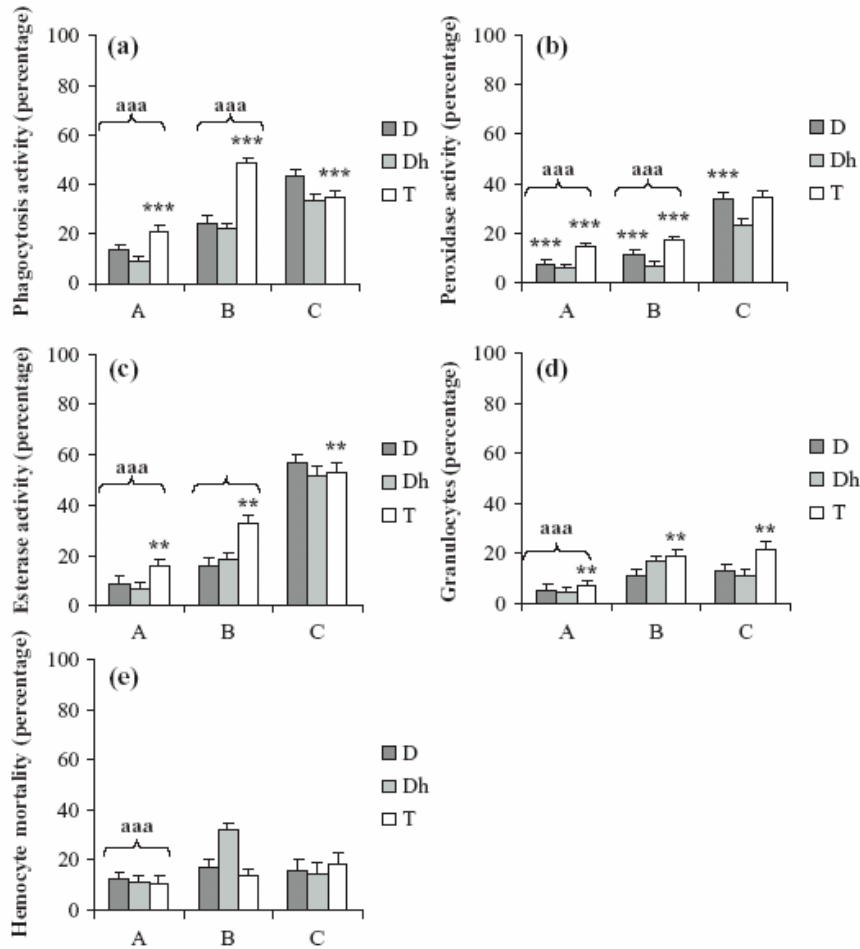


Fig. 5. Means and standard errors of the means of hemocyte parameters over the three periods (A=gametogenesis, B=ripe gametes and C=post-spawning) for the three oyster groups (D=diploids from natural bed, Dh=hatchery diploids and T=triploids). (a) percentage of cells that phagocytosed beads in vitro; (b) percentage of cells presenting a peroxidase activity; (c) percentage of cells presenting an esterase activity; (d) granulocyte percentage; (e) hemocyte mortality. Significant differences between groups (*) or periods (a) are indicated: aa= $p < 0.01$; *** and aaa= $p < 0.001$.

In the present study, hatchery diploids presented the highest cumulative mortality at L1. Moreover, cumulative mortality was as in wild diploids higher at L1 than at L2 (43.8% and 14.3%, respectively). Triploids presented the lowest mortality rates, but cumulative mortality was also statistically different between L1 and L2 (11.3% and 6.5%, respectively). This is the first field study in France including diploid and triploid oysters from hatchery. In this “on-off” bottom model, the rearing level allows to explain partly mortality outbreaks: cumulative mortality was higher at L1 than at L2 for the three oyster populations. A study on the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, reported a higher mortality at low height compared to high height (Smith et al., 2000).

In this study, we also measured oyster lipid contents in order to define different stages of sexual maturation.

This technique has already been use before (Deslous-Paoli et al., 1981; Soletchnik et al., 1999, 2002). Diploids presented the highest mortality rates and mortalities were observed during the ripe gamete period (B). As recorded by other authors (Imai et al., 1965; Perdue et al., 1981), mortality occurred during gametogenesis. On the contrary, the lowest mortality rates were reported for triploid oysters, presenting low lipid contents. Another study on Hiroshima Bay also reported low mortality rates for *C. gigas* triploids (Akashige and Fushimi, 1992). A study on *C. gigas* in Australia also reported lower mortality of triploids compared to diploids (Nell and Perkins, 2005). Another study on the Sydney rock oyster, *S. glomerata*, reported a higher survival rate for triploids than diploids (Hand et al., 1998). However, on this same oyster, another study reported no difference of mortality between triploids

and diploids (Smith et al., 2000). Other studies in USA always reported a mortality rate twice higher for triploids compared to diploids (Cheney et al., 1998, 2000, 2004).

A major aim of this study was also to monitor certain hemocyte parameters in oysters placed in the field over a long period. Our results underscore the utility of flow cytometry in monitoring hemocyte functions in oysters (Goedken and De Guise, 2004). To our knowledge, this is the first study evaluating hemocyte activities in triploid oysters reared in the field. The analysis of the whole data (without separation by periods on the basis of sexual maturation) showed that triploid oysters presented statistically higher hemocyte activities than diploid oysters from hatchery and from natural bed for several parameters (phagocytosis, esterase and peroxidase activities and granulocyte percentages). When analysing the data by periods related to the gametogenesis status (A, B and C), statistically significant differences for the same hemocyte parameters were reported between diploids (low values) and triploids (high values). Moreover, the highest differences for esterase and phagocytosis activities were reported between animals presenting the lowest mortality (triploids) and animals presenting the highest mortality (diploids) during period B (ripe gamete period) where mortality events were reported. We can therefore hypothesize that gametogenesis process makes diploid oysters more susceptible to several factors and then lead to mortality. The principal characteristic of triploid oysters was the absence of sexual maturation during Spring and Summer 2002. During the ripe gamete period (B), triploid oysters presented no gamete development. We can assume that, during the ripe gamete period B, diploid oysters allocated energy to gamete production and, on that account, a minimum of energy was allocated to the defence system. Triploids do not use energy in gamete synthesis and so may allocate energy for other processes including hemocyte activities and defence mechanisms. A previous study reported a decrease of the activity of complement and the number of lymphocytes during sexual maturation of the sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Alcorn et al., 2002). Sexual maturation is a sensitive period and physiological activities such as defence mechanisms can be disrupted.

Peroxidase activities allowed differentiation between diploids from hatchery and from natural bed, with lowest values for hatchery diploids ($D_h < D$). Moreover, esterase activity was higher at L1 level, where highest mortality was reported for both diploid populations. This difference appeared only when data for the three gonadal maturation periods (A, B and C) were analysed sepa-

ately. We may assume that, at L1, bacterial biomass related to turbidity is more important (Lodato, 1997). The environment at the lower level (15 cm) induced a greater stimulation of the immune system.

Hemocyte parameters monitored in this study allowed differentiation between oysters presenting high mortality (diploids: from 14.3% to 43.8% of cumulative mortality) and low mortality (triploids: 6.5% and 11.3% of cumulative mortality). However, only one parameter allowed differentiation between both diploid populations and only one parameter allowed to differentiate both levels, although mortality was higher at L1. As hemocyte parameter values are different between triploids and diploids, we can hypothesize that abnormal mortalities account for more than 12% of cumulative mortality. Beyond this threshold, different oysters presenting different percentages of cumulative mortality cannot be differentiated on the basis of the hemocyte parameters monitored. We can therefore hypothesize that only abnormal mortality, and not genetic origin or rearing level, explains values obtained for hemocyte parameters.

However, the factors implicated in *C. gigas* mortality are not identified yet. Some authors hypothesised the impact of physico-chemical factors in seawater (Cheney et al., 2000), toxicity of sediment, presence of pollutants, the role of bacterial infections (Lacoste et al., 2001b; Le Roux et al., 2002; Waechter et al., 2002) and herpesviral infections following temperature elevation (Renault et al., 1994, 1995). However, no difference has been found in the resistance of triploid or diploid *C. virginica* (Gmelin) oysters to infection by MSX (*Haplosporidium nelsoni*) or *Perkinsus marinus* (Meyers et al., 1991; Barber and Mann, 1991; Matthiessen and Davis, 1992). Further experiments should be conducted in order to test the susceptibility of triploids to different microorganisms and to demonstrate that higher values of hemocyte parameters correspond to lower susceptibility to infectious diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Dr. J.F. Samain (IFREMER, Brest, France) for managing the MOR-EST project group of research. Dr. P. Boudry and Dr. L. Degremont (Laboratory of Genetic and Pathology, La Tremblade, France) and the entire hatchery team (Laboratory of Genetic and Pathology, La Tremblade, France) are acknowledged for their contribution to oysters production. Dr. Philippe Gouletquer is acknowledged for his permission to perform these experiments in the laboratory. The authors also want

to thank the Pr. Susan Ford (Rutgers University, Port Norris, USA) for her reading and her helpful corrections of this paper. The study was partly supported financially by the Poitou-Charentes Region.

References

- Akashige, S., Fushimi, T., 1992. Growth, survival, and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1063–1071.
- Alcorn, S.W., Murra, A.L., Pascho, R.J., 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 303–334.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar Environ. Res.* 54, 585–589.
- Barber, B.J., Mann, R., 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gemlin, 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 10, 445–450.
- Beattie, J.H., 1988. Summer mortality of Pacific oysters. *Spec. Publ., Am. Fish. Soc.* 18, 265–268.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 10, 1–18.
- Beckmann, N., Morse, M.P., Moore, C.M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 124–132.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Med. Sci.* 37, 911–917.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 96–105.
- Cheney, D.P., Elston, R.A., Macdonald, B.F., 1998. Oyster summer mortality—an update on ongoing sea grant sponsored research. *J. Shellfish Res.* 17.
- Cheney, D.P., Macdonald, B.F., Elston, R.A., 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.* 19, 353–359.
- Cheney, D.P., Burnett, L.E., Christy, A., Davis, J.P., Elston, R.A., Friedman, C.S., Griffin, F., Langdon, C., Suhrbier, A., 2004. Improvement of disease resistance and understanding of summer mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 23, 284–285.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells I*. Academic Press, London, pp. 233–299.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, F. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, pp. 299–333.
- Cheng, T.C., Lie, K.J., Heyneman, D., Richards, C.S., 1978. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *J. Invertebr. Pathol.* 31, 57–62.
- Deslous-Paoli, J.M., Heral, M., Berthome, J.P., Razet, D., Garnier, J., 1981. Natural reproduction of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oleron Basin in 1979 and 1981: biochemical and energetic aspects. In: R.d.T.d.I.I.d.P. (Ed.), *Maritimes. IFREMER*, Nantes, pp. 319–327.
- Fisher, S.W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin, M. (Ed.), *Immunity in Invertebrates*. Springer-Vrelag, Berlin Heidelberg, pp. 25–35.
- Friedman, C.S., Cherr, G.N., Clegg, J.S., Hamdoun, A.H., Jacobsen, J.L., Jackson, S.A., Uhlinger, K.R., 1999. Investigation of the Stress Response, Summer Mortality and Disease Resistance of Oysters, *Crassostrea* spp. National Shellfisheries Association.
- Garnier-Gere, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., Gerard, A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11, 1499–1514.
- Glude, J.B., 1974. A summary report of Pacific Coast oyster mortality investigations 1965–1972, October 15–16th 1974. *Proceedings of the Third U.S.–Japan Meeting on Aquaculture*, Tokyo, p. 28.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 539–552.
- Goulletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Taillade, S., 1998. Summer Mortality of the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen. 14–21 pp.
- Hand, R.E., Nell, J.A., Smith, I.R., Maguire, G.B., 1998. Studies on triploid oysters in Australia: XI. Survival of diploid and triploid Sydney Rock oysters (*Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)) through outbreaks of winter mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation. *J. Shellfish Res.* 17, 1129–1135.
- Harris-Young, L., Tamplin, M.L., Mason, J.W., Aldrich, H.C., Jackson, J.K., 1995. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 52–57.
- Hawkins, A.J., Magoulas, A., Heral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A.J., Kotoulas, G., 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res.* 76, 273–284.
- Imai, T., Numachi, K.-i., Oizumi, J., Sato, S., 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay: II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute*, vol. 25, pp. 27–38.
- Koganezawa, A., 1974. Present Status of Studies on the Mass Mortality of Cultured Oysters in Japan and Its Prevention, Tokyo, pp. 29–34.
- Lacoste, A., De Cian, M.C., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001a. Noradrenaline and alpha-adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *J. Cell Sci.* 114, 3557–3564.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001b. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* 46, 139–145.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 1–9.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Berthe, F., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15, 251–258.
- Lodato, M.I., 1997. Mortalité estivale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (bassin de Marennes-Oleron): étude des pratiques culturales et des caractéristiques biologiques et spatiales des élevages. *Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes*, p. 127.

- Magoulas, A., Kotoulas, G., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Dermitzakis, E., Hawkins, A.J.S., 2000. Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res.* 76, 261–272.
- Marsh, J.B., Weinstein, D.B., 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7, 574–576.
- Matthiessen, G.C., Davis, J.P., 1992. Observations on growth rate and resistance to MSX (*Haplosporidium nelsoni*) among diploid and triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1797)) in New England. *J. Shellfish Res.* 11, 449–454.
- Meyers, J.A., Bureson, E.M., Barber, B.J., Mann, R., 1991. Susceptibility of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 10, 304.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, 69–88.
- Nell, J.A., Perkins, B., 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquac. Res.* 6, 530–536.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochennec, N., Maffrat, P., 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France—comparative study. *Rev. Méd. Vét.* 145, 735–742.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochennec, N., Chollet, B., Maffrat, P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* 26, 539–543.
- Renault, T., Xue, Q.G., Chiltonczyk, S., 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 269–274.
- Smith, I.R., Nell, J.A., Adlard, R., 2000. The effect of growing level and growing method on winter mortality, *Mikrocytos roughleyi*, in diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 185, 197–205.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., 1997. Ecophysiology of maturation and spawning in oyster (*Crassostrea gigas*): metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquat. Living Resour.* 10, 177–185.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., Forest, G., 1998. Spring and Summer Mortalities of the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* in the Marennes Oleron Bay: Pilot Study From Ronce and Perquis Leasing Grounds. RI DRV RA RST, La Tremblade. 55 pp.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Summer mortality of the oyster *Crassostrea gigas* in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* 12, 131–143.
- Soletchnik, P., Huvet, A., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., Boudry, P., 2002. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquat. Living Resour.* 15, 243–250.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Degremont, L., Bedier, E., Bouget, J.F., Dubois, B., Martin, J.L., Enriquez Diaz, M., Faury, N., Le Moine, O., Renault, T., Gagnaire, B., Samain, J.F., 2003. Characterization of summer mortalities of *C. gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. *J. Shellfish Res.* 22, 354–355.
- Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K., 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J. Shellfish Res.* 24.
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E., Berthe, F., 2002. Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *C. R., Biol.* 325, 231–238.
- Xue, Q.G., Renault, T., Chiltonczyk, S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 557–567.

Article 4 : Analysis of hemocyte parameters and study of their temporal trend in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field - Study of hatchery diploids and diploids from natural bed (Fish & Shellfish Immunology, soumis) (cité dans le texte comme « Gagnaire *et al.*, soumis »)

Afin d'analyser les relations entre mortalité, origine génétique et environnement rapportées dans l'article précédent, un suivi temporel des paramètres hématocytaires a été réalisé selon un pas de temps serré. Les animaux ont été prélevés deux fois par mois de mai à septembre 2002, et quatre prélèvements ont été réalisés pendant le mois de juin 2002, période des mortalités. Le suivi de paramètres hématocytaires sur une longue période de temps apporte des informations sur la connaissance fondamentale du système de défense des mollusques bivalves. Les études de l'évolution temporelle des activités de défense chez les bivalves se basent généralement sur un échantillonnage mensuel (Pipe *et al.*, 1995b; Fisher *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2003). A cet égard, notre travail était original car des échantillonnages semi-hebdomadaires ont parfois été réalisés. En outre, l'étude a intégré le suivi d'huîtres diploïdes produites en éclosion. De plus en plus d'huîtres produites en éclosion sont intégrées dans les stocks d'huîtres vendues en France et dans le monde. Ces animaux possèdent une histoire particulière, très différente de celle des huîtres de captage naturel. Il convient donc de s'interroger sur les possibles différences entre les huîtres d'éclosion et celles de captage naturel, notamment en termes de paramètres hématocytaires.

Les résultats montrent que les valeurs des paramètres hématocytaires des deux populations (diploïdes d'éclosion et de captage naturel) augmentent au cours de la période d'étude, entre mars et août. L'activité de phagocytose des huîtres diploïdes d'éclosion est inférieure à celle des huîtres de captage naturel. S'il s'avère que les animaux produits en éclosion présentent des capacités de défense réduites, ils pourraient se montrer plus sensibles à des agents pathogènes lors de la phase de grossissement sur le terrain. Des études complémentaires devraient être menées afin de confirmer ce résultat.

Du fait du nombre de données accumulées dans le cadre de cette expérience, nous avons également étudié l'échelle de distribution des valeurs des paramètres hématocytaires et les corrélations existant entre eux. Les résultats montrent que les variations sur l'ensemble de la période d'étude sont importantes pour plusieurs paramètres. Il apparaît donc difficile d'établir des normes entre lesquelles les variations des paramètres hématocytaires pourraient être considérées comme « normales », à l'instar de ce qui existe chez les vertébrés (Strongin & Skvortsov, 1988; Custer *et al.*, 1995).

Les résultats rapportent également de nombreuses corrélations statistiques entre les paramètres hématocytaires. Une forte corrélation existe entre la phagocytose et le pourcentage de cellules

positives pour les estérases et les peroxydases (EOR). Ce résultat a été observé précédemment pour les hématocytes de bivalves, mais cette étude est la première à montrer la relation au niveau statistique. Une forte corrélation est également rapportée entre la mortalité hématocytaire et le pourcentage de granulocytes. Cependant, cette corrélation semblait être essentiellement liée à deux dates aux profils atypiques.

Analysis of hemocyte parameters and study of their temporal trend in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field – Comparison of hatchery diploids and diploids from natural bed

Authors:

Gagnaire Beatrice¹, Soletchnik Patrick², Faury Nicole², Kerdudou Nolwenn¹, Le Moine Olivier² and Renault Tristan^{1*}

Affiliations:

¹IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade

²IFREMER, Laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis Charentais (LERPC), 17390 La Tremblade

*Corresponding author: Tristan Renault, IFREMER, LGP, 17390 La Tremblade, Tel: 33 5 46 36 98 36, Fax: 33 5 46 36 37 51, E-mail: trenault@ifremer.fr

Abstract

Internal defence mechanisms of bivalves include the hemocytes which assume several functions. Relationships exist between environmental factors, physiological state of oysters, defence system and pathogens. Hatchery oysters are more and more produced and reared in the field. The characteristics and particularly the defence system of these animals are unknown. In this context, a field trial was carried out from May to September 2002 in order to monitor hemocyte parameters of diploid oysters from natural bed and hatchery-produced diploid oysters on the basis of flow cytometry. Several hemocyte parameters (cell mortality, phagocytosis, esterase, aminopeptidase and peroxidase activities) were monitored. For both oyster groups, scale of distribution of hemocyte parameters, correlations between them and their temporal trend are reported. Phagocytosis was higher for diploids from natural bed compared to hatchery diploids. Temporal trend of hemocyte parameters are discussed. When pooling data for both oyster groups, high correlations between esterase and peroxidase activities and phagocytosis were reported. Cell mortality and granulocyte percentages were also strongly correlated. This is the first study to follow temporal trend of hemocyte parameters with so close sampling intervals and to compare both diploid groups.

Keywords: Pacific oyster, *Crassostrea gigas*; hemocytes; cellular activities; flow cytometry; diploids from natural bed; hatchery diploids.

Introduction

Internal defence mechanisms of bivalves involve circulating blood cells, the hemocytes. These cells are considered to be the equivalent of vertebrate phagocytic cells because of their morphology and functions. In *Crassostrea gigas*, two types of hemocytes can be differentiated on the basis of morphological features: hyalinocytes and granulocytes (1). Hemocytes are involved in the recognition of invading pathogens and in their elimination by phagocytosis and encapsulation (1, 2). Hydrolytic enzymes including esterases and aminopeptidases and release of reactive oxygen species (ROS) may play a role in pathogen degradation (3-8). They have been used as immune capacity indicators in many bivalve species (9-12).

Recent studies show that oyster defences against pathogens such as bacteria are influenced both by environmental and physiological parameters (13-15). Environmental conditions or the presence of oyster parasites such as the protozoan *Perkinsus marinus* may suppress the bactericidal activity of hemocytes, and lead to the accumulation of bacteria in bivalve tissues (16, 17). Furthermore, stress and disease outbreaks sometimes appear to be linked in molluscs (18, 19). *In vitro* investigations reveal that noradrenaline, the main catecholamine released in oyster hemolymph during stress (including shaking and presence of pathogenic microorganisms) exerts an inhibitory effect on immune functions such as phagocytosis and reactive oxygen species production (20-22). As a consequence, possible relationships between environmental factors, the physiological state of oysters, their immune system and pathogens needs further investigations.

Hatchery oysters are more and more produced and represents an increasing part of shellfish culture in the field (23). The characteristics and particularly the defence system of these animals are poorly known. However, it appears important to know if these animals are able to respond to environmental pressures as well as natural bed oysters.

In 2002, a field trial was carried out in Ronce les Bains (Charente Maritime, Atlantic coast, France) in order to monitor hemocyte parameters of two groups of Pacific oysters. Wild diploids and hatchery bred diploids were monitored. Hemocyte parameters including granulocyte percentage, phagocytosis, percentages of cells possessing hydrolytic enzymes (esterases, peroxidases, aminopeptidases) were investigated using flow cytometry. This methodology appears well suited to morphological and functional characterisation of oyster hemocytes (24, 25). All values were pooled in order to study the scale of distribution of hemocyte parameters, and the statistical correlations between them. These informations are mostly not available in studies on oyster hemocyte parameters. Intervals between sampling dates were short (one or two weeks) in order to monitor the temporal trend of hemocyte parameters of both oyster groups all over the sampling period, which has never been described before.

Material and Methods

Experimental oysters

Two oyster groups were studied: diploid oysters (D) and hatchery diploid oysters (Dh). D were 1.5 year-old wild oysters from Marennes-Oleron Bay (French Atlantic coast). Dh were 1.5 year-old hatchery reared oysters from the IFREMER experimental hatchery located in La Tremblade (Charente Maritime, France). Both oyster groups were grown in the south of the Marennes-Oleron Bay in bags placed on tables. Sampling dates were: May 14 and 28 ; June 6, 12, 20 and 26 ; July 3, 25 ; August 8, 21 and September 11.

Circulating hemocyte collection

After removing the shell by severing the adductor muscle, hemolymph was withdrawn directly from the pericardial cavity by puncture with a 1 mL syringe equipped with a needle (0.9 × 25 mm). For each oyster, 0.5 mL of hemolymph was withdrawn without any buffer. Hemolymph samples were conserved on ice during collection to prevent hemocyte aggregation (26). For each group (D and Dh), thirty oysters were sampled at each date. The samples were combined into three pools of 10 oysters each to reduce inter-individual variation and to provide sufficient hemocytes to fulfil assay requirements.

Cell analysis by flow cytometry

Hemocytes were analysed with an EPICS XL 4 flow cytometer (Beckman Coulter) after hemocyte collection using previously described protocols (25, 26). For each hemocyte pool, 3 000 events were counted. Results were depicted as cell cytograms indicating the relative size (FSC value), the granularity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponded to the marker used. Presence of enzymes and phagocytosis were measured using FL1 (green fluorescence) and cell mortality using FL3 (red fluorescence).

Esterase (Est), aminopeptidase (Ap) and peroxidase (Per) activities were evaluated using commercial kits (Cell Probe TM Reagents, Beckman Coulter). Percentages of cells presenting enzymatic activities were defined on the basis of fluorescent cells among all cells. Each analysis required 200 µL of hemolymph and 20 µL of the corresponding kit reagent (FDA (Fluorescein Diacetate)•Esterase, A (Alanine-Rho 110)•Aminopeptidase M and DFCH (Dichlorofluorescein Diacetate), PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate)•Oxidative Burst). Hemocytes were then incubated in the dark at ambient temperature for 15 minutes for esterase and peroxidase detection and for 30 minutes for aminopeptidase activity. Hemocyte mortality (Hm) was quantified using 200 µL of hemolymph. Hemocytes were incubated in the dark for 30 minutes at 4 °C with 10 µL of propidium iodide (PI, 1.0 mg.mL⁻¹, Interchim). Morphological characteristics of hemocytes were

also recorded: gates were realised on the SSC/FSC plot on the most granular and largest cells in order to determine a granulocyte population (Gra). Phagocytosis (Pha) was measured *in vitro* as the proportion of cells that had ingested three or more fluorescent beads. Two hundred μL of hemolymph were incubated for one hour in the dark at ambient temperature with 10 μL of a 1/10 dilution of Fluorospheres[®] carboxylate-modified microspheres (diameter 1 μm , Interchim). The final concentration of beads was 10^8 beads. mL^{-1} .

Statistical analysis

Student test, box plots and matrix of correlation were carried out using Statgraphics version 5.1 software. Box plots present distribution of variable with two quartiles (black surface) above and below the median, and the two last quartiles (horizontal lines). Hemocyte parameters were converted into r angular arc sinus $\sqrt{\text{(\% of mortality)}}$ before analysis.

Results

Temporal trend of hemocyte parameters

Phagocytosis decreased for both oyster groups at the beginning of June (2-7 %), then increased during summer (Figure 1a).. For D and Dh, highest values were reached in September (38.3 % and 53.0 %, respectively) (Figure 1a).

Peroxidase values increased over the sampling period for all animals (D and Dh) from 2 % (end of May) to 25-45 % in September, with a decrease at the end of June and an increase in August. (Figure 1b).

Esterase positive cells increased for both oyster groups from 2 % in May to 20-30 % in June-July and 60-80 % in August (Figure 1c). Values decreased after the 08/08.

Granulocytes ranged from 4 % to 63 %, but values were comprised between 4 % and 20 % the best part of the sampling period for both oyster groups, except for 07/25 where high values were recorded (26.7 % and 63.1 % for D and Dh, respectively) (Figure 1d).

Cell mortality was low except for Dh the 07/25 where a brief increase was observed (86.1 %) (Figure 1e). Another peak, but less important, was observed for D at 08/08 (44.6 %).

Percentages of cells presenting aminopeptidase activity showed high (70-95 %) and comparable levels for both oyster groups before the end of June (Figure 1f).

Differences between D and Dh

Phagocytosis was the only parameter which could discriminate both oyster groups: values were higher for D compared to Dh all over the sampling period ($p < 0.05$, Table 1).

Characterisation of hemocyte parameters

Scale of distribution of hemocyte parameters

For each parameter (cell mortality, granulocyte percentage, percentage of cells presenting esterase, peroxidase and aminopeptidase activity, and phagocytosis), 64 values were obtained from the combined dates, oyster groups (D and Dh) and replicates (Figure 2).

Phagocytosis ranged from 1.6 % to 74.5 %, with a mean value of 20.6 % (Table 2). Most of the values fell between 10 % and 35 % (Figure 2a). Percentages of cells presenting an esterase activity were variable, ranging from 0.5 % to 84.1 % with a mean value of 18 % (Table 2). Most of values fell between 5 % and 25 % (Figure 2b). Percentages of cells presenting a peroxidase activity were lower, ranging from 0.5 % to 52.5 % with a mean value of 11.5 % (Table 2). Most of values fell between 5 % and 20 % (Figure 2c). Granulocyte percentages ranged from 1 % to 66.9 % (mean value of 10.9 %, Table 2). Most values fell between 5 % and 15 %, with seven atypical points falling above the upper quartile (Figure 2d). Hemocyte mortality showed a large distribution of values, which ranged from 1.8 % to 96.7 %, with a mean of 18.3 %. Values higher than 15 % were rare (Table 2). Most values fell between 5 % and 20 %, with seven atypical points above the upper quartile (Figure 2f). Finally, percentages of cells presenting an aminopeptidase (AP) activity were mainly distributed in the high values, with extreme values of 55.5 % and 96.7 %, and a mean value of 84.3 % (Table 2). Dispersion was low: most values fell between 75 % and 95 % (Figure 2e).

Correlation between hemocyte parameters

Matrix of correlation showed a highly significant correlation ($p < 0.001$) between (i) percentage of cells capable of phagocytosis and percentage of cells presenting an esterase activity ($R^2 = 0.493$, Table 3), (ii) phagocytosis and percentage of cells presenting a peroxidase activity ($R^2 = 0.497$, Table 3), and (iii) percentages of cells presenting an esterase activity and a peroxidase activity ($R^2 = 0.436$, Table 3). A high correlation was also reported between cell mortality and granulocyte percentage ($R^2 = 0.844$, Table 3). The percentage of cells presenting an aminopeptidase activity showed a lower significant correlation ($p < 0.01$) with percentage of cells presenting a peroxidase activity ($R^2 = 0.261$, Table 3) but seemed not to be related to other parameters.

Discussion

Hemocyte parameters including phagocytosis or free radical production are frequently used to define the immune status in bivalves (27-30). However, studies reporting temporal variations of such parameters are less frequent. Moreover, when such studies have been carried out, the frequency of sample collection was often low (31-34). One of the purpose of the present study was to use flow cytometry to analyse variations of hemocyte parameters during a seven-month period

during which samples were collected approximately every 7 to 14 days. Flow cytometry allows the rapid acquisition of information on several cell parameters simultaneously, and protocols have already been established for oyster hemocyte analysis (24, 27, 35, 36). Flow cytometry has already been used to analyse bivalve hemocytes, especially in immunotoxicity studies (37-39).

The hemocyte parameters selected herein were phagocytosis, presence of esterases, peroxidases and aminopeptidases, hemocyte mortality, and percentage of granulocytes. These parameters are frequently analysed to study the immune system in bivalves. Phagocytosis is frequently measured by chemiluminescence (29, 40, 41). Esterase and peroxidase activities have been measured by electron microscopy (6, 12). Aminopeptidase activity is frequently monitored by colorimetric methods (42) or spectrophotometry (43). Moreover, some of these activities, including phagocytosis, cell mortality, and esterase and peroxidase activities have already been analysed using flow cytometry in bivalves and vertebrates (30, 37-39, 44-48).

Hemocyte parameters increased during the course of the experiment, especially phagocytosis, esterase and peroxidase activities in both oyster groups, D and Dh. Values were low in spring (May and June) and then increased to reach a maximum value during summer (August). No study has reported kinetic trends in hemocyte parameters in *C. gigas*. However, some studies report differences in hemocyte characteristics in bivalves depending on the season. Pipe *et al.* (34) described seasonal changes in *Mytilus edulis* hemocyte parameters and demonstrated a minimal phagocytosis activity in April and a minimal peroxidase activity in June. Antioxidant enzymes, lysozyme and number of circulating hemocytes fluctuated depending on the season (32, 33, 49). A relationship between temperature and hemocyte parameters may also be hypothesised. An increase in water temperature induces an increase of physiological activities (50, 51) and may also enhance hemocyte activities.

Aminopeptidase activity showed no variation during the sampling period. It is implicated in bivalve internal defence because it can degrade parasite surface proteins (42). However, aminopeptidases are not exclusively involved in defence mechanisms considering their key role in physiological processes including acclimatization to salinity in *Mytilus edulis* (52) and digestion (53). Aminopeptidases appear also to be a relevant marker in *in vitro* studies. In the presence of mercury, hemocytes of *C. gigas* showed an increase of AP positive cells (35).

Immune parameters in vertebrates have been well studied, and for many of them, the scale of distribution of values is low. This allows definition of norms for immune parameters (54, 55). Flow cytometry analysis demonstrated in the present study great variations in values for some selected parameters. Data were obtained from two oyster groups, D and Dh, reared in the field during a

seven-month period. Statistical analysis was conducted by pooling all data. Thus, reported variations of immune parameters may result from individuals, groups or sampling dates. The inter-individual variation in immune parameters is well established in mussels. Production of superoxide anion, peroxidase and phenoloxidase activities often present high inter-individual variations (34, 56). Pools of hemolymph from ten oysters were used in order to limit inter-individual variability in our study. Different studies have also reported that bivalve immune parameters including total and different cell counts showed variability related to season or rearing area (41, 57, 58). Actually, oysters possess an open circulatory system (1), which implies a constant stimulation of the immune system by environmental variations.

High correlation between three parameters (i) phagocytosis, (ii) esterase and (iii) peroxidase activities was noticed. Previous studies described a relationship between phagocytosis and oxygen free radicals in bivalves, suggesting free radicals are produced in post-phagocytosis reactions to degrade infectious agents (10, 34, 56). Moreover, peroxidases are formed in the liberation of reactive oxygen species (10). Esterases act in post-phagocytosis reactions in vertebrate macrophages (59, 60).

The strong statistical relationship between granulocyte percentage and cell mortality was due only to sampling dates where these both parameters presented high values. This may indicate that when cell mortality occur, the first type of cells concerned are the granulocytes. However, granulocyte percentage is defined *via* a gate drawn on the cytogram. This measure may not be precise enough to define certainly granulocytes.

AP presented no correlation with any of the other hemocyte parameter monitored. However, 84 % of cells presented this activity. We can hypothesize that AP may be correlated to other hemocyte activities that those we monitored, according this enzyme is also implicated in digestion (53).

Only one hemocyte parameter (phagocytosis) allowed to show a difference between diploids from natural bed and hatchery diploids. However, this parameter is one of the most important defence activities in bivalve hemocytes (7, 30, 61). This result indicates that the use of hatchery products in shellfish culture needs more knowledge. They may possess a defence system different from oysters from natural bed and may render hatchery produced oysters more susceptible to infectious diseases.

In our study, we measured hemocyte activities such as esterase, aminopeptidase and peroxidase activities, and phagocytosis. However hemocyte are multi-functional cells and act particularly in physiological process including reproduction (58), digestion and nutrient transport (1), wound and shell repair. Therefore, hemocyte activities are not only indicators of immune activities and

capacities to fight again specific pathogens. High levels of such hemocyte parameters may not reflect a high defence capacity. For example, phagocytosis activity appears to be one of the most important non-specific defence systems (7, 30, 61). In our study, we measured phagocytosis activity by the internalisation of inert beads. This measure may not directly reflect an immune capacity. Most studies on the defence system of bivalves use these hemocyte parameters despite the paucity of evidence of their significance in protection against pathogens. To pass through these limits, some authors have used pathogenic agents to assess phagocytosis (62).

Acknowledgements

The authors would like to thank to Dr J.F. Samain (IFREMER, Brest, France) for managing the MOREST project group of research. Dr. P. Boudry and Dr. L. Degremont of the Laboratory of Genetic and Pathology of La Tremblade and the entire hatchery team are acknowledged for their contribution to oysters production. Dr. Philippe Gouletquer is acknowledged for his permission to perform these experiments in the laboratory. The authors also want to thank the Pr Susan Ford for her reading and her helpful corrections of these papers. The study was partly financially supported by the Poitou-Charentes Region.

References

- [1] Cheng TC. Bivalves. In: NA Ratcliffe, AF Rowley, NA Ratcliffe, AF Rowleys. *Invertebrate Blood Cells I*, London: Academic Press; 1981, p. 233-299
- [2] Fisher SW. Structure and functions of oyster hemocytes. In: M Brehélin, M Brehélin. *Immunity in Invertebrates*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1986, p. 25-35
- [3] Pipe RK. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal* 1990;22:595-603
- [4] Pipe RK. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental & Comparative Immunology* 1992;16:111-122
- [5] Cajaraville MP, Olabarrieta I, Marigomez I. *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1996;35:253-260
- [6] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1997;70:96-105
- [7] Cheng TC. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology* 1983;23:129-144

- [8] Cheng TC , Rodrick GE. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Comparative Biochemistry and Physiology, part B 1975;52:443-447
- [9] Moore CA , Gelder SR. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). Transactions of the American Microscopy Society 1985;104:242-249
- [10] Torreilles J, Guerin MC , Roch P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. Developmental & Comparative Immunology 1997;21:267-275
- [11] Gelder SR , Moore CA. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign material within hemocytes of *Mercenaria mercenaria*. Transactions of the American Microscopy Society 1986;105:51-58
- [12] Beckmann N, Morse MP , Moore CM. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology 1992;59:124-132
- [13] Chu F-LE , Hale RC. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research 1994;38:243-256
- [14] Fisher SW. Environmental influence on host response: environmental influence on bivalve hemocyte function. American Fisheries Society Special Publication 1988;18:225-237
- [15] Volety AK, Winstead JT , Fisher WS. Influence of seasonal factors on oyster hemocyte killing of *Vibrio parahemolyticus*. National Shellfisheries Association; 1999
- [16] Tall BD, La Peyre JF, Bier JW, Miliotis MD, Hanes DE, Kothary MH, Shah DB , Faisal M. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. Applied and Environmental Microbiology 1999;65:4261-4263
- [17] Tamplin ML , Capers GM. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light. Applied and Environmental Microbiology 1992;58:1506-1510
- [18] Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, Lange M , Poulet SA. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Diseases of Aquatic Organisms 2001;46:139-145
- [19] Friedman CS, Cherr GN, Clegg JS, Hamdoun AH, Jacobsen JL, Jackson SA , Uhlinger KR. Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oysters, *Crassostrea* spp. National Shellfisheries Association; 1999
- [20] Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A , Poulet SA. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. Applied and Environmental Microbiology 2001;67:2304-2309

- [21] Lacoste A, Malham SK, Gelebart F, Cueff A , Poulet SA. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 2002;26:1-9
- [22] Lacoste A, De Cian MC, Cueff A , Poulet SA. Noradrenaline and alpha -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science* 2001;114:3557-3564
- [23] Soletchnik P, Huvet A, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, Gouletquer P , Boudry P. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquatic Living Resources* 2002;15:243-250
- [24] Renault T, Xue QG , Chilmonczyk S. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 2001;11:269-274
- [25] Xue QG, Renault T , Chilmonczyk S. Flow cytometric assessment of haemocyte subpopulations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology* 2001;11:557-567
- [26] Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C , Moraga D. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 2002;54:585-589
- [27] Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapegue S , Thomas-Guyon H. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 2003;9:193-199
- [28] Cheng TC , Sullivan JT. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research* 1984;14:305-315
- [29] Anderson RS, Mora LM , Thomson SA. Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 1994;108:215-220
- [30] Alvarez MR, Friedl FE, Johnson JS , Hirsch GW. Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 1989;54:233-241
- [31] Auffret M , Oubella R. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 1997;118:705-712
- [32] Fisher WS, Oliver LM, Winstead JT , Long ER. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology* 2000;51:115-138
- [33] Oliver LM, Fisher WS, Winstead JT, Hemmer BL , Long ER. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology* 2001;55:203-222

- [34] Pipe RK, Coles JA, Thomas ME, Fossato VU , Pulsford AL. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology* 1995;32:59-73
- [35] Gagnaire B, Thomas-Guyon H , Renault T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 2004;16:501-512
- [36] Lambert C, Soudant P, Choquet G , Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 2003;15:225-240
- [37] Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H , Fournier M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 2000;142:145-156
- [38] Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y , Brousseau P. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 2001;161:201-211
- [39] Sauve S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Senecal L, Goudreau P , Fournier M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 2002;58:189-200
- [40] Anderson RS, Oliver LM , Brubacher LL. Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *Journal of Invertebrate Pathology* 1992;59:303-307
- [41] Auffret M , Oubella R. Cytometric parameters of bivalve molluscs : effect of environmental factors. In: JS Stolen, TC Fletcher, JS Stolen, TC Fletcher. *Modulators of fish immune responses*, Fair Haven, NJ, USA: SOS Publication; 1994, p. 23-32
- [42] Cheng TC, Lie KJ, Heyneman D , Richards CS. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 1978;31:57-62
- [43] Mohandas A , Cheng TC. Release pattern of aminopeptidase from *Biomphalaria glabrata* hemocytes subjected to high-level bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 1985;45:298-303
- [44] Fournier M, Pellerin J, Lebeuf M, Brousseau P, Morin Y , Cyr D. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology* 2002;59:83-92
- [45] Malin-Berdel J , Valet G. Flow cytometric determination of esterase and phosphatase activities and kinetics in hematopoietic cells with fluorogenic substrates. *Cytometry* 1980;1:222-228

- [46] Rothe G, Oser A , Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988;75:354-355
- [47] Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M , Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *Journal of Immunological Methods* 1995;178:89-97
- [48] Ganesh S, Klingel S, Kahle H , Valet G. Flow cytometric determination of aminopeptidase activities in viable cells using fluorogenic rhodamine 110 substrates. *Cytometry* 1995;20:334-340
- [49] Sole M, Porte C , Albaiges J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of the Total Environment* 1995;159:147-153
- [50] Peck LS, Portner HO , Hardewig I. Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiological and Biochemical Zoology* 2002;75:123-133
- [51] Cheney DP, MacDonald BF , Elston RA. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* 2000;19:353-359
- [52] Garthwaite RL. Leucine aminopeptidase variation and fitness parameters in the estuarine bivalve *Geukensia demissa*. *Marine Biology* 1989;103:183-192
- [53] El Kordy EA, Kamel KE, Shoukry MA , Shehata MG. Induction of some digestive enzymes in the midgut of the sandfly *Phlebotomus langeroni* after sugar and blood meals. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 1999;29:669-686
- [54] Custer EM, Finch CA, Sobel RE , Zettner A. Population norms for serum ferritin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1995;126:88-94
- [55] Strongin GL , Skvortsov SA. Individual differences and individual norms in automated preflight medical checkup. *Kosmicheskaja Biologija i Aviakosmicheskaja Meditsina* 1988;22:10-16
- [56] Pipe RK, Coles JA, Carissan FMM , Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 1999;46:43-54
- [57] Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L , Birkbeck TH. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture* 2004;229:401-418
- [58] Svardh L , Johannesson K. Incidence of hemocytes and parasites in coastal populations of blue mussels (*Mytilus edulis*)--testing correlations with area, season, and distance to industrial plants. *Journal of Invertebrate Pathology* 2002;80:22-28
- [59] Rojas-Espinosa O, Arce-Paredes P, Dannenberg AM , Kamaenetz RL. Macrophage esterase: identification, purification and properties of a chymotrypsin-like esterase from lung that hydrolyses

and transfers nonpolar amino acid esters. *Biochimica and Biophysica Acta - Enzymology* 1975;403:161-179

[60] Butor C, Griffiths G, Aronson NN, Jr. , Varki A. Co-localization of hydrolytic enzymes with widely disparate pH optima: implications for the regulation of lysosomal pH. *Journal of Cell Science* 1995;108 (Pt 6):2213-2219

[61] Goedken M , De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology* 2004;16:539-552

[62] Anderson RS, Bureson EM , Paynter KT. Defense Responses of Hemocytes Withdrawn from *Crassostrea virginica* Infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1995;66:82-89

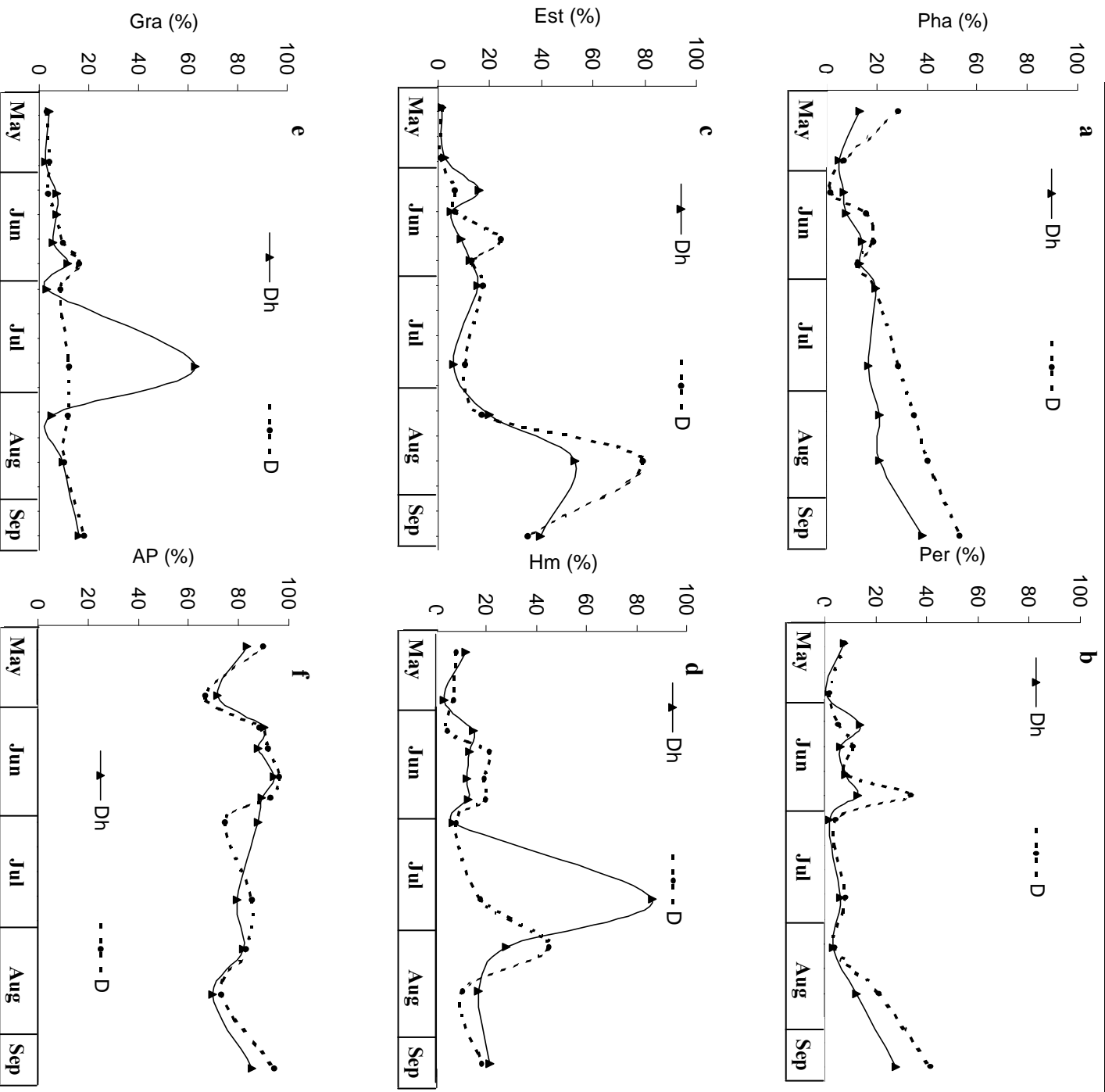


Figure 1. Percentages of cells showing phagocytic activity (a), percentage of cells presenting a peroxidase activity (b), percentage of cells presenting an esterase activity (c), percentage of dead cells (d), granulocyte percentage (e) and percentage of cells presenting an aminopeptidase activity (f) for wild diploids (D) and hatchery diploids (Dh).

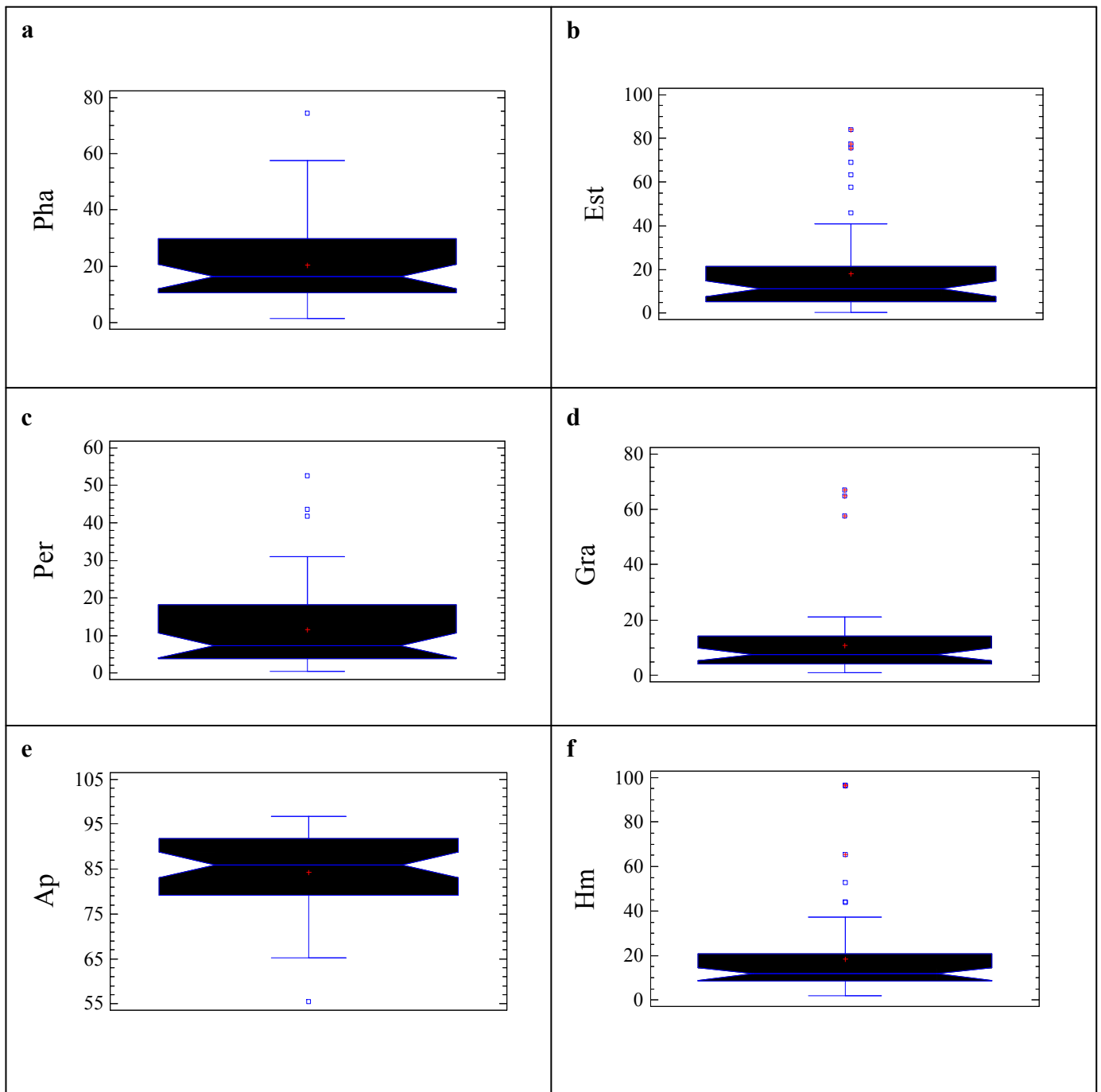


Figure 2 : Scale of distribution of the 64 values collected for each parameter. Box plots present distribution of variable with two quartiles (black surface) above and below the median, and the two last quartiles (horizontal lines). a: percentage of cells showing phagocytosis activity *in vitro* ; b: percentage of cells presenting a esterase activity ; c: percentage of cells presenting a peroxidase activity ; d: granulocyte percentage ; e: percentage of cells presenting an aminopeptidase activity ; f: cell mortality. Atypical points correspond to points outside the upper quartile.

Table 1. Comparison of both means for hemocyte parameters between diploids from natural bed (D) and hatchery diploids (Dh). *: $p < 0.05$.

Hemocyte parameter	Oyster population
Mortality	NS
Phagocytosis	D>Dh *
Esterases	NS
Peroxidases	NS
Granulocytes	NS
AP	NS

Table 2 : Descriptive statistics (means and standard error) for each hemocyte parameter measured (N=64 for each parameter). Values are percentages of positive cells.

Parameter	Mean value	Standard error	Minimum	Maximum
Phagocytosis	20.6	1.9	1.6	74.5
Esterase	17.9	2.6	0.5	84.1
Peroxidase	11.5	1.5	0.5	52.5
Granulocytes	10.9	1.6	1	66.9
AP	84.3	1.2	55.5	96.7
Cell mortality	18.4	2.3	1.8	96.7

Table 3 : Correlation matrix between the hemocyte parameters (1). Values correspond to the correlation coefficients. * corresponds to the significance of the correlation : NS = non significant ; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

	Pha	Est	Per	Gra	Ap	Hm
Pha	1					
Est	0.493 ***	1				
Per	0.497 ***	0.436 ***	1			
Gra	0.126 NS	0.013 NS	0.198 NS	1		
Ap	0.163 NS	-0.22 NS	0.261 *	-0.016 NS	1	
Hm	0.125 NS	-0.089 NS	-0.026 NS	0.844 ***	-0.045 NS	1

(1). Phagocytosis (Pha) esterase (Est) and peroxidase (Per) activities; granulocyte percentage (Gra), aminopeptidase activity (Ap) and hemocyte mortality (Hm).

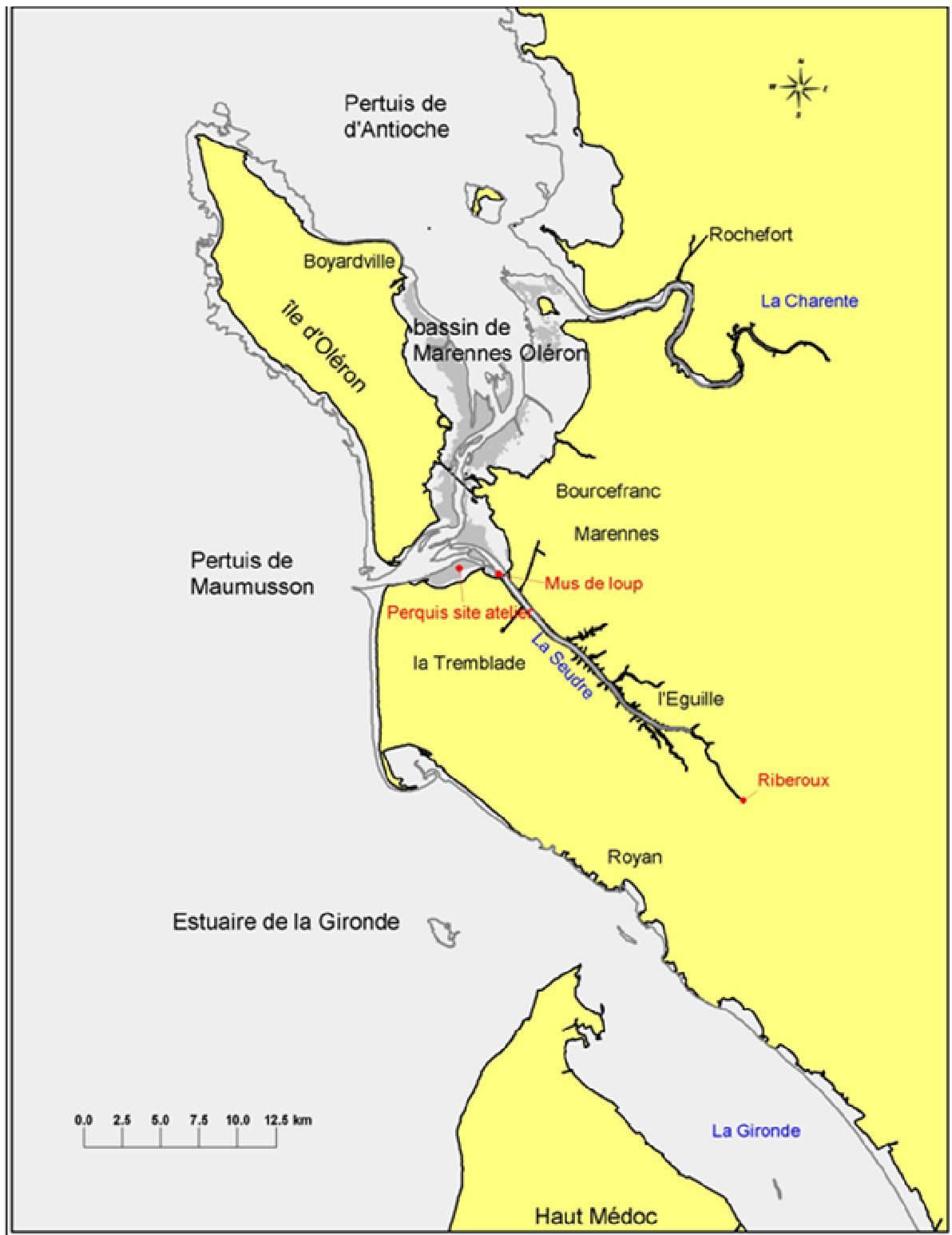


Figure 70 : situation géographique du site atelier (Perquis) et des sites de prélèvements d'eau (Mus de Loup et Riberoux) pour les analyses de pesticides (Burgeot, communication personnelle).

III Suivi des paramètres hématocytaires en relation avec la maturation sexuelle et la mortalité estivale chez quatre populations d'huîtres (DYNAMOR, 2003)

Cette expérience fait suite à l'expérience DYNAMO. Cette dernière a permis de montrer que les activités hématocytaires (phagocytose, présence d'estérasés et peroxydases) de l'huître creuse, *C. gigas*, variaient en fonction de l'origine génétique et de l'état physiologique des animaux (diploïdes versus triploïdes). L'expérience DYNAMO a permis d'explorer une des grandes hypothèses du programme MOREST : la mise en cause du fonctionnement du système de défense dans le phénomène de mortalité estivale.

En 2003, l'expérience DYNAMOR (DYNAmique des MORTalités) a permis d'étudier de nouveau l'influence de deux environnements (15 cm versus 70 cm) sur le site de Ronce-les-Bains (Charente-Maritime). Des cheptels de 18 mois d'origines génétiques différentes ont également été comparés en associant des familles « R » et « S ». Dans cette expérience, la mortalité, les quantités de lipides qualifiant les différents stades de maturation, les variations de biomarqueurs physiologiques et des paramètres hématocytaires ont été suivis selon un pas de prélèvement serré pendant 5 mois afin de rechercher un lien possible entre origine génétique, environnement, physiologie (y compris les réponses hématocytaires) et mortalités estivales. Dans ce contexte, la mesure des paramètres hématocytaires permettrait de démontrer leur intérêt en tant qu'élément discriminant des deux types de familles « R » et « S ».

Dans cette étude, plus de 20 partenaires représentant différentes thématiques (pathologie, écologie côtière, écotoxicologie, reproduction) ont participé. La mesure de la concentration de pesticides dans l'environnement a également été intégrée dans le travail.

III.1. Matériel et Méthodes

Le site atelier choisi pour réaliser cette expérience était Ronce Perquis (Bassin de Marennes-Oléron, Charente-Maritime) (**Figure 70**). L'expérience s'est déroulée de mars à septembre 2003. Différents cheptels (diploïdes de captage naturel (D), triploïdes (T), diploïdes « résistants » « R » et « sensibles » « S ») ont été placés sur le terrain. Ces animaux étaient répartis en poche et placés sur des tables ostréicoles à deux hauteurs : 15 cm et 70 cm (**Figure 68**). La mortalité sur estran des animaux a été évaluée pour chaque condition (Gagnaire *et al.*, sous presse b). Trente animaux de chaque condition (site et cheptel) ont été échantillonnés à onze dates : 20 mars, 22 avril, 14 et 26 mai, 2, 10, 16, 19, 23 et 26 juin, et 16 juillet. Ces 30 huîtres ont été réparties en trois pools de dix.

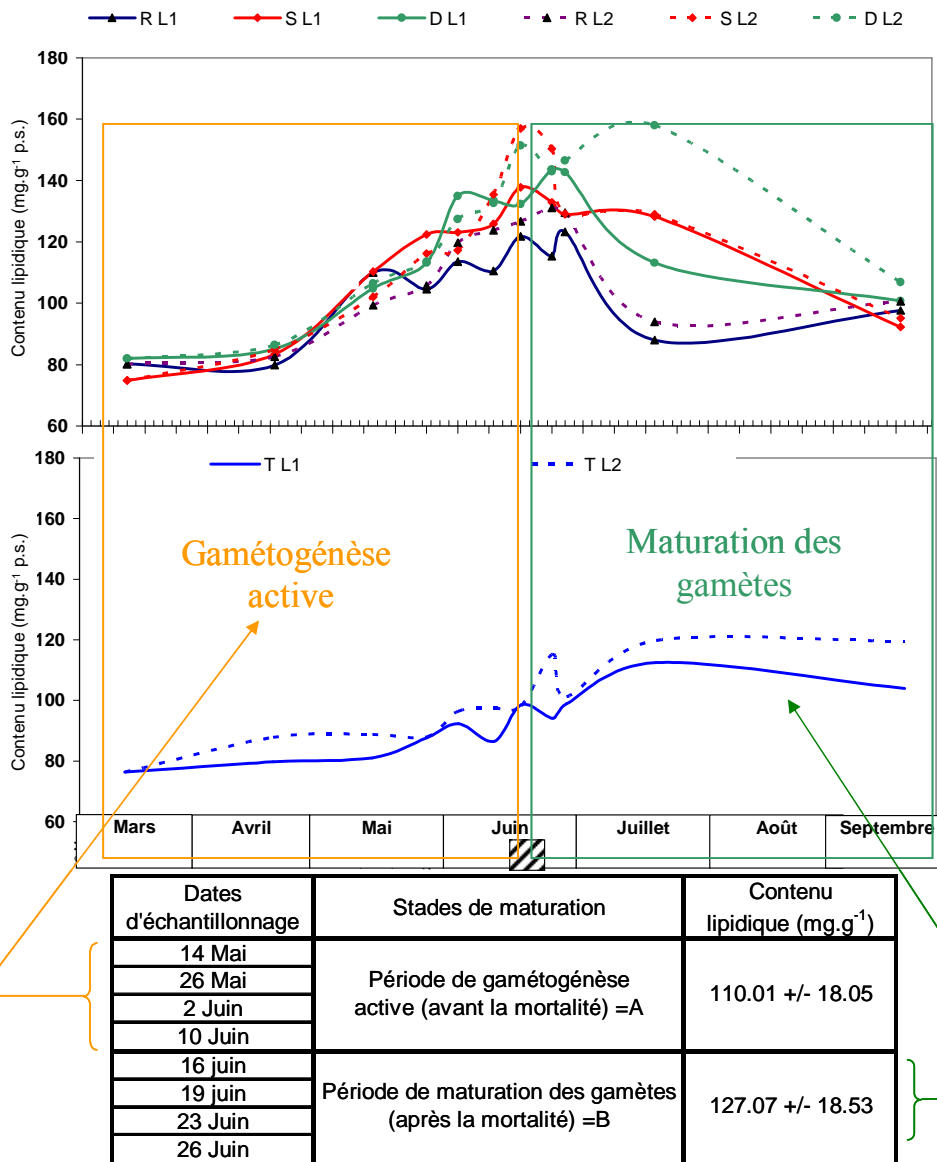


Figure 71 : détermination des stades de maturation en fonction de la quantité de lipides (mg.g⁻¹ p.s.) (Soletchnik, communication personnelle) et de la période de mortalité (représentée par le rectangle hachuré) pour les 4 cheptels étudiés. R : « résistante », S : « sensible », D : diploïdes de captage naturel, T : triploïdes, L1 : 15 cm, L2 : 60 cm.

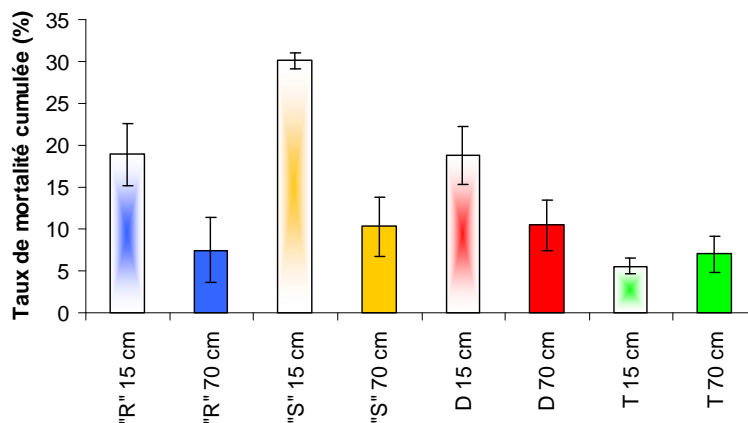


Figure 72 : mortalité des différents cheptels (triploïdes, diploïdes de captage naturel, « R » et « S ») pour les deux hauteurs de table (15 cm et 70 cm) (moyennes des mortalités obtenues sur 3 poches ± intervalle de confiance à 95 %) (Soletchnik, communication personnelle).

L'hémolymphe a été prélevée dans le cœur (**Annexe 2.2**), filtrée sur 60 μm et la concentration en hématocytes circulants a été ajustée à 10^6 cellules.mL⁻¹ par ajout d'EDMAS (**Annexe 3.2**) (cf première partie, III.1). Les analyses ont été réalisées immédiatement après prélèvement.

Afin d'étudier l'effet de la maturation, les dates de prélèvement ont été regroupées en deux périodes, séparées par l'épisode de mortalité qui a eu lieu autour du 14 juin 2003 et déterminées en fonction du stade de maturation des animaux (quantité de lipides). La première période, notée A, correspond à quatre dates de prélèvement (14 et 26 mai, 2 et 10 juin) et à la période de gamétogénèse active. La deuxième période, notée B, correspond à quatre dates de prélèvements (16, 19, 23 et 26 juin) et à la période d'« attente de ponte » (période de maturation sexuelle avancée précédant la ponte) (**Figure 71**).

Des corrélations statistiques ont été recherchées entre les différents paramètres hématocytaires et entre les paramètres hématocytaires et certains facteurs environnementaux (température de l'eau et de l'air, salinité, pH, turbidité, oxygène dissous) (**Annexe 2.3**). Une moyenne sur cinq jours des paramètres environnementaux a été utilisée pour les analyses statistiques.

III.2. Résultats

III.2.1. Mortalité

L'épisode de mortalité apparaît entre le 12 et le 15 juin 2003. La mortalité varie entre 5.5 % (triploïdes à 15 cm) et 30.1 % (« S » à 15 cm). Les huîtres triploïdes présentent les mortalités les plus faibles sur estran quelle que soit la hauteur (**Figure 72**). Le cheptel « R » présente une mortalité plus forte que les triploïdes, mais moins élevée que les huîtres diploïdes de captage naturel (**Figure 72**). Le cheptel « S » présente les plus fortes mortalités (**Figure 72**). Les mortalités des cheptels « R », « S » et D sont plus fortes à 15 cm en comparaison avec 70 cm (**Figure 72**). Les triploïdes présentent les plus faibles mortalités, sans différences entre 15 cm et 70 cm (**Figure 72**).

III.2.2. Recherche de pesticides dans l'eau et dans les huîtres

Une recherche de la présence de 21 pesticides (2,4-D, 2,4,5-T, alachlore, aminotriazole, AMPA, atrazine, bentazone, carbaryl, carbofuran, dieldrine, diméthénamide, diuron, glyphosate, isoproturon, mécoprop, métazachlore, métolachlore, parathion M, simazine, terbuthylazine, trifluraline) a été réalisée par le GIRPA (Groupe Interrégional de Recherche sur les Produits Agropharmaceutiques) dans des échantillons d'eau prélevés sur deux sites (Mus de Loup (eau de mer) et Riberoux (eau douce)) (**Figure 70**). Quatre molécules sont retrouvées dans les eaux prélevées à Mus de Loup (carbaryl, glyphosate, isoproturon, mécoprop). Les plus fortes valeurs sont

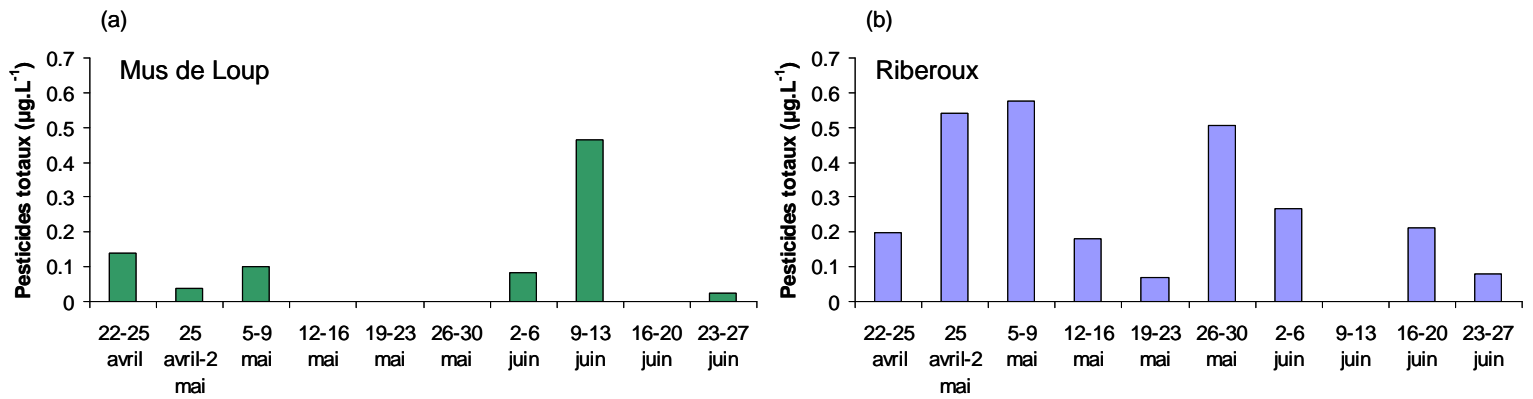


Figure 73 : concentrations en pesticides totaux ($\mu\text{g.L}^{-1}$) entre le 22 avril et le 27 juin dans les échantillons d'eau prélevés à Mus de Loup (eaux marines, Seudre aval) (a) et à Riberooux (eaux douces, Seudre amont) (b) (Géret, communication personnelle).

	Mortalité	Estérases	Lysosome	ROS	Phagocytose	Granulocytes	Nombre
Mortalité	1						
Estérases	-0.231 ***	1					
Lysosome	-0.115 NS	0.477 ***	1				
ROS	0.109 NS	-0.138 *	0.188 **	1			
Phagocytose	-0.105 NS	0.172 *	0.429 ***	0.138 *	1		
Granulocytes	0.046 NS	0.112 NS	0.485 ***	0.342 ***	0.354 ***	1	
Nombre	-0.167 *	0.019 NS	-0.210 **	-0.309 ***	0.009 NS	-0.108 NS	1

Tableau 19 : matrice de corrélation entre les paramètres hématocytaires obtenus toutes données confondues (cheptels et sites). * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

de $0.464 \mu\text{g.L}^{-1}$ entre le 9 et le 13 juin, la présence de l'isoproturon étant prépondérante (**Figure 73a**). Les valeurs de glyphosate sont maximales pour les prélèvements entre le 22 avril et le 2 mai (**Figure 73a**). Neuf molécules sont retrouvées dans les eaux prélevées à Riberoux (2,4-D, alachlore, atrazine, bentazone, carbaryl, glyphosate, isoproturon, mécoprop, terbuthylazine). Les concentrations en glyphosate sont maximales dans les prélèvements jusqu'au 16 mai, ensuite les valeurs de l'atrazine sont prédominantes. Les sommes les plus élevées des pesticides sont obtenues du 25 avril au 2 mai ($0.542 \mu\text{g.L}^{-1}$), du 5 au 9 mai ($0.575 \mu\text{g.L}^{-1}$) et du 26 au 30 mai ($0.507 \mu\text{g.L}^{-1}$) (**Figure 73b**).

III.2.3. Corrélation entre les paramètres hématocytaires suivis

Il existe une corrélation positive entre la phagocytose, le pourcentage de cellules pour les estérases, la production d'EOR et la présence de lysosomes (**Tableau 19**). D'autre part, une forte corrélation positive existe entre le pourcentage de granulocytes, les lysosomes, les peroxydases et la phagocytose (**Tableau 19**). Le nombre d'hématocytes circulants est corrélé négativement à la production d'EOR, à la présence de lysosomes et à la mortalité hématocytaire (**Tableau 19**). La mortalité hématocytaire est également faiblement corrélée négativement aux estérases (**Tableau 19**).

III.2.4. Effet cheptel et environnement

Des analyses statistiques ont testé l'effet cheptel et environnement (hauteur de table) sur les paramètres hématocytaires. Les paramètres hématocytaires tels que le pourcentage de cellules positives pour les estérases et les lysosomes présentent des valeurs plus faibles chez les huîtres diploïdes (D, « R » et « S ») (**Figure 74**). Les plus faibles valeurs de phagocytose sont retrouvées pour les familles sélectionnées (« R » et « S »). Il n'y a pas de différences entre « R » et « S » pour aucun des paramètres hématocytaires suivis (**Figure 74b**). Les triploïdes présentent les valeurs maximales pour plusieurs paramètres hématocytaires (présence de lysosomes, phagocytose et pourcentage de cellules pour les estérases) (**Figure 74**). Certaines activités (présence de lysosomes et pourcentage de cellules pour les estérases) présentent des valeurs supérieures à 15 cm par rapport à 70 cm (**Figure 74a et c**). Ce n'est pas le cas pour la phagocytose (**Figure 74b**). Les résultats concernant les autres paramètres ne sont pas présentés car ils ne mettent en évidence aucune différence entre cheptels ou environnements.

III.2.5. Effet cheptel et période

Des analyses statistiques ont testé l'effet cheptel et période sur les paramètres hématocytaires. Le pourcentage de cellules positives pour les lysosomes est supérieur en période A (avant la mortalité) par rapport à la période B (après la mortalité) pour les huîtres diploïdes D, alors qu'aucune variation

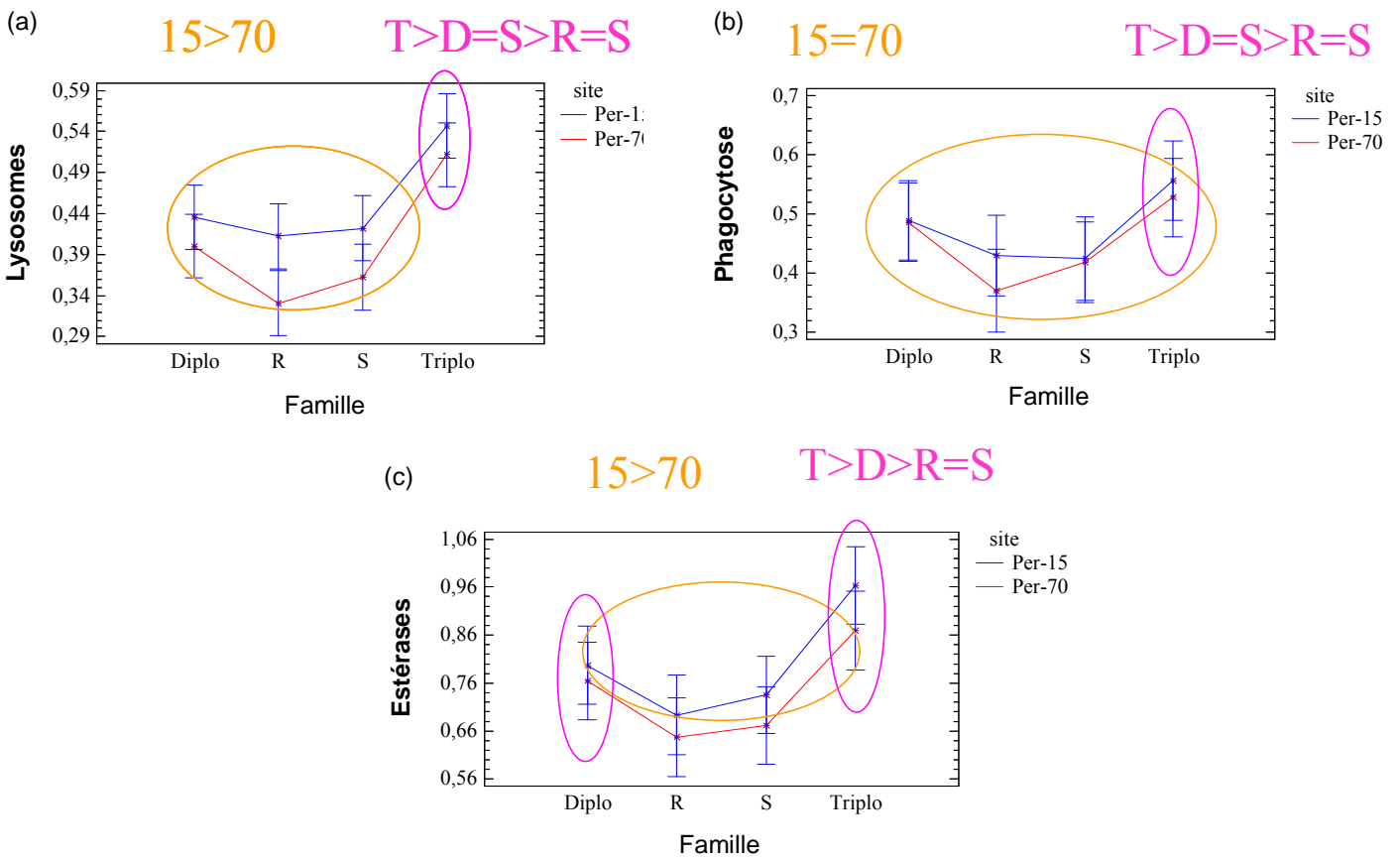


Figure 74 : résultats des analyses d'ANOVA pour la présence de lysosomes (a), la phagocytose (b) et les cellules positives pour les estérases (c), différenciant les effets des cheptels et de l'environnement.

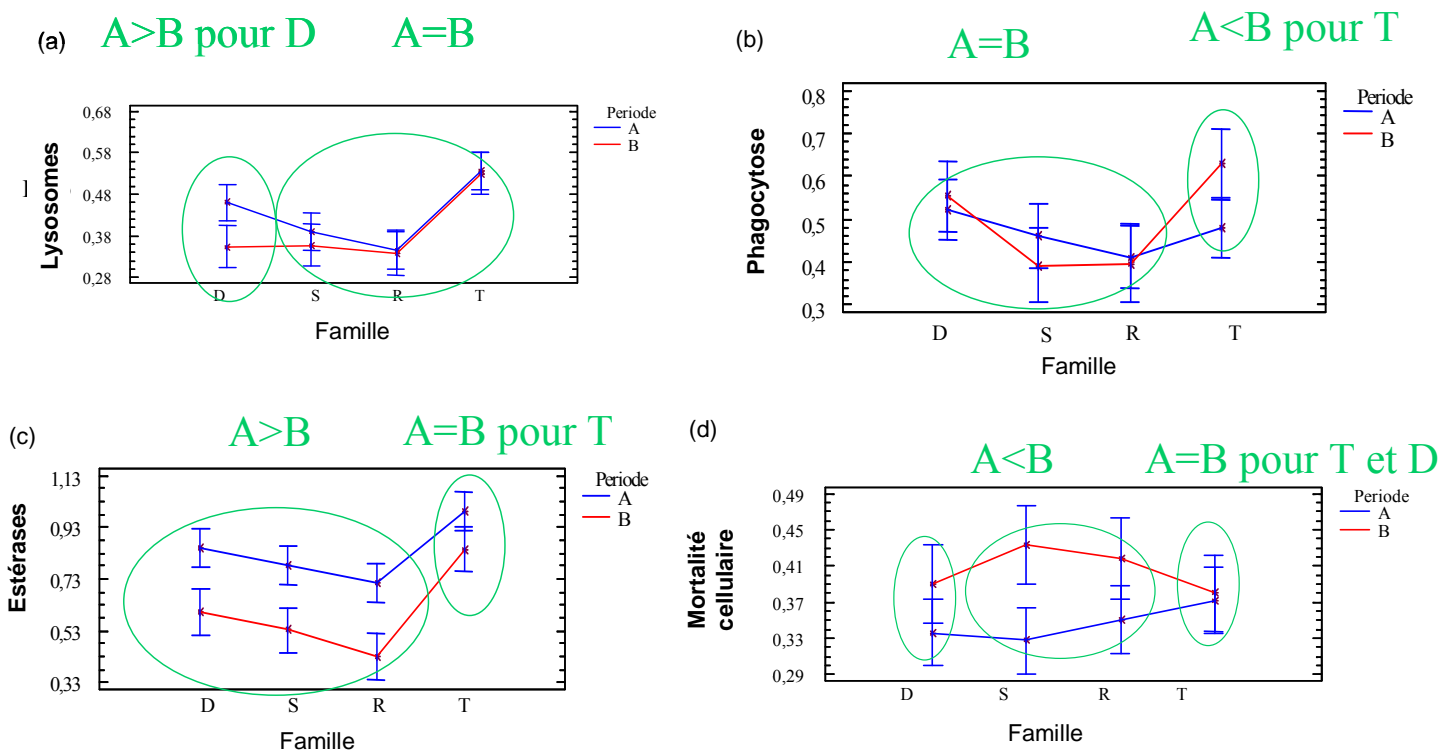


Figure 75 : résultats des analyses d'ANOVA pour la présence de lysosomes (a), la phagocytose (b), les cellules positives pour les estérases (c) et la mortalité cellulaire (d) différenciant les effets des cheptels et de la période.

n'est observée entre les deux périodes pour les autres cheptels (**Figure 75a**). Les valeurs de la phagocytose ne présentent pas de différences entre les périodes A et B pour les huîtres diploïdes, mais sont plus importantes en période B qu'en période A pour les huîtres triploïdes (**Figure 75b**). Le pourcentage de cellules positives pour les estérases est supérieur en période A (gamétogénèse active) par rapport à la période B (après la mortalité) pour les huîtres diploïdes (D, « R » et « S »), alors qu'aucune différence n'est observée pour les huîtres triploïdes (**Figure 75c**). La mortalité hémostatique permet elle aussi de différencier les deux périodes, avec des valeurs plus importantes en période B (après la mortalité) pour les « R » et « S ». Les huîtres triploïdes et les huîtres diploïdes D ne présentent aucune différence entre les deux périodes (**Figure 75d**). Les résultats concernant les autres paramètres ne sont pas présentés car ils ne mettent en évidence aucune différence entre cheptels ou périodes.

III.2.6. Relations entre facteurs environnementaux et paramètres hémostatiques

Une analyse statistique a permis de mesurer les relations entre les facteurs environnementaux mesurés en parallèle au cours de l'expérience DYNAMOR et les paramètres hémostatiques. Les facteurs environnementaux testés étaient la température de l'eau et de l'air, la salinité, le pH, la turbidité, l'oxygène dissous et la concentration en pesticides totaux.

La matrice de corrélation montre que la mortalité hémostatique est corrélée positivement à la température de l'air et de l'eau, à la salinité et au pH (**Tableau 20**). Le pourcentage de cellules positives pour les estérases est corrélé négativement à la température de l'eau (**Tableau 20**). La phagocytose est corrélée négativement à la température de l'air et le pourcentage de granulocytes est corrélé positivement à la turbidité (**Tableau 20**).

Un modèle de régression multiple à sélection ascendante a été utilisé afin d'expliquer de la variabilité des paramètres hémostatiques en fonction des différents paramètres environnementaux. Les données étant peu nombreuses, le modèle n'a permis de tester que certains paramètres environnementaux (température de l'eau, salinité, pH, turbidité et concentration en pesticides totaux). Les résultats montrent que le pourcentage de cellules positives pour les estérases diminue quand la température de l'eau augmente ($p < 0.0479$) (**Tableau 21**). La mortalité hémostatique augmente avec le pH ($p < 0.0234$) et le pourcentage de granulocytes augmente avec la turbidité ($p < 0.0447$) (**Tableau 21**).

III.3. Discussion

Les résultats s'intègrent dans l'expérience DYNAMOR ayant pour objectif de définir le risque environnemental subi par les huîtres « R » et « S » dans le bassin de Marennes- Oléron (**Figure 76**).

	Mortalité	Estérase	Lysosome	Peroxydase	Phagocytose	Granulocytes	Nombre
T°C eau	0.7119 *	-0.7112 *	0.2149	0.2419	-0.5026	-0.2034	-0.4977
Salinité	0.7198 *	-0.4509	0.5154	0.3762	-0.5281	0.2481	-0.204
O ₂ dissous	-0.4	0.4675	-0.3596	-0.0984	0.1974	0.2181	0.6992
pH	0.7767 *	-0.6391	0.0653	0.2713	-0.6196	-0.4457	-0.65
Turbidité	-0.1465	0.6004	0.4982	-0.0906	0.4182	0.7185 *	0.2446
T°C air	0.7354 *	-0.4949	0.3593	0.4816	-0.7427 *	0.04	-0.2082
pesticides totaux	0.5084	0.1111	-0.1501	0.0325	-0.1647	0.0485	0.0279

Tableau 20 : matrice de corrélation entre les paramètres hématocytaires et les facteurs environnementaux toutes données confondues (cheptels et sites). * : $p < 0.05$.

Facteurs explicatifs dans le modèle	β^*	p	Pourcentage expliqué de la variance
Estérases			
Température eau	-2.4783	0.0479	50.58
Mortalité			
pH	3.02023	0.0234	60.32
Granulocytes			
turbidité	2.53037	0.0447	51.62

* β représente la valeur de chaque variable indépendante dans le modèle de régression multiple. Le signe de β indique la direction de l'effet.

Tableau 21 : facteurs environnementaux influençant les paramètres hématocytaires dans le modèle de régression multiple.

III.3.1. Mortalité des huîtres

Des études de terrain ont été réalisées depuis de nombreuses années en Charente-Maritime (Lodato, 1997; Gouilletquer *et al.*, 1998; Soletchnik *et al.*, 1999, 2003, 2005). Ces études ont permis de montrer que la mortalité des huîtres creuses, *C. gigas*, est plus importante proche du sédiment (15 cm). Ce résultat a été confirmé dans l'étude DYNAMOR. A 15 cm, la mortalité moyenne tous cheptels confondus était de 18.3 %, inférieure à celle observée à 70 cm (8.8 %). Ceci a été également observé chez *Saccostrea glomerata* en Australie : la mortalité des huîtres est plus forte à proximité du sédiment (Smith *et al.*, 2000). A 15 cm, la maturation est plus importante et la probabilité de rencontrer un agent infectieux pourrait l'être également.

Cette étude a également intégré des cheptels « R » et « S », produits de sélection génétique présentant des sensibilités différentes à la mortalité sur estran (Dégremont *et al.*, 2005). Par ailleurs, peu de suivis sur le terrain ont été réalisés en utilisant des diploïdes d'écloserie (Fisher *et al.*, 2003). Les résultats obtenus pour la mortalité confirment les résultats précédents. Les « S » ont présenté une mortalité plus forte que les « R » dans les deux environnements étudiés (15 cm et 70 cm). Les huîtres « S » semblent donc être plus sensibles aux variations des facteurs environnementaux. Cependant, la différence de mortalité entre « R » et « S » est moins marquée à 70 cm.

Les triploïdes ont présenté la plus faible mortalité sur estran ; ce résultat confirme les résultats précédemment obtenus (Gagnaire *et al.*, sous presse b). La littérature rapporte des résultats contradictoires sur la mortalité des triploïdes : dans certaines études, elle est supérieure à celle des diploïdes, alors que c'est l'inverse dans d'autres (discussion dans Gagnaire *et al.*, sous presse b).

En 2003 (DYNAMOR), les mortalités sont apparues en juin, mais 15 jours plus tôt que les années précédentes (Soletchnik *et al.*, 1998b; Gagnaire *et al.*, sous presse b). Les fortes températures observées en 2003 (liées à la canicule) ont pu accentuer l'ensemble des événements conduisant à la mortalité et l'avancer. Cependant, les mortalités obtenues en 2003 sont plus faibles qu'en 2002 (30.1 % pour les « S » à 15 cm en 2003, 44.4 % pour les diploïdes d'écloserie à 15 cm en 2002) (Gagnaire *et al.*, sous presse b).

Lors de l'expérience DYNAMOR (2003), les mortalités sont apparues entre les périodes A (gamétogénèse active) et B (maturation des gamètes, commençant le 16 juin). Dans l'étude réalisée en 2002 (DYNAMO), les mortalités avaient eu lieu pendant la période B (commençant le 20 juin) (Gagnaire *et al.*, sous presse b). Les durées des périodes A d'une part et B d'autre part étaient identiques entre 2002 et 2003, et elles correspondaient donc aux mêmes événements (A : gamétogénèse active, B : maturation des gamètes).

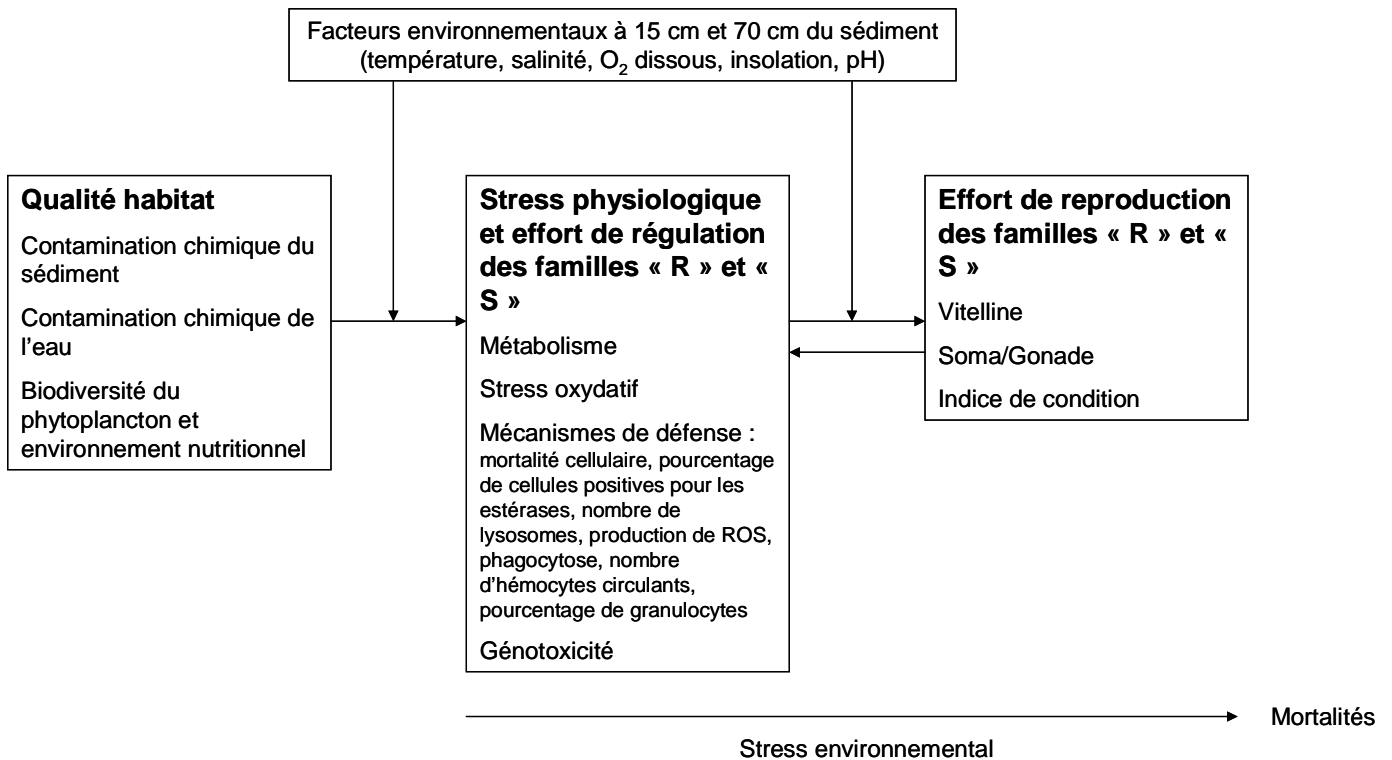


Figure 76 : schéma conceptuel de l'étude du risque environnemental réalisé au cours de l'expérience DYNAMOR en 2003 chez *C. gigas* - interactions croisées de la distance au sédiment (15 cm et 70 cm) et de la variabilité de réponse des familles « R » et « S » (Burgeot, communication personnelle).

III.3.2. Corrélations des paramètres hémoctaires entre eux

Une forte corrélation a été démontrée entre certains paramètres : phagocytose, pourcentage de cellules positives pour les estérases, production d'EOR et présence de lysosomes. De nombreuses études ont mis en évidence une relation entre la phagocytose et la production de radicaux libres de l'oxygène. Ces derniers interviennent dans les réactions post-phagocytaires de dégradation des agents infectieux (Pipe *et al.*, 1995a, 1999; Torreilles *et al.*, 1997). Les estérases sont largement représentées dans les macrophages de vertébrés (Rojas-Espinosa *et al.*, 1975; Butor *et al.*, 1995) et agissent également dans les réactions post-phagocytaires de dégradation. Enfin, les lysosomes interviennent dans la formation du phagolysosome, vésicule où se déroulent les réactions de dégradation (Cheng, 1983). Une corrélation entre phagocytose, cellules positives pour les estérases et production d'EOR a déjà été démontrée (Gagnaire *et al.*, soumis). Le présent travail et l'étude précédente (Gagnaire *et al.*, soumis) sont à notre connaissance les seuls à avoir démontré une relation statistique entre ces différents paramètres. La production d'EOR, la phagocytose et la présence de lysosomes étaient également fortement corrélées au pourcentage de granulocytes. Les granulocytes participent activement à la phagocytose et à la production d'EOR et contiennent des lysosomes (Cheng, 1983). Ce sont les cellules considérées comme les plus actives chez les bivalves (Cheng, 1981, 1983; Fisher, 1986; McCormick-Ray & Howard, 1991; Carballal *et al.*, 1997b). Ils relarguent également des estérases. Cependant, aucune corrélation entre le pourcentage de cellules positives pour les estérases et le pourcentage de granulocytes n'a été mise en évidence. La relation entre la mortalité et le nombre d'hémocytes peut s'expliquer car plus la mortalité est grande, plus le nombre d'hémocytes circulants doit diminuer. Cependant, les hémocytes sont présents dans le système circulatoire, mais également dans les tissus. Il est possible de suspecter que lorsque les hémocytes circulants présentent de la mortalité, ils sont remplacés par des hémocytes libérés des tissus. La corrélation apparaît donc complexe à expliquer.

Des études chez *C. virginica* déployées sur Tampa Bay (Floride, USA) ont déjà rapporté des corrélations entre paramètres hémoctaires différents de ceux étudiés ici. La densité hémoctaire, le taux de locomotion, le pourcentage de mobilité, la production d'O₂⁻, l'indice de liaison aux particules et le lysozyme étaient positivement corrélés (Fisher *et al.*, 2000). Une autre étude rapporte des corrélations négatives entre la production d'EOR et l'infection à *P. marinus* (Oliver *et al.*, 2001).

III.3.3. Effet des cheptels

Une étude des capacités immunitaire chez des huîtres a été réalisée pour la première fois en 2002 (DYNAMO), dans le cadre de ce travail de thèse. En effet, une étude similaire avait consisté à

placer des animaux sur le terrain et à faire un suivi de paramètres hémoctaires (Gagnaire *et al.*, sous presse b; Gagnaire *et al.*, soumis).

Dans le cadre de l'expérience réalisée en 2003 (DYNAMOR), les résultats des analyses sur l'effet des cheptels et de l'environnement ont montré globalement que les triploïdes présentent les plus fortes valeurs pour les paramètres hémoctaires suivis (phagocytose, granulocytes, pourcentage de cellules positives pour les estérases et présence de lysosomes). Ce résultat avait également été rapporté en 2002 (DYNAMO) (Gagnaire *et al.*, sous presse b). En 2003 (DYNAMOR), le pourcentage de cellules positives pour les estérases a également permis de distinguer les diploïdes de captage naturel (valeurs intermédiaires) et les diploïdes d'écloserie (groupe « R »-« S », valeurs minimales). En 2002 (DYNAMO), l'étude comparative entre les diploïdes de captage naturel et d'écloserie avait rapporté une différence au niveau de la phagocytose uniquement (Gagnaire *et al.*, soumis).

Les triploïdes sont des animaux produits par croisement de mâles tétraploïdes et de femelles diploïdes. Ils sont partiellement stériles et la littérature rapporte de nombreuses différences avec les diploïdes. Les contenus lipidiques et protéiques, le poids total et coquillier sont plus importants, les taux de filtration et l'efficacité d'absorption sont supérieurs et ils présentent également une plus grande hétérozygotie (Hawkins *et al.*, 2000; Magoulas *et al.*, 2000; Garnier-Gere *et al.*, 2002). Les triploïdes de *C. gigas* semblent moins accumuler certains métaux lourds (Ag, Cd) que les diploïdes (Amiard *et al.*, 2005). La plus grande hétérozygotie des triploïdes peut être un facteur positif sur la détoxification des métaux. De plus, le processus d'excrétion des métaux devrait être plus efficace chez les triploïdes, car la transcription est plus rapide avec trois copies de chaque gène (Garnier-Gere *et al.*, 2002). Les triploïdes n'allouent pas d'énergie à la synthèse des gamètes et à la reproduction, et peuvent donc la consacrer à d'autres processus, tels que les activités hémoctaires et le système de défense. Une étude a montré que pendant la période de ponte chez *C. gigas*, la croissance coquillière, le poids total, le poids des parties molles, la quantité de glycogène et l'indice de condition ont diminué chez les huîtres diploïdes, alors qu'ils ont augmenté chez les triploïdes (Akashige & Fushimi, 1992).

Les travaux réalisés dans cette étude montrent que la mortalité des huîtres triploïdes est plus faible que celle des diploïdes. Ce n'est pas le cas de tous les travaux menés sur le sujet (Nell & Perkins, 2005). Lorsqu'elle existe, cette différence de mortalité entre huîtres triploïdes et diploïdes ne semble pas être due à une différence de sensibilité aux agents pathogènes. En effet, aucune différence de résistance à *P. marinus* (Meyers *et al.*, 1991; Barber & Mann, 1991) ou à *H. nelsoni* (MSX) (Matthiessen & Davis, 1992) n'a été trouvée entre diploïdes et triploïdes chez l'huître américaine, *C. virginica*. Des études n'ont également pas montré de différence de résistance à *Mikrocytos roughleyi* lors des mortalités hivernales chez les diploïdes et les triploïdes de

S. glomerata en Australie (Hand *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Les huîtres creuses, *C. gigas*, triploïdes sont également infectées par le virus OsHV-1 comme les huîtres diploïdes (Renault, communication personnelle).

III.3.4. Effet de la hauteur des tables

La comparaison entre les deux niveaux a permis de montrer des activités parfois plus importantes à 15 cm qu'à 70 cm, mais pour seulement deux paramètres (estérases et lysosomes). La mortalité des huîtres est plus importante à 15 cm. Le modèle de mortalité « plat-table » est étudié depuis 1996 au Laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis Charentais (Soletchnik *et al.*, 1999, 2005). A 15 cm au-dessus du sédiment, l'accès à la ressource trophique est *a priori* plus facile car le temps d'immersion est supérieur à celui à 70 cm. Cependant, plusieurs facteurs rendent ce milieu plus hostile. Les variations de facteurs physico-chimiques sont plus grandes à proximité du sédiment. Par ailleurs, la biomasse bactérienne liée à la turbidité peut être plus importante près du sédiment (Lodato, 1997). La turbidité peut devenir un facteur limitant du fait du colmatage des branchies dès 200 mg.L⁻¹ (Raillard, 1991). Par ailleurs, la turbidité entraîne un développement de la biomasse bactérienne, qui peut augmenter la stimulation des hémocytes. Cependant, le fait d'avoir des activités hématocytaires supérieures ne veut pas forcément dire que les mécanismes de défense immunitaire sont plus actifs.

III.3.5. Effet de la maturation

Les analyses concernant l'effet de la période d'étude ont permis de montrer l'importance de la période de maturation sexuelle dans l'évolution des paramètres hématocytaires. Les animaux « R » et « S » présentent une mortalité cellulaire plus importante. Tous les diploïdes présentent des pourcentages de cellules positives pour les estérases, diminués en période d'attente de ponte (B), après la mortalité. Pour ces deux paramètres, les valeurs des paramètres hématocytaires pour les triploïdes ne présentent pas de différence entre les périodes. Ces résultats tendent à confirmer une plus grande fragilité des huîtres fournissant un effort de gamétogenèse. Aucune différence entre les deux périodes n'est observée pour la phagocytose chez les diploïdes, alors que les valeurs sont significativement plus élevées en période B pour les triploïdes. Cependant, les valeurs sont supérieures à celles des diploïdes, même en période A. Une étude a rapporté que la phagocytose des hémocytes de *C. gigas* était plus importante pendant la phase de développement gonadique, avec une activité maximale pendant le stade mature, par rapport aux stades de développement précoces (Ishikawa *et al.*, 1997). Nos résultats semblent confirmer cette observation pour les triploïdes uniquement. Les différences entre les valeurs des paramètres hématocytaires (en particulier la phagocytose) entre les huîtres triploïdes et diploïdes sont maximales pendant la période de maturation des gamètes (B), ce qui confirme les résultats obtenus en 2002 (Gagnaire *et al.*, sous

presse b). La période de maturation sexuelle semble être une période critique pour le système immunitaire. Une étude rapporte la diminution importante du nombre de lymphocytes et de l'activité du complément chez le saumon pendant la maturation sexuelle (Alcorn *et al.*, 2002). Une étude a démontré qu'après la ponte, le nombre d'hémocytes circulants et la stabilité lysosomale chez *C. gigas* étaient deux fois plus faibles qu'avant la ponte (Cho & Jeong, 2005).

Dans l'expérience DYNAMO (2002), les triploïdes étaient les animaux qui présentaient la maturation la moins avancée et la mortalité la plus faible. Lors de l'expérience en 2003 (DYNAMOR), les triploïdes ont réalisé une gamétogénèse active. Cependant, elle était décalée dans le temps par rapport aux diploïdes (plus tardive) et aucune ponte n'a eu lieu durant la période d'étude. Ce phénomène est probablement dû à une réversion de certains triploïdes. Des études récentes menées par l'équipe de Génétique du LGP de la station IFREMER La Tremblade ont permis de montrer que ce phénomène de maturation des huîtres triploïdes est un phénomène reproductible et que les gamètes produits par les huîtres triploïdes possèdent un pouvoir fécondant équivalent à celui des gamètes produits par les huîtres diploïdes (Normand, 2005). Cependant, les larves obtenues à partir de ces gamètes issus d'huîtres triploïdes présentent d'importantes anomalies du développement et une faible survie (Normand, 2005). La gamétogénèse ne semble pas être le seul facteur expliquant la différence de mortalité observée entre les diploïdes et les triploïdes.

III.3.6. Différencier les huîtres « R » et « S » sur la base des paramètres hémycytaires

Les paramètres hémycytaires n'ont pas permis de différencier les deux types d'huîtres « R » et « S ». Des travaux menés en parallèle semblent indiquer une différence entre « R » et « S » en terme de stratégie de reproduction (préservation du soma chez les « R ») et de capacité d'anticipation des facteurs de stress conduisant à la mortalité (pas de réduction du métabolisme basal chez les « S ») dans des conditions stressantes (Burgeot *et al.*, 2005). Une étude sur la différence d'expression de gènes entre les animaux « R » et « S » a montré des différences au niveau des gènes impliqués dans la mobilisation de l'énergie et dans la réponse immunitaire : la SOD et l'isocitrate déshydrogénase existent chez les animaux « R », mais pas chez les « S » (Huvet *et al.*, 2004). Par ailleurs, les taux de mortalité obtenus après infection expérimentale avec des bactéries du genre *Vibrio* ne sont pas corrélés avec ceux observés pour ces mêmes familles sur estran. En d'autres termes, les animaux « R » ne présentent pas des mortalités plus faibles lorsqu'ils sont infectés expérimentalement par des bactéries. La sélection réalisée en 2001 en positionnant les animaux sur estran n'a probablement pas fait intervenir de bactéries du type de celles utilisées dans le cadre de ces infections expérimentales (Gay, 2004).

III.3.7. Rôle des pesticides

Les épisodes de mortalité estivale apparaissent dans le courant du mois de juin. La multiplicité des matières actives à effets biocides utilisées dans le bassin de Marennes-Oléron au printemps constitue un risque potentiel. De plus, l'épandage de nombreux produits est réalisé pendant la période de gamétogénèse, à la fin du mois de mai (Léonard, 2002). La présence de pesticides pouvait donc être une cause de l'apparition des mortalités.

Les teneurs rencontrées dans les eaux sont relativement faibles. En juin 2004, sur la même zone d'étude, les concentrations totales en pesticides ont atteint $1.2 \mu\text{g.L}^{-1}$, soit le double par rapport à 2003. Les niveaux maximum de pesticides dans les eaux à Riberoux ($0.502 \mu\text{g.L}^{-1}$) sont retrouvés lorsque la pluviométrie est maximale (26-30 mai) (**Figure 73**). Le transfert des produits est favorisé lorsque des pluies ont lieu quelques jours après l'application des substances actives. Une relation entre la concentration en pesticides dans les eaux superficielles et la période d'épandage a déjà été établie (Robillard *et al.*, 2003). A Mus de Loup, la concentration de pesticides est maximale ($0.464 \mu\text{g.L}^{-1}$) juste avant et au début des mortalités (9-13 juin) (**Figure 73**). La présence de pesticides en quantités importantes mi-juin pourrait faire partie des facteurs déclencheurs de l'apparition des mortalités. Parmi ces pesticides, l'isoproturon est apparu comme majoritaire au moment de la période de mortalité. Cette molécule n'a pas été testée dans cette étude. Il serait intéressant de conduire des expériences *in vitro* et *in vivo* afin de suivre l'évolution des paramètres hématocytaires en présence de ce pesticide.

Des corrélations entre paramètres hématocytaires et facteurs environnementaux ont été mises en évidence. Le modèle de régression multiple a montré que les estérases étaient négativement corrélées avec la température de l'eau. Il est possible de supposer qu'une augmentation de température aboutirait à la stimulation des activités physiologiques de la cellule, donc à une augmentation d'activités de type estérases. Cependant, une étude rapporte une corrélation négative entre l'AChE et la température de l'eau (Robillard *et al.*, 2003). La mortalité hématocytaire était positivement corrélée avec le pH et, dans une moindre mesure, les températures de l'eau et de l'air. Une augmentation de la mortalité hématocytaire avec des températures élevées a été rapportée dans le cadre d'expériences *in vitro* et *in vivo* (Gagnaire *et al.*, 2006). Des études réalisées au laboratoire ont permis de montrer les effets de la température et de la salinité sur les paramètres hématocytaires (Gagnaire *et al.*, 2006). Les résultats rapportés dans ce travail montrent que le pH semble également un facteur important pour la survie des hémocytes et que ses effets sur les paramètres hématocytaires de *C. gigas* pourraient également être intéressants à étudier. Le pourcentage de granulocytes était lié à la turbidité. En présence d'un milieu turbide, la probabilité de rencontrer des corps étrangers est importante. Ceci pourrait expliquer l'augmentation du pourcentage de granulocytes, qui représente

l'une des premières réponses d'un organisme à une stimulation par des corps étrangers (Wendelaar Bonga, 1997).

Aucun des paramètres hématocytaires n'a montré de corrélation avec la concentration en pesticides totaux, ni dans la matrice, ni dans le modèle. Une étude du même type chez *Anodonta cygnea* a montré que seule la GST était liée aux concentrations de pesticides dans les eaux, les valeurs de la catalase et de l'AChE étant liées aux variations des paramètres environnementaux (température, pH et oxygène dissous) (Robillard *et al.*, 2003). Les pesticides n'apparaissent donc pas être directement responsables des variations des paramètres hématocytaires.

III.3.8. Risque environnemental précédant la mortalité

Les travaux menés en parallèle (Burgeot *et al.*, 2005) ont permis d'identifier une source de perturbation environnementale issue du sédiment entre mi-mai et mi-juin. L'impact toxique du sédiment sur les larves d'huîtres et la production de substances réduites (NH_4^+ et H_2S) a augmenté. Ceci pourrait être dû à l'élévation de température de 10°C. Parmi les substances chimiques détectées dans le sédiment, un seul pesticide (la trifluraline) a illustré une contamination chronique avec une concentration de 2 à 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Une étude a également montré une contamination significative des sédiments du bassin de Marennes Oléron par les HAPs, le plomb et le cadmium (Miramand *et al.*, 2002). A cette première source de stress issue du sédiment s'est ajoutée un pic de concentration de pesticides dans les eaux superficielles à la mi-juin, illustrant une période de risque pendant une phase de gamétogenèse active. Les paramètres physico-chimiques ont également varié pendant la période de pré-mortalité. Entre mi-mai et mi-juin, la salinité a peu varié, mais la température de l'eau a augmenté de 10°C, dépassant les 20°C. Le pH est d'abord resté stable, puis a diminué fin mai et début juin et a présenté des variations au moment de la mortalité (entre 7.3 et 8.1).

IV Conclusion

L'origine plurifactorielle des épisodes de mortalités estivales est confirmée par les résultats obtenus issus du programme MOREST. A ce jour, les différents facteurs impliqués sont : la température ; la reproduction, avec un risque maximum pendant la période précédant la ponte ; la génétique, avec une forte variabilité des taux de mortalité entre familles sur le terrain et enfin, les facteurs de stress qui pourraient servir de facteur déclencheurs.

Lors d'expériences réalisées en 2002 (Gagnaire *et al.*, sous presse b) et en 2003, les paramètres hématocytaires ont permis de différencier les animaux présentant la mortalité la plus élevée (diploïdes d'écloserie) de ceux présentant la mortalité la plus faible (triploïdes). Nous pouvons poser l'hypothèse que la gamétogénèse rend les diploïdes plus sensibles à de nombreux facteurs, ce qui conduit à la mortalité. Le développement d'huîtres creuses triploïdes offre donc une option prometteuse de réduction des mortalités estivales. De plus, ils présentent des valeurs de paramètres hématocytaires supérieures en comparaison aux diploïdes.

En 2003, les activités hématocytaires n'ont pas permis de distinguer les animaux « R » des « S », mais les valeurs associées à ces familles sont les plus faibles. Ces résultats permettent de s'interroger sur le danger de l'introduction des huîtres produites en écloserie et élevées sur l'estran. La contribution des huîtres d'écloserie dans le cheptel français est en constante augmentation. Si ces animaux se révélaient être davantage sensibles à des maladies dans le milieu, les effets sur la production pourraient s'avérer catastrophiques.

Conclusion générale - Perspectives



L'utilisation exponentielle de substances polluantes par l'homme, leur présence dans l'environnement et leurs effets sur les écosystèmes et les ressources et, à terme, sur la santé humaine, constituent l'un des problèmes les plus préoccupants du XXI^{ème} siècle. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé. Les objectifs principaux de ce travail étaient (1) de mettre au point et de montrer l'intérêt d'utiliser des biomarqueurs de type immunologique (paramètres hémyocytaires) dans le cadre du suivi de l'environnement et de la santé des cheptels de coquillages d'intérêt économique lors d'expériences *in vitro*, *in vivo* et *in situ* ; (2) de développer des modèles reproductibles de contamination permettant d'induire une modulation des biomarqueurs sélectionnés afin de pouvoir (3) étudier la relation entre présence de polluants, immunomodulation et sensibilité aux maladies infectieuses chez les coquillages. Le modèle biologique choisi pour répondre à ces objectifs est l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

La présente étude a permis de mettre au point plusieurs biomarqueurs hémyocytaires (mortalité cellulaire, pourcentage de granulocytes, activités de type estérase, présence de lysosomes, phagocytose, production d'EOR) qui se sont avérés pertinents au cours des expériences réalisées *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Cette approche multi-marqueurs est originale, car les études similaires ne suivent généralement qu'un seul paramètre. Cependant, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un polluant donné. Il serait envisageable de mettre au point d'autres marqueurs d'activités hémyocytaires afin de disposer d'un nombre plus important de paramètres à suivre, dans le but ultime de pouvoir relier un polluant ou une catégorie de polluants à une réponse spécifique des biomarqueurs définis.

Des expériences menées avec un autre laboratoire (LEMAR, UBO) ont permis de comparer les protocoles utilisés pour mesurer certains des paramètres hémyocytaires. Cette approche est à poursuivre. Il est indispensable de réaliser des comparaisons inter-laboratoires dans l'objectif de valider les biomarqueurs hémyocytaires chez les bivalves. A l'heure actuelle, une démarche est en cours entre plusieurs laboratoires au niveau international dans un objectif commun de valider la méthodologie et de standardiser les protocoles et les méthodes de mesure en cytométrie de flux.

Ce travail a démontré l'intérêt d'utiliser la cytométrie en flux afin d'analyser les paramètres hémyocytaires de bivalves. Cet outil ouvre la voie à un ensemble de travaux sur l'étude des interactions entre environnement et animaux. Nous disposons de cette manière d'un outil pertinent permettant d'explorer en particulier le potentiel immunotoxique de polluants et de mélanges de polluants à différents niveaux d'organisation (cellules, organismes et populations).

Les expériences *in vitro* ont permis de démontrer l'effet de facteurs environnementaux et de plusieurs polluants (HAPs, PCBs, herbicides, insecticides et fongicides) sur les paramètres

hémocytaires sélectionnés. Parmi l'ensemble des molécules testées, au moins un xénobiotique par chaque famille de polluants testée a eu des effets sur un ou plusieurs paramètres hémocytaires. Ce travail a également permis de démontrer l'effet d'un mélange de huit pesticides (atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-alumimium, terbuthylazine, diuron, carbaryl) sur la phagocytose. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'aucune des molécules testées individuellement n'a montré d'effet. Du fait de la présence de ces huit composés dans les eaux du bassin de Marennes-Oléron, premier bassin de production ostréicole, ce mélange a été choisi pour les expériences *in vivo*. Cette approche *in vitro* avait pour objectif de déterminer de manière rapide le potentiel immunotoxique d'un polluant donné. Il est envisageable de tester rapidement de nombreuses autres molécules, individuellement ou en mélanges, afin d'évaluer leur impact potentiel sur les paramètres hémocytaires et de sélectionner des molécules d'intérêt à étudier en *in vivo*.

Les expériences réalisées *in vivo* ont permis de démontrer l'effet de facteurs environnementaux (température et salinité) et de différents polluants (diuron, mélange de pesticides et chlorure de mercure) sur les paramètres hémocytaires sélectionnés après un contact à des doses environnementales. Les réponses diffèrent en fonction des molécules testées, permettant d'envisager de déterminer une action spécifique d'un polluant donné sur les paramètres hémocytaires. Le chlorure de mercure et le mélange de pesticides ont également induit une sous-expression de gènes susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de défense.

Ces travaux menés *in vivo* ont également permis de mettre au point un modèle de contamination : un mélange de huit pesticides (atrazine, glyphosate, alachlore, métolachlore, fosétyl-alumimium, terbuthylazine, diuron, carbaryl) a diminué de manière répétable la capacité de phagocytose des hémocytes. Ce modèle a été choisi pour étudier la relation entre polluants et sensibilité aux maladies infectieuses. Lors d'une contamination aux pesticides suivie d'une injection d'un mélange de deux bactéries du genre *Vibrio*, la mortalité des animaux contaminés et injectés est plus importante que celle des animaux non contaminés et injectés. Cette étude a permis de montrer que les pesticides agissent sur la phagocytose au niveau cellulaire. Ils sont capables de réduire cette activité *in vivo* à des concentrations observées dans l'environnement et peuvent perturber la réponse immunitaire à une infection. Des animaux présentant une diminution de paramètres hémocytaires (phagocytose) semblent plus sensibles à des bactéries du genre *Vibrio*. Ce résultat permet de proposer le suivi de la phagocytose comme véritable indicateur du système immunitaire chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. De plus, plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la phagocytose ont vu leur expression augmentée chez les animaux contaminés et injectés en comparaison aux animaux non contaminés et injectés. Cette sur-expression de gènes induite par les pesticides lors d'une infection bactérienne expérimentale pourrait alors avoir un effet négatif sur l'organisme en étant impliquée dans la

pathogénèse et pourrait conduire à la mort des animaux. Les pesticides pourraient donc modifier les interactions hôte/bactérie et influencer le développement de la maladie. Si les polluants produisent des effets susceptibles d'augmenter la sensibilité des coquillages aux maladies infectieuses, ces effets doivent être surveillés avec attention.

Dans le cadre des expériences *in situ* (MOREST), l'évolution de paramètres hématocytaires a été suivie pour différents cheptels (triploïdes, diploïdes d'écloserie et diploïdes de captage naturel) pendant et autour de la période de mortalité estivale. Nous avons mis en évidence lors de travaux réalisés sur deux années consécutives (2002 et 2003) que les animaux présentant les plus faibles mortalités sur estran (triploïdes) possédaient les activités hématocytaires les plus élevées (phagocytose, activité estérase, présence de lysosomes). Les diploïdes d'écloserie, quant à eux, présentaient de fortes mortalités et les plus faibles activités hématocytaires. Ces résultats suggèrent une relation entre origine génétique des animaux et paramètres hématocytaires. Dans ces conditions, une connaissance approfondie des huîtres triploïdes semble nécessaire afin de montrer s'il existe une base génétique pour les activités hématocytaires et s'il est envisageable de sélectionner des animaux sur la base d'activités hématocytaires plus élevées.

Ces expériences ont également permis de suivre la présence de pesticides dans les eaux du bassin de Marennes-Oléron pendant la période de mortalité. Les résultats ont montré que plusieurs pesticides sont retrouvés au niveau maximal peu de temps avant la mortalité. Cependant, aucune liaison statistique n'a été mise en évidence entre concentration en pesticides et paramètres hématocytaires.

Ce travail a permis de mettre au point des systèmes permettant d'explorer l'affaiblissement de l'organisme dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. Il est envisageable de pouvoir se servir de ces modèles et de les transposer à d'autres modèles hôte/agent infectieux ou à d'autres polluants. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser ces modèles pour étudier les interactions entre huître plate, *O. edulis*, et son parasite, *B. ostreae*. La bonamiose est en effet une maladie exclusive de l'huître plate faisant partie des maladies à déclaration obligatoire au niveau européen. Les interactions hôte/parasite sont peu connues au niveau cellulaire et n'ont pas été explorées au niveau moléculaire. D'autres xénobiotiques tels que les substances médicamenteuses pourraient être testés. En effet, des substances de ce type sont rejetées en quantités importantes dans l'environnement et, à l'heure actuelle, très peu d'études ont tenté de définir leur impact sur les organismes.

Utiliser l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire comme biomarqueur dans le cadre de l'étude des effets de polluants sur les huîtres et sur leur réponse à une infection apparaît comme prometteur. Cependant, il apparaît important de compléter cette approche en suivant également la production des protéines correspondant aux gènes recherchés.

L'étude de la modulation de la réponse de l'hôte à des agents infectieux par des facteurs environnementaux était au centre de ce sujet de thèse. Il serait intéressant d'étudier si ces mêmes facteurs peuvent également moduler la virulence des agents infectieux. Dans ce contexte, l'étude conjointe de ces deux aspects, la réponse de l'hôte et de l'agent pathogène face aux facteurs de l'environnement, pourrait permettre d'identifier les conditions nécessaires à l'établissement d'une maladie.

Une suite possible à donner à ce travail serait également d'étudier les effets des polluants sur l'ontogénèse du système de défense chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Déterminer si des perturbations ayant lieu dans les premiers stades de la vie larvaire peuvent influencer la sensibilité des animaux à des maladies à l'âge adulte est un sujet d'intérêt.

Par ailleurs, l'intégration des mécanismes de défense dans l'estimation des dépenses énergétiques d'adaptation à un stress chimique au sein d'un modèle DEBTox constitue une perspective d'avenir pour prédire les effets biologiques des contaminants dans l'environnement marin. En effet, l'utilisation du potentiel énergétique pendant l'effort de reproduction est identifiée comme un paramètre clé du développement de l'huître. Ce sujet en émergence fait l'objet d'une réflexion sur le développement de modèle DEB (Dynamic Energy Budget) en lien avec l'accumulation de polluants persistants dans les tissus.

A plus long terme, une perspective de ce travail de thèse est de pouvoir utiliser les biomarqueurs développés et de les associer à d'autres marqueurs afin de définir la qualité d'un environnement et, s'il est pollué, quel type de pollution est incriminé. En combinant cette approche avec une meilleure connaissance des relations entre les différents types de polluants et le développement de différentes maladies, nous disposerions d'outils permettant de prédire l'évolution d'un écosystème (apparition d'une maladie, son développement et son extension).

L'ensemble de ce travail a apporté des informations concernant les mécanismes mis en place par les huîtres en réponse à des contaminations anthropiques, ainsi que le développement de suivis rapides utilisables chez l'huître et chez d'autres espèces marines. Le développement de la PCR en temps réel, de la protéomique et des puces à ADN semblent être, à l'heure actuelle, des outils qui permettront de répondre aux incertitudes existant dans le domaine de l'écotoxicologie et de la réponse de l'hôte aux agents infectieux, les effets de polluants sur les mécanismes de défense chez des espèces sentinelles et la validité de certains biomarqueurs.

Ce travail a donc permis d'établir un lien entre deux disciplines : l'écotoxicologie et la pathologie. Il ressort de notre étude que ce lien est fondamental et qu'une meilleure connaissance des effets des polluants sur la sensibilité aux maladies infectieuses pourrait préserver les écosystèmes, exploités ou non, de l'apparition de nouvelles épizooties.

Références bibliographiques



- ADEME (2004). Polluants Organiques Persistants.
<http://www.ademe.fr/entreprises/polluants/polluants/polluant.asp?ID=49>.
- Ait-Aissa, S., Porcher, J., Arrigo, A. & Lambre, C. (2000). Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145: 147-157.
- Akashige, S. & Fushimi, T. (1992). Growth, survival, and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 1063-1071.
- Akcha, F., Burgeot, T., Venier, P. & Narbonne, J.F. (1999). Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62: 455-462.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T. & Narbonne, J. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49: 269-287.
- Alcorn, S.W., Murra, A.L. & Pascho, R.J. (2002). Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish & Shellfish Immunology* 12: 303-334.
- Allam, B., Paillard, C. & Auffret, M. (2000). Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 63-69.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E. (2002). Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 141-158.
- Allam, B. & Ford, S.E. (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 374-383.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M. & Ford, S.E. (2006). Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 384-397.
- Allen, L.A. & Aderem, A. (1996). Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology* 8: 36-40.
- Almarza, E., Segovia, J.C., Guenechea, G., Gomez, S.G., Ramirez, A. & Bueren, J.A. (2004). Regulatory elements of the vav gene drive transgene expression in hematopoietic stem cells from adult mice. *Experimental Hematology* 32: 360-364.
- Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Johnson, J.S. & Hinsch, G.W. (1989). Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 233-241.
- Alvarez, M.R. & Friedl, F.E. (1992). Effects of a fungicide on *in vitro* hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 107: 135-140.
- Alves, S.R.C., Severino, P.C., Ibbotson, D.P., da Silva, A.Z., Lopes, F.R.A.S., Saenz, L.A. & Bairy, A.C.D. (2002). Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research* 54: 241-245.
- Ambert, X. (2005). Etude de l'homéostasie calcique des hémocytes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par cytométrie en flux : mise en évidence et analyse du calcium intracytoplasmique en présence d'un mélange de pesticides. Master 2 Toxicologie, Faculté de Médecine René Descartes Paris V, Paris, 23 p.
- Amiard, J.C., Perrein-Ettajani, H., Gerard, A., Baud, J.P. & Amiard-Triquet, C. (2005). Influence of ploidy and metal-metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, and Cu in oysters *Crassostrea gigas* thunberg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 68-74.
- Anderson, R.S. & Good, R.A. (1976). Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 57-64.
- Anderson, R.S. (1981). Effects of carcinogenic and noncarcinogenic environmental pollutants on immunological functions in a marine invertebrate. In: Dawe, C.J. (ed) Phyletic approaches to cancer. Japanese Sciences Society Press, Tokyo, p 319-331.
- Anderson, R.S., Giam, C.S., Ray, L.E. & Tripp, M.R. (1981). Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: impaired bacterial clearance. *Aquatic Toxicology* 1: 187-195.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M. & Brubacher, L.L. (1992a). Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 303-307.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M. & Jacobs, D. (1992b). Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)): Effects on hemocyte chemiluminescence. *Journal of Shellfish Research* 11: 31-35.
- Anderson, R.S., Paynter, K.T. & Bureson, E.M. (1992c). Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biological Bulletin* 183: 476-481.
- Anderson, R.S. (1994). Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Developmental and Comparative Immunology* 18: 89-96.
- Anderson, R.S., Mora, L.M. & Thomson, S.A. (1994). Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 108: 215-220.
- Anderson, R.S., Bureson, E.M. & Paynter, K.T. (1995). Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 82-89.

- Anderson, R.S., Unger, M.A. & Bureson, E.M. (1996). Enhancement of *Perkinsus marinus* disease progression in TBT-exposed oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* 42: 177-180.
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Calvo, L.M., Bureson, E.M. & Unger, M.A. (1997). Effect of *in vitro* exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environmental Research* 74: 84-90.
- Anderson, R.S. & Beaven, A.E. (2001). Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquatic Living Resources* 14: 343-349.
- Andrade, R., Alonso, R., Pena, R., Arlucea, J. & Arechaga, J. (2003). Localization of importin alpha (Rch1) at the plasma membrane and subcellular redistribution during lymphocyte activation. *Chromosoma* 112: 87-95.
- Andrews, P.W. (1984). Epizootiology of haplosporidian diseases affecting oysters. *Helgoländer meeresuntersuchungen* 37: 149-166.
- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. & Sato, M. (2003). Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 184: 1-9.
- Arndt, V., Vine, M.F. & Weigle, K. (1999). Environmental chemical exposures and risk of herpes zoster. *Environmental Health Perspectives* 107: 835-841.
- Arru, G., Congiu, A.M., Burdino, E. & Ugazio, G. (1997). Toxicity of atrazine and its metabolite deethylatrazine in *Thamnocephalus platyurus* and *Dugesia gonocephala*. *Giomale Italiano Di Medicina Del Lavoro ed Ergonomia* 19: 17-19.
- Ashitani, J., Mukae, H., Nakazato, M., Ihi, T., Mashimoto, H., Kadota, J., Kohno, S. & Matsukura, S. (1998). Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis. *The European Respiratory Journal* 11: 104-111.
- Ashton-Alcox, K.A. & Ford, S.E. (1998). Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue & Cell* 30: 195-204.
- Asokan, R., Arumugam, M. & Mullainadhan, P. (1997). Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental and Comparative Immunology* 21: 1-12.
- Atkinson, A.P., Cedzynski, M., Szemraj, J., St Swierzko, A., Bak-Romaniszyn, L., Banasik, M., Zeman, K., Matsushita, M., Turner, M.L. & Kilpatrick, D.C. (2004). L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clinical and Experimental Immunology* 138: 517-520.
- Aton, E., Renault, T., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Cognard, C. & Imbert, N. (2006). A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca²⁺ in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 493-503.
- Auffret, M. (1985). Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de 3ème cycle, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 153 p.
- Auffret, M. (1989). Comparative study of the hemocytes of two oyster species: The European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research* 8: 367-373.
- Auffret, M. & Oubella, R. (1994). Cytometric parameters of bivalve molluscs : effect of environmental factors. In: Stolen, J.S. & Fletcher, T.C. (eds) Modulators of fish immune responses, Vol 1, Models for environmental toxicology, biomarkers, immunostimulators. SOS Publication, Fair Haven, NJ, USA, p 23-32.
- Auffret, M. & Oubella, R. (1997). Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 118: 705-712.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C. & Moraga, D. (2002). Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 54: 585-589.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.-Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. & Moal, J. (2005). Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 140: 635-646.
- Bachère, E., Chagot, D. & Grizel, H. (1988). Cell separation by centrifugal elutriation. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 281-285.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E. & Grizel, H. (1990). Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental & Comparative Immunology* 14: 261-268.
- Bachère, E., Hervio, D. & Mialhe, E. (1991). Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 11: 173-180.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. & Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunology Review* 198: 149-168.
- Baier-Anderson, C. & Anderson, R.S. (1996). The effect of pentachlorophenol on NADPH production in oyster hemocytes: immunomodulatory consequences. *Journal of Shellfish Research* 15: 498-499.
- Baier-Anderson, C. & Anderson, R.S. (2000). The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environmental Research* 83: 72-78.
- Banerjee, B.D., Koner, B.C. & Ray, A. (1996). Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian Journal of Experimental Biology* 34: 723-733.
- Banerjee, B.D., Seth, V. & Ahmed, R.S. (2001). Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews in Environmental Health* 16: 1-40.

- Barber, B.J. & Mann, R. (1991). Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 10: 445-450.
- Barré, D. (1981). Implantation de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Médecine Vétérinaire, Ecole Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, 150 p.
- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. & Thomas, M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology* 130: 1910-1917.
- Bayne, B.L., Moore, M.N., Widdows, J., Livingstone, D.R. & Salkeld, P. (1979). Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 286: 563-581.
- Beamer, L.J., Carroll, S.F. & Eisenberg, D. (1998). The BPI/LBP family of proteins: a structural analysis of conserved regions. *Protein Science* 7: 906-914.
- Beattie, J.H., Chew, K.K. & Hershberger, W.K. (1980). Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 70: 184-189.
- Beattie, J.H. (1988). Summer mortality of Pacific oysters. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 265-268.
- Bebiano, M.J. & Serafim, M.A. (1998). Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *The Science of The Total Environment* 214: 123-131.
- Beckmann, N., Morse, M.P. & Moore, C.M. (1992). Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 124-132.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1316-1322.
- Bellas, J., Beiras, R., Marino-Balsa, J.C. & Fernandez, N. (2005). Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14: 337-353.
- Bhatia, M. & Mochhala, S. (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *Journal of Pathology* 202: 145-156.
- Bocquené, G., Roig, A. & Fournier, D. (1997). Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters* 407: 261-266.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2: 907-916.
- Bouchard, N., Pelletier, E. & Fournier, M. (1999). Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 519-522.
- Bouilly, K., Leitao, A., McCombie, H. & Lapegue, S. (2003). Impact of atrazine on aneuploidy in pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 219-223.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomas-Guyon, H., Renault, T., Miramand, P. & Lapègue, S. (soumis b). Cadmium effects on aneuploidy and defence response in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
- Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T. & Lapègue, S. (soumis a). Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M., Riso, R. & Moraga, D. (2002). Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1009-1014.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M. & Moraga, D. (2003). Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8: 76-85.
- Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D. (2004). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329: 147-157.
- Breittmayer, J.P., Woaye, C. & Zsurger, N. (1984). Effect of cadmium on mercury uptake by mussels (*Mytilus edulis*). *Journal de la Recherche Océanographique* 9: 66-68.
- Brousseau, P., Dunier, M., Deschaux, P., De Guise, S., Krzystyniak, K. & Fournier, M. (1997). Marqueurs immunologiques. In: Masson (ed) Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux, Paris, p 287-314.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. & Fournier, M. (2000). Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142: 145-156.
- Buckley, B.A., Owen, M.E. & Hofmann, G.E. (2001). Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *Journal of Experimental Biology* 204: 3571-3579.
- Burgeot, T., His, E. & Galgani, F. (1995). The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research* 342: 125-140.

- Burgeot, T., Quirion, S., Ménard, D., Rousseau, S., Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Haure, J., Gagne, F., Moraga, D., Boutet, I., Van Wormhoudt, A., Lelong, C., Sauriau, P.G., Malet, N., Le Moullac, G., Quiniou, F., Arzul, I., Knoery, J., Communal, P.Y., Jadas Hecart, A., Osada, M., Gêret, F. & Soletchnik, P. (2005). Effet du stress : toxicité potentielle du milieu et effort d'adaptation. IFREMER, Nantes, 50 p.
- Buroker, N.E. (1983). Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Malacologia* 23: 271-279.
- Burreson, E.M. & Ragone Calvo, L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15: 17-34.
- Butler, R.A. & Roesijadi, G. (2000). Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 50: 470.
- Butor, C., Griffiths, G., Aronson, N.N., Jr. & Varki, A. (1995). Co-localization of hydrolytic enzymes with widely disparate pH optima: implications for the regulation of lysosomal pH. *Journal of Cell Science* 108: 2213-2219.
- Cadoret, J.-P., Debon, R., Cornudella, L., Lardans, V., Morvan, A., Roch, P. & Boulo, V. (1999). Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 460: 81-85.
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I. & Marigomez, I. (1996). *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35: 253-260.
- Camus, L., Grosvik, B.E., Borseth, J.F., Jones, M.B. & Depledge, M.H. (2000). Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): effect of low temperatures. *Marine Environmental Research* 50: 325-329.
- Camus, L., Jones, M.B., Borseth, J.F., Grosvik, B.E., Regoli, F. & Depledge, M.H. (2002). Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Marine Environmental Research* 54: 425-430.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C. & Gallo, G. (2002a). Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Developmental & Comparative Immunology* 26: 325-334.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. & Pruzzo, C. (2002b). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57: 469-476.
- Canesi, L., Scarpato, A., Betti, M., Ciacci, C., Pruzzo, C. & Gallo, G. (2002c). Bacterial killing by *Mytilus* hemocyte monolayers as a model for investigating the signaling pathways involved in mussel immune defence. *Marine Environmental Research* 54: 547-551.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C. & Gallo, G. (2003). Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology* 63: 293-306.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. & Villalba, A. (1997a). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 96-105.
- Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. & Villalba, A. (1997b). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 127-135.
- Carballal, M.J., Villalba, A. & Lopez, C. (1998). Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 304-312.
- Carissan-Lloyd, F.M.M., Pipe, R.K. & Beaumont, A.R. (2004). Immunocompetence and heterozygosity in the mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84: 377-382.
- Carnevali, O. & Maradonna, F. (2003). Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. *General and Comparative Endocrinology* 131: 203-208.
- Casale, G.P., Vennerstrom, J.L., Bavari, S. & Wang, T.L. (1993). Inhibition of interleukin 2 driven proliferation of mouse CTLL2 cells, by selected carbamate and organophosphate insecticides and congeners of carbaryl. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 15: 199-215.
- Casas, S. (2005). Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de Doctorat, Université du Sud Toulon Var, Toulon, 363 p.
- Chagot, D. (1989). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole Pratique des Hautes Etudes de Montpellier, Montpellier, 71 p.
- Chen, J.H. & Bayne, B.L. (1995). Bivalve mollusc hemocyte behaviours: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). *Biological Bulletin* 188: 255-266.
- Cheney, D.P., MacDonald, B.F. & Elston, R.A. (2000). Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* 19: 353-359.

- Cheng, T.C. & Rodrick, G.E. (1975). Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 52: 443-447.
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., Foley, D.A. & Koehler, S.A. (1975). Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 25: 261-265.
- Cheng, T.C. & Rudo, B.M. (1976). Chemotactic attraction of *Crassostrea virginica* hemolymph cells to *Staphylococcus lactus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 137-139.
- Cheng, T.C., Lie, K.J., Heyneman, D. & Richards, C.S. (1978). Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 31: 57-62.
- Cheng, T.C. (1981). Bivalves. In: Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (eds) *Invertebrate Blood Cells I*. Academic Press, London, p 233-299.
- Cheng, T.C. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology* 23: 129-144.
- Cheng, T.C. & Sullivan, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research* 14: 305-315.
- Cheng, T.C., Mohandas, A. & Sullivan, J.T. (1987). *In vivo* effects of heavy metals on cellular immunity in molluscs. In: Dorignan, J.V. & Harrison, F.L. (eds) *Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stressors*, Vol 6, p 59-62.
- Cheng, T.C. (1988a). *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : phagocytic and endocytotic indices. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 215-220.
- Cheng, T.C. (1988b). *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 207-214.
- Cheng, T.C. & Downs, J.C. (1988). Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 163-167.
- Cheng, T.C. (1990). Effects of *in vivo* exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. In: Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (eds). Academic Press, San Diego, CA, Academic Press, San Diego, CA, p 513-524.
- Cheng, T.C. & Combes, C. (1990). Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. In: Castri, F.d., Hansen, A.J. & Debussche, M. (eds) *Biological invasions in Europe and the Mediterranean Basin*, Vol 19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 307-332.
- Cheng, T.C. (1996). Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. & Eble, F. (eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, p 299-333.
- Cheng, W., Hsiao, I.S. & Chen, J.C. (2004a). Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 193-202.
- Cheng, W., Hsiao, I.S. & Chen, J.C. (2004b). Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 157-164.
- Cheng, W., Liu, C.-H., Tsai, C.-H. & Chen, J.-C. (2005). Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and [beta]-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 297-310.
- Chevre, N., Gagne, F., Gagnon, P. & Blaise, C. (2003). Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* 51: 13-23.
- Chilmonczyk, S., Voccia, I., Tarazona, J.V. & Monge, D. (1997). Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens: modulatory effects induced by experimental procedures. In: Zelikoff, J.T. (ed) *Ecotoxicology : Responses, Biomarkers and Risk Assessment*, an OECD workshop. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, p 171-184.
- Chimini, G. & Chavrier, P. (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nature Cell Biology* 2: 191-196.
- Cho, S.-M. & Jeong, W.-G. (2005). Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 244: 383-387.
- Chou, H.-Y., Li, H.-J. & Lo, C.-F. (1994). Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathology* 29: 171-175.
- Chou, H.-Y., Chang, S.-J., Lee, H.-Y. & Chiou, Y.-C. (1998). Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of Hard Clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathology* 33: 213-219.
- Christensen, M.M., Ellermann-Eriksen, S., Rungby, J. & Mogensen, S.C. (1996). Influence of mercuric chloride on resistance to generalized infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *Toxicology* 114: 57-66.
- Christin, M.S., Gendron, A.D., Brousseau, P., Menard, L., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Ruby, S. & Fournier, M. (2003). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1127-33.

- Christin, M.S., Menard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L. & Fournier, M. (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology* 67: 33-43.
- Chu, F.L., Volety, A.K., Hale, R.C. & Huang, Y. (2002). Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 53: 17-35.
- Chu, F.-L.E. (1988). Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publication* 18:
- Chu, F.-L.E. & La Peyre, J.F. (1993). *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: Temperature effects. *Diseases of Aquatic Organisms* 16: 223-234.
- Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F. & Bureson, C.S. (1993). *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 226-232.
- Chu, F.-L.E. & Hale, R.C. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 38: 243-256.
- Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Da Ros, L. & Ballarin, L. (1998). Immunotoxic effects of organotin compounds in *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere* 37: 3035-3045.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G. & Ballarin, L. (2000). Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 677-693.
- CNC (2005). Production Française 2003. <http://www.cnc-france.com/actualite>.
- Cochenne-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T. & Langlade, A. (2003). Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 23-30.
- Coles, J.A., Farley, S.R. & Pipe, R.K. (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 30: 367-379.
- Coles, J.A. & Pipe, R.K. (1994). Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 337-352.
- Coles, J.A., Farley, S.R. & Pipe, R.K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 59-65.
- Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C.L. & Maroni, M. (2005). Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207(2) : 320-328.
- Comps, M. (1970). La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*. Caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34: 24-43.
- Comps, M., Bonami, J.R., Vago, C. & Razet, D. (1976). La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* 256: 13-15.
- Contrino, J., Marucha, P., Ribaud, R., Ferenç, R., Bigazzi, P.E. & Kreutzer, D.L. (1988). Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function *in vitro*. *American Journal of Pathology* 132: 110-118.
- Coombs, T.L. & George, S.G. (1977). Mechanisms of immobilization and detoxication of metals in marine organisms. 12th European Symposium on Marine Biology, Stirling, Scotland, p 179-187.
- Cooper, E.L. & Roch, P. (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology Cardiff Wales 2002. *Pedobiologia* 47: 676-688.
- Cooreman, K., Roose, P. & Vyncke, W. (1993). Screening of organophosphate and carbamate pesticides by cholinesterase inhibition. In: Committee, I.M.E.Q. (ed) ICES Statutory Meeting 1993. ICES, Copenhagen, p 7.
- Corporeau, C. & Auffret, M. (2003). *In situ* hybridisation for flow cytometry: a molecular method for monitoring stress-gene expression in hemolymph cells of oysters. *Aquatic Toxicology* 64: 427-435.
- Cossa, D. (1985). Le cadmium et le mercure en milieu côtier : biogéochimie et utilisation du genre *Mytilus* comme indicateur quantitatif. Thèse de Doctorat d'état, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 387 p.
- Cossa, D., Thibaud, Y., Roméo, M. & Gnassia-Barelli, M. (1990). Le mercure en milieu marin - Biogéochimie et écotoxicologie. Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER, p 130.
- Cossarini-Dunier, M., Demael, A., Riviere, J.L. & Lepot, D. (1988). Effects of oral doses of the herbicide atrazine on carp (*Cyprinus carpio*). *Ambio* 17: 401-405.
- Cosson, R.P. (2000). Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cellular and Molecular Biology* 46: 295-309.
- Cote, J.F. & Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *Journal of Cell Science* 115: 4901-4913.
- Coteur, G., Danis, B., Fowler, S.W., Teyssie, J.L., Dubois, P. & Warnau, M. (2001). Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Marine Pollution Bulletin* 42: 667-672.
- Cram, L.S. (2002). Flow cytometry, an overview. *Methods in Cell Science* 24: 1-9.
- Cruz-Rodriguez, L.A., Baucum, A.J., Soudant, P., Chu, F.L. & Hale, R.C. (2000). Effects of PCBs sorbed to algal paste and sediments on the stress protein response (HSP70 family) in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 50: 341-345.

- Cruz-Rodriguez, L.A. & Chu, F.L. (2002). Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 60: 157-168.
- Custer, E.M., Finch, C.A., Sobel, R.E. & Zettner, A. (1995). Population norms for serum ferritin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 126: 88-94.
- Deaton, L.E., Jordan, P.J. & Dankert, J.R. (1999). Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. *Journal of Shellfish Research* 18: 223-226.
- Dégremont, L., Bedier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F. & Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249: 213-229.
- Dégremont, L. (2003). Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat, Université de Caen/Basse-Normandie, Caen, 334 p.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M. & Roy, R. (2000). Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environmental Health Perspectives* 108: 205-211.
- Dive, C., Watson, J.V. & Workman, P. (1990). Multiparametric analysis of cell membrane permeability by two colour flow cytometry with complementary fluorescent probes. *Cytometry* 11: 244-252.
- Dong, Z., Katar, M., Linebaugh, B.E., Sloane, B.F. & Berk, R.S. (2001). Expression of cathepsins B, D and L in mouse corneas infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry* 268: 6408-6416.
- Duffy, J.E., Carlson, E., Li, Y., Prophete, C. & Zelikoff, J.T. (2002). Impact of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome. *Marine Environmental Research* 54: 559-563.
- Dunier, M. (1991). Effects of pesticides and heavy metals (Cu, Mg, Zn, Mn) on the immune system of the carp *Cyprinus carpio*. *Ichthyophysiological Acta*: 9-22.
- Dunier, M. & Siwicki, A.K. (1993). Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology* 3: 423-438.
- Eble, A.F. & Scro, R. (1996). General Anatomy. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. & Eble, F. (eds) The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, p 19-30.
- Elston, R.A., Elliot, E.L. & Colwell, R.R. (1982). Conchiolin infection and surface coating *Vibrio* : shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Fish Diseases* 5: 265-284.
- EPA (2005). Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C. & Le Penec, M. (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320: 592-598.
- Fagotti, A., Di Rosa, I., Simoncelli, F., Pipe, R.K., Panara, F. & Pascolini, R. (1996). The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 20: 383-391.
- Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H. & La Peyre, J.F. (1998). Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 121: 161-168.
- FAO (2005). Aquaculture Production : Quantities 1950-2002. Fishstat Plus. <http://www.fao.org/fi/statist/fisofit/FISHPLUS.asp#Download>.
- Faucet, J., Maurice, M., Gagnaire, B., Renault, T. & Burgeot, T. (2004). Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science* 25: 177-184.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. & Grimme, L.H. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* 56: 13-32.
- Feng, S.Y. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 153-168.
- Fisher, S.W. (1986). Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin, M. (ed) Immunity in Invertebrates, Vol 3. Springer-Vrelag, Berlin Heidelberg, p 25-35.
- Fisher, S.W. (1988). Environmental influence on host response: environmental influence on bivalve hemocyte function. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 225-237.
- Fisher, S.W. & Ford, S.E. (1988). Flow cytometry: a tool for cell research in bivalve pathology. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 286-291.
- Fisher, W.S. & Newell, R.I.E. (1986). Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 170: 122-134.
- Fisher, W.S., Auffret, M. & Balouet, G. (1987). Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67: 179-190.
- Fisher, W.S., Wishkovsky, A. & Chu, F.-L.E. (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 354-360.

- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T. & Long, E.R. (2000). A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology* 51: 115-138.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T. & Volety, A.K. (2003). Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64: 375-91.
- Flaherty, D.K., Winzenburger, P.A., Gross, C.J., McGarity, K.L., Panyik, M. & Feng, P. (1992). The effect of Lasso herbicide on human immune function as measured by *in vitro* assays. *Immunopharmacology & Immunotoxicology* 14: 955-979.
- Fletcher, T.C. (1986). Modulation of nonspecific host defenses in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12: 59-67.
- Flisiak, R., Jaroszewicz, J., Lapinski, T.W., Flisiak, I., Rogalska, M. & Prokopowicz, D. (2005). Plasma transforming growth factor beta(1), metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in acute viral hepatitis type B. *Regulatory Peptides* 131 (1-3): 54-58.
- Ford, S.E. (1986). Comparison of hemolymph proteins from resistant and susceptible oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 283-294.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A. & Littlewood, D.T. (1993). Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 49-57.
- Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A. & Kanaley, S.A. (1994). Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 114-122.
- Forget, J., Beliaeff, B. & Bocquene, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology* 62: 195-204.
- Fournier, M., Chevalier, G., Nadeau, D., Trotter, B. & Krzystyniak, K. (1988). Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A* 25: 103-118.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. & Brousseau, P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40: 412-420.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y. & Brousseau, P. (2001). Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161: 201-211.
- Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y. & Cyr, D. (2002). Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology* 59: 83-92.
- Friedman, C.S., Cherr, G.N., Clegg, J.S., Hamdoun, A.H., Jacobsen, J.L., Jackson, S.A. & Uhlinger, K.R. (1999). Investigation of the stress response, summer mortality and disease resistance of oysters, *Crassostrea* spp, Vol. National Shellfisheries Association, Abstracts, 1999 Annual Meeting, April 18-22, p 297.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargrove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M. & Reece, K.S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 33-41.
- Fujikawa, K., Miletic, A.V., Alt, F.W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S., Moores, S.L., Brugge, J., Rosen, F.S. & Swat, W. (2003). Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *Journal of Experimental Medicine* 198: 1595-1608.
- Fujita, T., Matsushita, M. & Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews* 198: 185-202.
- Fujiwara, N. & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets in Inflammatory Allergy* 4: 281-286.
- Gaffney, P.M. & Bushek, D. (1996). Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15: 135-140.
- Gagnaire, B. (2001). Etude de l'impact de micropolluants sur les capacités immunitaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, 55 p.
- Gagnaire, B. (2002). Environnement et immunomodulation : étude d'activités hémocytaires chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Diplôme d'Etudes Spécialisées, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, 81 p.
- Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S. & Thomas-Guyon, H. (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* 9: 193-199.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. & Renault, T. (2004). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 501-512.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H. & Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20: 536-547.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. & Renault, T. (sous presse a). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*.

- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O. & Renault, T. (sous presse b). Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Faury, N., Kerdudou, N., Le Moine, O. & Renault, T. (soumis). Analysis of hemocyte parameters and study of their temporal trend in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field - Study of hatchery diploids and diploids from natural bed. *Fish & Shellfish Immunology*.
- Galloway, T.S. & Depledge, M.H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A. & Depledge, M.H. (2002). Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 61: 169-180.
- Galtsoff, P.C. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* 64:1-480.
- Garnier-Gere, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Héral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A. & Gerard, A. (2002). Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Molecular Ecology* 11: 1499-1514.
- Gay, M. (2004). Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 174 p.
- Gay, M., Berthe, F.C. & Le Roux, F. (2004a). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 49-56.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.M. & Le Roux, F. (2004b). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 65-74.
- Ge, N.N., Brodie, S.A., Tinling, S.P. & Brodie, H.A. (2004). The effects of superoxide dismutase in gerbils with bacterial meningitis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 131: 563-572.
- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R. & Dunkelberg, H. (1997). *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Archives of Toxicology* 71: 193-197.
- George, S.G. & Pirie, B.J.S. (1980). Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 575-590.
- George, S.G., Coombs, T.L. & Pirie, B.J.S. (1982). Characterization of metal-containing granules from the kidney of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 716: 61-71.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launay, S., Heurtebise, S., Ledu, C. & Phélipot, P. (1995). Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations "reproduction" et "génétique". In: l'IFREMER, D.d.R.V.d. (ed) La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. Rapport de groupe de travail., p 99-112.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J. & Cosson, R.P. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 15: 61-66.
- Géret, F. (2003). Quels effets les pesticides ont-ils sur "l'état de santé" des huîtres ? IFREMER, Nantes, 77 p.
- Géret, F., Haure, J., Gagnaire, B., Renault, T., Quirion, S., Papin, M., Ménard, D. & Burgeot, T. (en préparation). Physiological and metabolic responses to pesticides in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*.
- Giacomazzi, S. & Cochet, N. (2004). Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56: 1021-1032.
- Giamberini, L., Czembor, N. & Pihan, J.C. (1995). Inhibitory effects of an organic molluscicide on byssal thread development in zebra mussels. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 205-206.
- Gibson, U.E., Heid, C.A. & Williams, P.M. (1996). A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001.
- Glude, J.B. (1974). A summary report of Pacific Coast oyster mortality investigations 1965-1972. Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Tokyo, p 28.
- Glupov, V.V., Khvoshevskaya, M.F., Lozinskaya, Y.L., Dubovski, I.M., Martemyanov, V.V. & Sokolova, J.Y. (2001). Application of the nitroblue tetrazolium-reduction method for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes. *Cytobios* 106 Suppl 2: 165-78.
- Goedken, M. & De Guise, S. (2004). Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 539-552.
- Gomez-Mendikute, A., Etxebarria, A., Olabarrieta, I. & Cajaraville, M.P. (2002). Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Marine Environmental Research* 54: 431-436.
- Gouletquer, P. & Héral, M. (1991). Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. In: J., S. & R., O. (eds) The ecology of *Crassostrea gigas* in Australia. Maryland Sea Grant College, MD, New Zealand, France and Washington State, p 13-19.
- Gouletquer, P. & Héral, M. (1997). Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. In: U.S. Dep. Commer., Vol NFMS 129. NOAA Technical Report, p 137-164.

- Gouilletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Taillade, S. (1998). Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). ICES Mariculture Committee CM, Copenhagen, p 1-21.
- Grassé, P. (1960). Tome V : Bryozoaires, Brachiopodes, Chétognathes, pogonophores, mollusques (généralités, Aplacophores, Polyplacophores, Monoplacophores, Bivalves). In: cie, M.e. (ed) Traité de zoologie - anatomie, systématique, biologie, Vol 5. Librairies de l'Académie de Médecine, Paris, p 1625-2165.
- Grinwis, G.C., van den Brandhof, E.J., Engelsma, M.Y., Kuiper, R.V., Vaal, M.A., Vethaak, A.D., Wester, P.W. & Vos, J.G. (2001). Toxicity of PCB-126 in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P4501A induction in several organ systems. *Archives of Toxicology* 75: 80-87.
- Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.R. & Vago, C. (1974). Study of a parasite of the digestive gland observed during the current epizootic of the flat oyster. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 279: 783-784.
- Grizel, H. & Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *The ICES Journal of Marine Science* 47: 399-403.
- Grizel, H. (1996a). Les maladies des mollusques bivalves : risques et prévention. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 16: 161-171.
- Grizel, H. (1996b). Quelques exemples d'introduction et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 15: 401-408.
- Grizel, H. (2003). Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins. Editions IFREMER, Plouzané, 201 p.
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M. & Ratcliffe, N.A. (1996a). Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 34: 273-290.
- Grundy, M.M., Ratcliffe, N.A. & Moore, M.N. (1996b). Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 42: 187-190.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E. & Escoubas, J.M. (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303: 139-145.
- Gutierrez-Galindo, E.A. & Breittmayer, J.P. (1981). Zinc influence on mercury accumulation in the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Revue Internationale d'Océanographie Médicale*: 97-102.
- Hakim, J. (1993). Reactive oxygen species and inflammation. *Comptes Rendus Biologie* 187 (3): 286-295.
- Hamada, T., Tanimoto, A. & Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis* 2: 359-367.
- Hand, R.E., Nell, J.A., Smith, I.R. & Maguire, G.B. (1998). Studies on triploid oysters in Australia. XI. Survival of diploid and triploid Sydney Rock oysters (*Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)) through outbreaks of winter mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation. *Journal of Shellfish Research* 17: 1129-1135.
- Harper, N., Connor, K., Steinberg, M. & Safe, S. (1995). Immunosuppressive activity of polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: nonadditive (antagonistic) interactions. *Fundamental and Applied Toxicology* 27: 131-139.
- Harris-Young, L., Tamplin, M.L., Mason, J.W., Aldrich, H.C. & Jackson, J.K. (1995). Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology* 61: 52-57.
- Haslett, C., Savill, J.S. & Meagher, L. (1989). The neutrophil. *Current Opinion in Immunology* 2: 10-18.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. & Hutchinson, S. (1998). The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 119: 619-623.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. & Hutchinson, S. (2000). The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 127: 203-212.
- Hauton, C., Hawkins, L.E. & Hutchinson, S. (2001). Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L). *Fish & Shellfish Immunology* 11: 143-53.
- Hawkins, A.J., Magoulas, A., Héral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A.J. & Kotoulas, G. (2000). Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetic Research* 76: 273-284.
- Hawkins, L.E., Brooks, J.D., Brooks, S. & Hutchinson, S. (1993). The effect of tidal exposure on aspects of metabolic and immunological activity in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 104: 225-228.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. & Soudant, P. (2003a). Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 293: 249-265.

- Hégaret, H., Wikfors, G.H. & Soudant, P. (2003b). Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 293: 237-248.
- Héral, M. & Deslous-Paoli, J.M. (1991). Oyster culture in European countries. In: Menzel, W. (ed) Estuarine and Marine bivalve mollusk culture. CRC Press, Boca Raton, p 153-190.
- Héral, M. (1989). L'ostéiculture française traditionnelle. In: Lavoisier (ed) Aquaculture. Barnabé, Paris, p 347-397.
- Hervio, D., Chagot, D., Godin, P., Grizel, H. & Mialhe, E. (1991). Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 67-70.
- Hervio, D., Bachere, E., Boulo, V., Cochenec, N., Vuillemin, V., Le Coguic, Y., Cailletaux, G., Mazurie, J. & Mialhe, E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132: 183-194.
- Heydens, W.F., Siglin, J.C., Holson, J.F. & Stegeman, S.D. (1996). Subchronic, developmental, and genetic toxicology studies with the ethane sulfonate metabolite of alachlor. *Fundamental and Applied Toxicology* 33: 173-181.
- Hine, P.M. (1999). The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 367-385.
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O. & De Montaudouin, X. (1999). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research* 33: 1706-1718.
- Hodgson, E., Rose, R.L., Ryu, D.-Y., Falls, G., Blake, B.L. & Levi, P.E. (1995). Pesticide-metabolizing enzymes. *Toxicology Letters* 82-83: 73-81.
- Hong, C.C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M. & Tanamoto, K. (2004). Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27: 1136-1139.
- Hooghe, R.J., Devos, S. & Hooghe-Peters, E.L. (2000). Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences* 66: 2519-2525.
- Hoole, D., Lewis, J.W., Schuwerack, P.M., Chakravarthy, C., Shrive, A.K., Greenhough, T.J. & Cartwright, J.R. (2003). Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology* 126: 71-85.
- Hu, K.J. & Leung, P.C. (2004). Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 137: 21-33.
- Hubert, F., Van Der Knaap, W., Noel, T. & Roch, P. (1996). Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquatic Living Resources* 9: 115-124.
- Hughes, T.K.J., Smith, E.M., Bamet, J.A., Charles, R. & Stephano, G.B. (1991). LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Developmental & Comparative Immunology* 15: 117-122.
- Huvet, A., Daniel, J.-Y., Quere, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J.-F. & Moal, J. (2003). Tissue expression of two [alpha]-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228: 321-333.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F. & Cunningham, C. (2004). The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343: 211-220.
- Hwang, H.-M., Wade, T.L. & Sericano, J.L. (2002). Relationship between lysosomal membrane destabilization and chemical body burden in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) from Galveston Bay, Texas, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1268-1271.
- Imai, T., Numachi, K.-i., Oizumi, J. & Sato, S. (1965). Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25: 27-38.
- INERIS (2005). <http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&openRep=11>.
- INRA (2005). AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. <http://www.inra.fr/agritox>.
- Ishikawa, H., Takahashi, K., Osada, M., Matsutani, T. & Mori, K. (1997). Effect of reproductive cycle on seasonal variation of phagocytosing activity in the hemocytes of *Crassostrea gigas* Ninth JADCI, p 1.
- Jonnalagadda, S.B. & Rao, P.V. (1993). Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 106: 585-595.
- Jepson, P.D., Bennett, P.M., Deaville, R., Allchin, C.R., Baker, J.R. & Law, R.J. (2005). Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 238-248.
- Kaoussi, E., Ayotte, P., Roy, R., Fournier, M. & Revillard, J.P. (2001). Effets des contaminants de l'environnement sur le système immunitaire. *Bulletin d'information en santé environnementale* 12: 1-8.
- Karlin, S. & Brocchieri, L. (1998). Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *Journal of Molecular Evolution* 47: 565-577.

- Kim, S.H. & Sharma, R.P. (2003). Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca²⁺ homeostasis, and cytokine gene expression. *Toxicology in Vitro* 17: 385-395.
- Kim, S.H. & Sharma, R.P. (2004). Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196: 47-57.
- Kim, S.H. & Sharma, R.P. (2005). Mercury alters endotoxin-induced inflammatory cytokine expression in liver: differential roles of p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 27: 123-135.
- Kim, S.Y. & Park, J.W. (2003). Cellular defense against singlet oxygen-induced oxidative damage by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radical Research* 37: 309-316.
- Koganezawa, A. (1974). Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Tokyo, p 29-34.
- Kominami, E., Ueno, T., Muno, D. & Katunuma, N. (1991). The selective role of cathepsins B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. *FEBS Letters* 287: 189-192.
- Koner, B.C., Banerjee, B.D. & Ray, A. (1998). Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 36: 395-398.
- Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C.A. & Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes & Development* 13: 2059-2071.
- Krzystyniak, K., Tryphonas, H. & Fournier, M. (1995). Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103: 17-22.
- Kueh, C.S. & Chan, K.Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology* 59: 41-47.
- Lacoste, A., Cueff, A. & Poulet, S.A. (2001a). P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science* 115: 761-768.
- Lacoste, A., De Cian, M.C., Cueff, A. & Poulet, S.A. (2001b). Noradrenaline and alpha -adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science* 114: 3557-3564.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M. & Poulet, S.A. (2001c). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 139-145.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A. & Poulet, S.A. (2001d). Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2304-2309.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gelebart, F., Cueff, A. & Poulet, S.A. (2002). Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 26: 1-9.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux, Masson, Paris, 419 p.
- Lambert, C. & Nicolas, J.L. (1998). Specific inhibition of chemiluminescent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 53-63.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G. & Paillard, C. (2003). Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 225-240.
- Lambert, S. & Bennett, V. (1993). From anemia to cerebellar dysfunction. A review of the ankyrin gene family. *European Journal of Biochemistry* 211: 1-6.
- Larson, K.G., Roberson, B.S. & Hetrick, F.M. (1989). Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 131-136.
- Launey, S. (1998). Marqueurs mirosatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. : caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, 345 p.
- Le Deuff, R.M., Lipart, C. & Renault, T. (1994). Primary culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, heart cells. *Journal of Tissue Culture Methods* 16: 67-72.
- Le Deuff, R.M., Renault, T. & Gerard, A. (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24: 149-157.
- Le Deuff, R.M. & Renault, T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology* 80: 1317-1322.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. & Berthe, F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology (NY)* 1: 588-597.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L. & Berthe, F. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus* related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15: 251-258.

- Lee, K.H., Meuer, S.C. & Samstag, Y. (2000). Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *European Journal of Immunology* 30: 892-899.
- Lee, T.G. & Maruyama, S. (1998). Isolation of HIV-1 protease inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 604-608.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* 19: 433-440.
- Léonard, S. (2002). Réseau Régional de suivi de la qualité des eaux vis-à-vis des produits phytosanitaires. Fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles de Poitou-Charentes (ed), 73 p.
- Levy, J.H. (1996). The human inflammatory response. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 27: 31-37.
- Li, C.P., Pescott, B., Martino, E.C. & Liu, O.C. (1968). Antineoplastic activity of clam liver extract. *Nature* 219: 1163-1164.
- Limasset, P. (1961). Preliminary observations demonstrating the existence of tobacco mosaic virus inhibitors in aquatic animals, mostly marine. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 252: 3154-3156.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D. & Ursini, M.V. (1998a). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 403: 13-20.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Berardino, D. & 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.
- Livingstone, D.R., Kirchin, M.A. & Wiseman, A. (1989). Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19: 1041-1062.
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia Martinez, P. & Pipe, R.K. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112: 265-276.
- Lodato, M.I. (1997). Mortalité estivale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (bassin de Marennes-Oléron) : étude des pratiques culturales et des caractéristiques biologiques et spatiales des élevages. Thèse de Docteur Vétérinaire, Ecole Vétérinaire de Nantes, Nantes, 127 p.
- Lopez-Barea, J. & Pueyo, C. (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399: 3-15.
- Lorteau, C., Auffret, M. & Le Bris, H. (1995a). Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves. II. Effets modulateurs des facteurs environnementaux. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 171: 423-429.
- Lorteau, C., Auffret, M. & Le Bris, H. (1995b). Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves. I. Structure et fonctionnement. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 171: 415-422.
- Lowe, D.M., Soverchia, C. & Moore, M.N. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 33: 105-112.
- Lowe, D.M. & Fossato, V.U. (2000). The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology* 48: 75-85.
- Lubet, P. (1991). Reproduction des mollusques. 1. Les bivalves. In: Barnabé (Coord.), L. (ed) Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture, Paris, p 166-190.
- Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. & Robles-Mungaray, M. (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 275-282.
- Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A.N., Ascencio-Valle, F. & Robles-Mungaray, M. (2004). Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 287-294.
- Lydy, M.J. & Linck, S.L. (2003). Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45: 343-349.
- Ma, J., Zheng, R., Xu, L. & Wang, S. (2002). Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 57-61.
- Magoulas, A., Kotoulas, G., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Dermitzakis, E. & Hawkins, A.J.S. (2000). Comparison of genetic variability and parentage in different ploidy classes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Genetical Research* 76: 261-272.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cueff, A. & Poulet, S.A. (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology - Part A: Comparative Experimental Biology* 295: 136-44.
- Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N. & Viarengo, A. (2004). Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on $[Ca^{2+}]_i$ dependent phospholipase A2 activation. *Aquatic Toxicology* 66: 197-204.
- Marmaras, V.J., Charalambidis, N.D. & Zervas, C.G. (1996). Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31: 119-313.
- Marteil, L. (1974). La conchyliculture française. Première partie : Le milieu naturel et ses variations. *Revue de Travail de l'Institut des Pêches Maritimes* 38: 217-337.

- Martello, L.B. & Tjeerdema, R.S. (2001). Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquatic Toxicology* 51: 351-362.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M. & Marin, M.G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the Clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 163-170.
- Matsushita, M. & Fujita, T. (2001). Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunological Reviews* 180: 78-85.
- Matsushita, M. & Fujita, T. (2002). The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiology* 205: 490-497.
- Matthiessen, G.C. & Davis, J.P. (1992). Observations on growth rate and resistance to MSX (*Haplosporidium nelsoni*) among diploid and triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1797)) in New England. *Journal of Shellfish Research* 11: 449-454.
- Maurer, D. & Borel, M. (1986). Croissance, engraissement et cycle sexuel de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : comparaison des huîtres âgées de 1 et 2 ans. *Haliotis* 15: 125-134.
- May, R.C. & Machesky, L.M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 114: 1061-1077.
- Mazorra, M.T., Rubio, J.A. & Blasco, J. (2002). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 131: 241-249.
- McClain, J.S., Oris, J.T., Burton, G.A., Jr. & Lattier, D. (2003). Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 22: 361-370.
- McCord, J.M. & Edeas, M.A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 59: 139-142.
- McCormick-Ray, M.G. & Howard, T. (1991). Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 219-230.
- Meisner, L.F., Belluck, D.A. & Roloff, B.D. (1992). Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine *in vivo* and *in vitro*. *Environ Mol Mutagen* 19: 77-82.
- Meuriot, E. & Grizel, H. (1984). Note sur l'impact économique des maladies de l'huître plate en Bretagne. *Rapports techniques ISTPM* 12: 1.
- Meyers, J.A., Burreson, E.M., Barber, B.J. & Mann, R. (1991). Susceptibility of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 10(2): 433-437.
- Miller, A.N., Raghavan, N., FitzGerald, P.C., Lewis, F.A. & Knight, M. (2001). Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. *International Journal for Parasitology* 31: 687-696.
- Miller, G.G., Sweet, L.I., Adams, J.V., Omann, G.M., Passino-Reader, D.R. & Meier, P.G. (2002). *In vitro* toxicity and interactions of environmental contaminants (Arochlor 1254 and mercury) and immunomodulatory agents (lipopolysaccharide and cortisol) on thymocytes from lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Fish & Shellfish Immunology* 13: 11-26.
- Mims, C.A. (1987). 8. Mechanisms of cell and tissue damages. In: Harcourt Brace Jovanovich (ed) *The pathogenesis of infectious disease - Third edition*. Academic Press, London, 343 p.
- Minier, C. & Moore, M.N. (1996). Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. *Marine Environmental Research* 42: 389-392.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M. & Le Boulenger, F. (2002). Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 54: 455-459.
- Ministère de l'agriculture (2005). L'aquaculture en France. http://www.agriculture.gouv.fr/spip/ressources.themes.pecheaquaculture.aquaculture_r61.html.
- Miramand, P., Pigeot, J., Budzinsky, H., Guyot, T., Bustamante, P., Huet, V. & Fichet, D. (2002). Etude des polluants métalliques (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn), des organochlorés (Lindane, PCB) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les organismes vivants sur une zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime). Contrat Agence de l'eau Adour-Garonne. Dossier n° : 290/98/0004, 58 p.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E.A., Boudry, P. & Roch, P. (2000a). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology* 24: 381-393.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M. & Roch, P. (2000b). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal of Biological Chemistry* 275: 12954-12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzert, M. & Roch, P. (2000c). Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 15): 2759-2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. & Roch, P. (2000d). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 486: 185-190.
- Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J.F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A. & Coustau, C. (2005). Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 29: 393-407.
- Mix, M.C. (1976). A general model for leucocyte cell renewal in bivalve molluscs. *Marine Fisheries Review*: 37-41.

- Mohandas, A. & Cheng, T.C. (1985). Release pattern of aminopeptidase from *Biomphalaria glabrata* hemocytes subjected to high-level bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 298-303.
- Mon, K., Muramaya, K., Kanna, N., Nakamura, M., Ohira, E., Kato, Y. & Nomura, T. (1984). Occurrence and characterization of the defense factors in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 35: 55-61.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. & Escoubas, J.-M. (2001). Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters* 500: 64-70.
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M. & Escoubas, J.M. (2004). Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 561: 75-82.
- Moore, C.A. & Eble, A.F. (1977). Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biological Bulletin* 152: 105-119.
- Moore, C.A. & Gelder, S.R. (1985). Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). *Transactions of the American Microscopy Society* 104: 242-249.
- Moore, M.N., Lowe, D.M. & Fieth, P.E.M. (1978). Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 48: 297-302.
- Moore, M.N. (2002). Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 59: 1-15.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Paul Leonard, D.R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 247-268.
- Mora, P., Fournier, D. & Narbonne, J.-F. (1999a). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122: 353-361.
- Mora, P., Michel, X. & Narbonne, J.-F. (1999b). Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7: 253-260.
- Moraga, D. & Tanguy, A. (2000). Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 706-711.
- Mori, K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 53: 361-369.
- Moszczyński, P. (1997). Mercury compounds and the immune system: a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 10: 247-258.
- Munaron, D. (2004). Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente : Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 340 p.
- Munoz, P., Meseguer, J. & Esteban, M.A. (2006). Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 12-19.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.-P., Renault, T. & Gérard, A. (1998). Selecting the fat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 224: 91-107.
- Nell, J.A. & Perkins, B. (2005). Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquaculture Research* 36: 530-536.
- Newton, K., Peters, R. & Raftos, D. (2004). Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental & Comparative Immunology* 28: 565-569.
- Nicholson, S. (2001). Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. *Chemosphere* 45: 399-407.
- Nicolas, J.L., Comps, M. & Cochenne, N. (1992). Herpes-like virus infecting pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 11-13.
- Normand, J. (2005). Etude de la reproduction d'huîtres creuses triploïdes *Crassostrea gigas* (Thunberg) : transmission des chromosomes et potentiel reproducteur. Master 2, Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest, 34 p.
- Obulakondaiah, M., Sreenivasulu, C. & Venkateswarlu, K. (1993). Nontarget effects of carbaryl and its hydrolysis product, 1-naphthol, towards *Anabaena torulosa*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 29: 703-710.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J. & Cajaraville, M.P. (2001). *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro* 15: 511-517.
- Olgun, S., Gogal, J., Robert M., Adeshina, F., Choudhury, H. & Misra, H.P. (2004). Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology* 196: 181-195.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A. & Bourgoignon, N. (2005). Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* 66: 147-152.
- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L. & Long, E.R. (2001). Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology* 55: 203-222.

- Oliver, L.M., Fisher, W.S., Volety, A.K. & Malaeb, Z. (2003). Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64: 363-373.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M. & Cajaraville, M.P. (2002a). Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers* 7: 33-48.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C. & Cajaraville, M.P. (2002b). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58: 75-98.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D. & Bleeker, E.A.J. (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* 119: 195-202.
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C. & Auffret, M. (1993). Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* 15: 193-197.
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P. & Auffret, M. (1994). Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 33-38.
- Oubella, R. & Auffret, M. (1995). Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Brest Roadsted Acte de Rencontre Scientifique International. Communauté Urbaine, Brest (France), p 307-319.
- Oubella, R. (1996). Réponse immunitaire chez les mollusques bivalves. Effets de facteurs environnementaux sur le système de défense interne. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Bretagne Occidentale, Brest, p.
- Ozretic, M. (1992). Effects of organophosphorus and carbamate pesticides on mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) esterases. *Final reports on research projects dealing with toxicity of pollutants on marine organisms*, FAO, p 1-11.
- Paillard, C., Allam, B. & Oubella, R. (2004). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 249-262.
- Pain, S. & Parant, M. (2003). Multixenobiotic defense mechanism (MDMX) in bivalves. *Comptes Rendus Biologie* 326: 659-672.
- Pampanin, D.M., Marin, M.G. & Ballarin, L. (2002). Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the Venus clam *Chamelea gallina*. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 227-234.
- PAN (2005). Pesticides Database. http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp
- Parant, M. (1998). Xenobiotic metabolism in bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III - Sciences de la Vie -Life* 321: 485-494.
- Parry, H.E. & Pipe, R.K. (2004). Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 69: 311-325.
- Pena-Llopis, S., Ferrando, M.D. & Pena, J.B. (2002). Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere* 47: 485-497.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H. & Chew, K.K. (1981). Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington state. *Journal of Shellfish Research* 1: 9-16.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.
- Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H. & Rabouin, M.-A. (1980). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. N., sp N., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 43: 131-140.
- Pinsky, M.R. (2004). Dysregulation of the immune response in severe sepsis. *American Journal of the Medical Sciences* 328: 220-229.
- Pipe, R.K. (1990a). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal* 22: 595-603.
- Pipe, R.K. (1990b). Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* 261: 261-268.
- Pipe, R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental & Comparative Immunology* 16: 111-122.
- Pipe, R.K., Porte, C. & Livingstone, D.R. (1993). Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 3: 221-233.
- Pipe, R.K. & Coles, J.A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 581-595.
- Pipe, R.K., Coles, J.A. & Farley, S.R. (1995a). Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Smith, S.A., Zelikoff, J.T., Kaattari, S.L., Anderson, R.S., Söderhäll, I. & Weeks-

- Perkins, B.A. (eds) Techniques in Fish Immunology - Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrates, Vol 4. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, p 93-100.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U. & Pulsford, A.L. (1995b). Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology* 32: 59-73.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M. & Ramanathan, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46: 43-54.
- Poitras, E. & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel : principe et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2: 2-11.
- Porte, C., Sole, M., Albaiges, J. & Livingstone, D.R. (1991a). Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 100: 183-186.
- Porte, C., Sole, M., Albaiges, J. & Livingstone, D.R. (1991b). Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 100: 183-6.
- Prater, M.R., Gogal Jr, R.M., Blaylock, B.L., Longstreth, J. & Holladay, S.D. (2002). Single-dose topical exposure to the pyrethroid insecticide, permethrin in C57BL/6N mice: effects on thymus and spleen. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1863-1873.
- Préfecture de l'Indre (2005). www.indre.pref.gouv.fr/prefecture/environnement/Pollution/pollutions/Polychlorobiphényles_PCB
- Pruzzo, C., Gallo, G. & Canesi, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* 7: 761-72.
- Quirion, S. (2004). Etude du stress environnemental chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) en période estivale dans le bassin de Marennes-Oléron (programme MOREST). Master 2, Faculté des Sciences et Techniques, Metz, 43 p.
- Quyale, D.B. (1969). Pacific oyster culture in British Columbia. *Fisheries Research Board of Canada*: 193.
- Raftos, D.A., Bult, D. & Bozemer, B. (2004). Phenoloxidase analysis of Pacific oysters. Australian Seafood Industries, p 3-5.
- Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A. & Knight, M. (2003). Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126: 181-191.
- Raillard, O. (1991). Interactions study of the physico-chemical processes in the production of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in the Marennes-Oleron basin: modelisations essays. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, 216 p.
- Rees, C.B., McCormick, S.D., Vanden Heuvel, J.P. & Li, W. (2003). Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 62: 67-78.
- Regoli, F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50: 351-361.
- Reid, H.I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C. & Birkbeck, T.H. (2003). Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 56: 249-258.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.M. & Chollet, B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 14: 64-66.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N. & Maffrat, P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire* 145: 735-742.
- Renault, T., Cochenec, N. & Grizel, H. (1995a). *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of European Association for Fish Pathology* 15: 78-80.
- Renault, T., Flaujac, G. & Le Deuff, R.M. (1995b). Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Methods in Cell Science* 17: 199-205.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Chollet, B. & Maffrat, P. (1995c). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research* 26: 539-543.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenec, N. & Gerard, A. (2000a). Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 173-183.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C. & Delsert, C. (2000b). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods* 88: 41-50.
- Renault, T., Xue, Q.G. & Chilmonczyk, S. (2001). Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 269-74.
- Réseau National des Données sur l'Eau (2003). Les statistiques de production. <http://www.rnde.tm.fr/fr/cz/stat.htm>.
- Revillard, J.P. (1998). Inflammation et cicatrisation. In: De Boeck Université (ed) Immunologie 3ème édition, Vol 14, p 187-200.

- Ringwood, A.H., Connors, D.E. & DiNovo, A. (1998). The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Marine Environmental Research* 46: 591-595.
- Rittschof, D. & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin* 50: 369-373.
- RNO (2002). Surveillance du milieu marin. IFREMER et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, 69 p.
- RNO (2005). Résultats de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral - Département : Charente-Maritime et Vendée (sud), Edition 2005, IFREMER - Laboratoire Environnement Littoral des Pertuis Charentais, 69 p.
- Robert, R., His, E. & 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.
- Robillard, S., Beauchamp, G. & Laulier, M. (2003). The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135: 49-59.
- Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172: 125-145.
- Rodrick, G.E. & Cheng, T.C. (1974). Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 24: 41-48.
- Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P., Dannenberg, A.M. & Kamaenetz, R.L. (1975). Macrophage esterase: identification, purification and properties of a chymotrypsin-like esterase from lung that hydrolyses and transfers nonpolar amino acid esters. *Biochimica and Biophysica Acta - Enzymology* 403: 161-179.
- Roloff, B., Belluck, D. & Lorraine Meisner (1992). Cytogenetic effects of cyanazine and metolachlor on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutation Research Letters* 281: 295-298.
- Rostagno, B., Violleau, A., Brun, C., Dietrich, P., Fillon, A., Gouletquer, P., Guichet, R., Kantin, R., Legay, D., Loubersac, L., Masson, D., Rocher, G., Ryckaert, M., Thomas, G., Fichet, D., Guyot, D., Miramand, P., Pigeot, J., Seguignes, M. & Taillade, S. (1999). Qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais - Bilan et diagnostic, 130 p.
- Rothe, G., Oser, A. & Valet, G. (1988). Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75: 354-355.
- Rouveix, B., Groult, F. & Levacher, M. (1987). Beta-lactam antibiotics and human lymphocyte function: the *in vitro* effect on blastogenesis, lymphokine production and suppressor cell functions. *International Journal of Immunopharmacology* 9: 567-75.
- Russo, J. & Lagadic, L. (2000). Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). *Cell Biology and Toxicology* 16: 15-30.
- Russo, J. & Lagadic, L. (2004). Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut* 127: 303-311.
- Sami, S., Faisal, M. & Huggett, R.J. (1992). Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Marine Biology* 113: 247-252.
- Sami, S., Faisal, M. & Huggett, R.J. (1993). Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 35: 131-135.
- Sanchez-Dardon, J., Voccia, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakley, B. & Fournier, M. (1999). Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1492-1497.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P. & Fournier, M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58: 189-200.
- Sauvé, S. & Fournier, M. (2005). Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 67-72.
- Schlenk, D. & Buhler, D.R. (1989). Xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 94C: 469-475.
- Schlenk, D., Martinez, P.G. & Livingstone, D.R. (1991). Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 99: 63-68.
- Scott, G.I., Middaugh, D.P. & Sammons, T.I. (1985). Interactions of chlorine-produced oxidants (CPO) and salinity in affecting lethal and sublethal effects in the eastern or American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), infected with the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, p 351-376.
- Shaw, J.P., Large, A.T., Livingstone, D.R., Doyotte, A., Renger, J., Chipman, J.K. & Peters, L.D. (2002). Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site. *Marine Environmental Research* 54: 505-509.
- Shenker, B.J., Guo, T.L. & Shapiro, I.M. (2000). Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent*1, *2. *Environmental Research* 84: 89-99.

- Sherwood, E.R. & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18: 385-405.
- Simkiss, K., Taylor, M. & Mason, A.Z. (1982). Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Marine Biology Letters* 3: 187-201.
- Siwicki, A.K., Cossarini-Dunier, M., Studnicka, M. & Demael, A. (1990). *In vivo* effect of the organophosphorus insecticide trichlorophon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*): Effect of high doses of trichlorophon on nonspecific immune response. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19: 99-105.
- Skern, R., Frost, P. & Nilsen, F. (2005). Relative transcript quantification by quantitative PCR: roughly right or precisely wrong? *BMC Molecular Biology* 6: 10.
- Smith, I.R., Nell, J.A. & Adlard, R. (2000). The effect of growing level and growing method on winter mortality, *Mikrocytos roughleyi*, in diploid and triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 185: 197-205.
- Smith, V.J. & Söderhäll, K. (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology* 15: 251-261.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B. & Hutchinson, T.H. (2004). Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67: 143-154.
- Snieszko, S.F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6: 197-208.
- Soares-da-Silva, I.M., Ribeiro, J., Valongo, C., Pinto, R., Vilanova, M., Bleher, R. & Machado, J. (2002). Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132: 541-553.
- Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S. & Soderhall, K. (2003). Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental & Comparative Immunology* 27: 661-672.
- Söderhäll, K. & Smith, V.J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental & Comparative Immunology* 7: 229-239.
- Söderhäll, K. & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10: 23-28.
- Sole, M., Porte, C. & Albaiges, J. (1994). Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology* 30: 271-283.
- Soletchnik, P., Fauray, N., Razet, D. & Gouilletquer, P. (1998a). Hydrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. *Hydrobiologia* 386: 131-146.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Fauray, N., Razet, D., Geairon, P., Gouilletquer, P. & Forest, G. (1998b). Spring and summer mortalities of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Marennes Oleron Bay: Pilot study from Ronce and Perquis leasing grounds. RI DRV RA RST, La Tremblade, 55 p.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Fauray, N., Razet, D., Geairon, P. & Gouilletquer, P. (1999). Summer mortality of the oyster *Crassostrea gigas* in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquatic Living Resources* 12: 131-143.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Dégremont, L., Bedier, E., Bouget, J.F., Dubois, B., Martin, J.L., Enriquez Diaz, M., Fauray, N., Le Moine, O., Renault, T., Gagnaire, B. & Samain, J.F. (2003). Characterization of summer mortalities of *C. gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. *Journal of Shellfish Research* 22: 354-355.
- Soletchnik, P., Lambert, C. & Costil, K. (2005). Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24: 197-208.
- Sparks, A.K. & Morado, J.F. (1988). Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication* 18: 139-152.
- Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. & Soederhaell, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology* 23: 179-186.
- St-Jean, S., Pelletier, E. & Courtenay, S. (2002a). Very low levels of waterborne butyltins modulate hemocyte function in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine ecology progress series* 236: 155-161.
- St-Jean, S., Pelletier, E. & Courtenay, S. (2002b). Hemocyte functions and bacterial clearance affected *in vivo* by TBT and DBT in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine ecology progress series* 236: 163-178.
- Storey, K.B. (2004). Gene regulation in physiological stress. *International Congress Series* 1275: 1-13.
- Strongin, G.L. & Skvortsov, S.A. (1988). Individual differences and individual norms in automated preflight medical checkup. *Kosmicheskaja Biologija i Aviakosmicheskaja Meditsina* 22: 10-16.
- Sugawara, S. (2005). Immune functions of proteinase 3. *Critical Reviews in Immunology* 25: 343-360.
- Suzuki, S., Utsonomiya, I. & Kusuda, R. (1998). Experimental infection of marine birnavirus strain JPO-96 Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Bulletin of Marine Sciences and Fisheries, Kochi University* 18: 39-41.
- Suzuki, T., Kono, H., Hirose, N., Okada, M., Yamamoto, T., Yamamoto, K. & Honda, Z. (2000). Differential involvement of Src family kinases in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Immunology* 165: 473-82.

- Svardh, L. & Johannesson, K. (2002). Incidence of hemocytes and parasites in coastal populations of blue mussels (*Mytilus edulis*)--testing correlations with area, season, and distance to industrial plants. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 22-28.
- Svensson, S., Sarngren, A. & Forlin, L. (2003). Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquatic Toxicology* 65: 27-37.
- Tall, B.D., La Peyre, J.F., Bier, J.W., Miliotis, M.D., Hanes, D.E., Kothary, M.H., Shah, D.B. & Faisal, M. (1999). *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4261-4263.
- Tanguy, A., Boutet, I., Riso, R., Boudry, P., Auffret, M. & Moraga, D. (2003). Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: a potential ecological tool for environmental monitoring? *Marine Ecology Progress Series* 257: 87-97.
- Tanguy, A., Guo, X. & Ford, S.E. (2004). Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338: 121-131.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J. & Moraga, D. (2005a). Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *The Febs Journal* 272: 390-403.
- Tanguy, A., Boutet, I. & Moraga, D. (2005b). Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochimica et Biophysica Acta* 1681: 116-125.
- Terech-Majewska, E., Siwicki, A.K. & Szveda, W. (2004). Modulative influence of lysozyme dimer on defence mechanisms in the carp (*Cyprinus carpio*) and European sheatfish (*Silurus glanis*) after suppression induced by herbicide Roundup. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7: 123-128.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.
- Thomson, J.D., Pirie, B.J.S. & George, S.G. (1985). Cellular metal distribution in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thun.) determined by quantitative X-ray microprobe analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 85: 37-45.
- Tirard, C.T., Grossfeld, R.M., Levine, J.F. & Kennedy-Stoskopf, S. (1997). Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 116: 43-49.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. & Roch, P. (1996). Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III - Sciences de la Vie -Life* 319: 209-218.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. & Roch, P. (1997). Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 21: 267-275.
- Torreilles, J., Guerin, M.C. & Roch, P. (1999). Modified Alsever's solution is not a good medium for reactive oxygen metabolite study in bivalves. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 65-69.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. (sous presse). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Van der Flier, A. & Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1538: 99-117.
- van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Van Loveren, H., Ross, P.S., Osterhaus, A.D.M.E. & Vos, J.G. (2000). Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicology Letters* 112-113: 319-324.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A. & Pipe, R.K. (1985). Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity and homeostasis in the digestive gland cells of mussels exposed to the metal in presence or absence of phenanthrene, p 184-187.
- Viarengo, A., Canesi, L., Moore, M.N. & Orunesu, M. (1994). Effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on the cytosolic Ca²⁺ level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Marine Biology* 119: 557-564.
- Victor, V.M., Rocha, M. & De la Fuente, M. (2004). Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International Journal of Immunopharmacology* 4: 327-347.
- Viswanathan, R. (1997). Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Chemosphere* 35: 323-334.
- Voccia, I., Blakley, B., Brousseau, P. & Fournier, M. (1999). Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and Industrial Health* 15: 119-132.
- Volety, A.K. & Chu, F.-L.E. (1995). Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental & Comparative Immunology* 19: 135-142.
- Vowells, S.J., Sekhsaria, S., Malech, H.L., Shalit, M. & Fleisher, T.A. (1995). Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *Journal of Immunological Methods* 178: 89-97.

- Wade, T.L., Sericano, J.L., Gardinali, P.R., Wolff, G. & Chambers, L. (1998). NOAA's 'Mussel Watch' Project: current use organic compounds in bivalves. *Marine Pollution Bulletin* 37: 20-26.
- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E. & Berthe, F. (2002). Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *Comptes Rendus Biologies* 325: 231-238.
- Wahl, S.M., McCartney-Francis, N., Chan, J., Dionne, R., Ta, L. & Orenstein, J.M. (2003). Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? *Cells Tissues Organs* 174: 26-33.
- Waller, T.R. (1998). Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: Johnston, P.A. & Haggart, J.W. (eds) *Bivalves: An eon of evolution - Paleobiological studies honoring Norman D. Newell*. University of Calgary Press, Calgary
- Wang, F.S., Whittam, T.S. & Selander, R.K. (1997). Evolutionary genetics of the isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 179: 6551-6559.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625.
- Werner, I. & Nagel, R. (1997). Stress proteins hsp60 and hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 2393-2403.
- Williams, G.M., Kroes, R. & Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31: 117-165.
- Winston, G.W., Moore, M.N., Kirchin, M.A. & Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 113: 221-229.
- Wong, S., Fournier, M., Coderre, D., Banska, W. & Krzystyniak, K. (1992). Environmental immunotoxicology. In: Peakall, D. (ed) *Animals Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman and Hall, London, p 167-189.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K. & Ratcliffe, N.A. (2003a). Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 65: 13-25.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A. & Ratcliffe, N.A. (2003b). Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology* 15: 195-210.
- Xue, Q. (1998). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 324 p.
- Xue, Q. & Renault, T. (2000). Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 155-63.
- Xue, Q., Renault, T., Cochenec, N. & Gerard, A. (2000). Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 155-65.
- Xue, Q. & Renault, T. (2001). Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 187-194.
- Xue, Q.G., Renault, T. & Chiltonczyk, S. (2001). Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 557-567.
- Yawetz, A., Manelis, R. & Fishelson, L. (1992). The effects of aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of Mediterranean molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 103C: 607-614.
- Yoshihara, T., Hamamoto, T., Munakata, R., Tajiri, R., Ohsumi, M. & Yokota, S. (2001). Localization of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells: biochemical and immunocytochemical studies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49: 1123-1131.
- Zaroogian, G. & Yevich, P. (1994). The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 37: 355-373.

Annexes



Annexe 1 - Rappels bibliographiques

Annexe 1a : clés définissant l'appartenance de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, aux différents niveaux systématiques.

Classe des Lamellibranches : mollusque aquatique à symétrie bilatérale en général, à corps protégé par deux valves presque toujours externes reliées dorsalement par un ligament élastique qui tend à les écarter et souvent engrenées par des dents constituant une charnière ; fermeture des valves assurée par deux muscles adducteurs qui les relient l'une à l'autre et dont l'antérieur peut s'atrophier ou disparaître. Les valves de nombreuses formes ne peuvent se clore et restent bâillantes ; corps plus ou moins aplati transversalement, revêtu sur ses faces latérales par deux larges expansions du manteau ou lobes palléaux, qui sécrètent la coquille, délimitent une cavité palléale et peuvent se souder plus ou moins par leurs bords ; pied souvent aplati en carène, en fer de hache, linguiforme, parfois atrophié ou absent, pourvu ou non d'une glande du byssus.

Ordre des Filibranches : branchies formées chacune de deux lames comportant des filaments réfléchis à jonctions inter filamentaires ciliaires, conjonctives ou vasculaires. Les extrémités des filaments réfléchis peuvent être soudées ; manteau ouvert ou à structure palléale ; adducteur antérieur souvent réduit ou absent ; charnière de type taxodonte, dysodonte ou isodonte ; pas de sinus palléal.

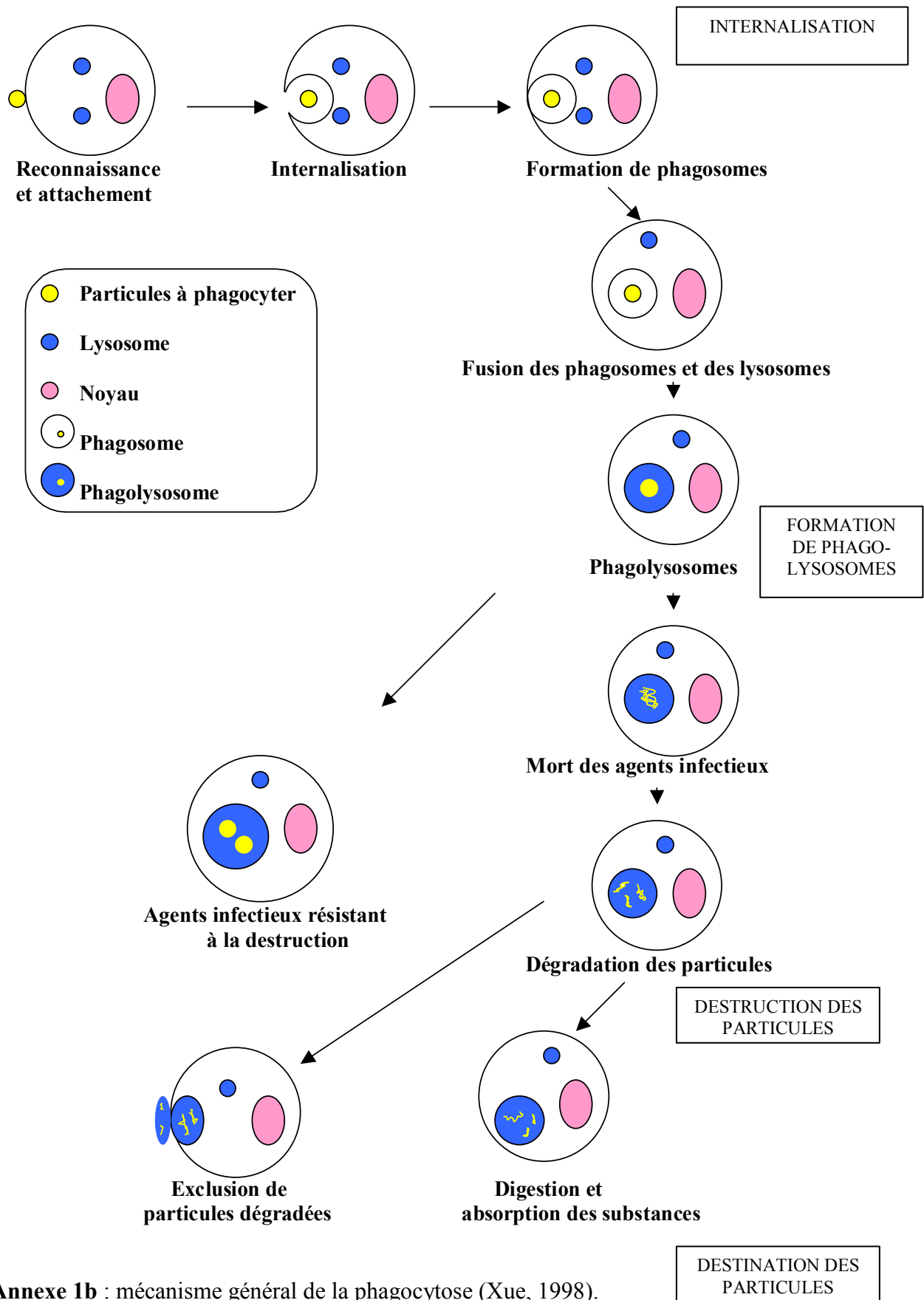
Sous-Ordre des Anisomyaires : adducteur antérieur plus petit que le postérieur ou absent ; dents véritables souvent absentes ou remplacées parfois par de petites denticules ; prodissoconque à charnière crénelée ; manteau ouvert, pas de siphons ; feuillets branchiaux lisses à filaments uniformes, ou plissés à filaments non uniformes.

Super-Famille des Ostréoidés : coquille inéquivalve, irrégulière, à valve gauche fixée ; cartilage ligamentaire dans une fossette triangulaire ; charnière édentulée ; lobes palléaux libres ; pied et byssus atrophiés ; feuillets branchiaux à forts filaments principaux ; les feuillets ascendants de la lame externe sont reliés au manteau.

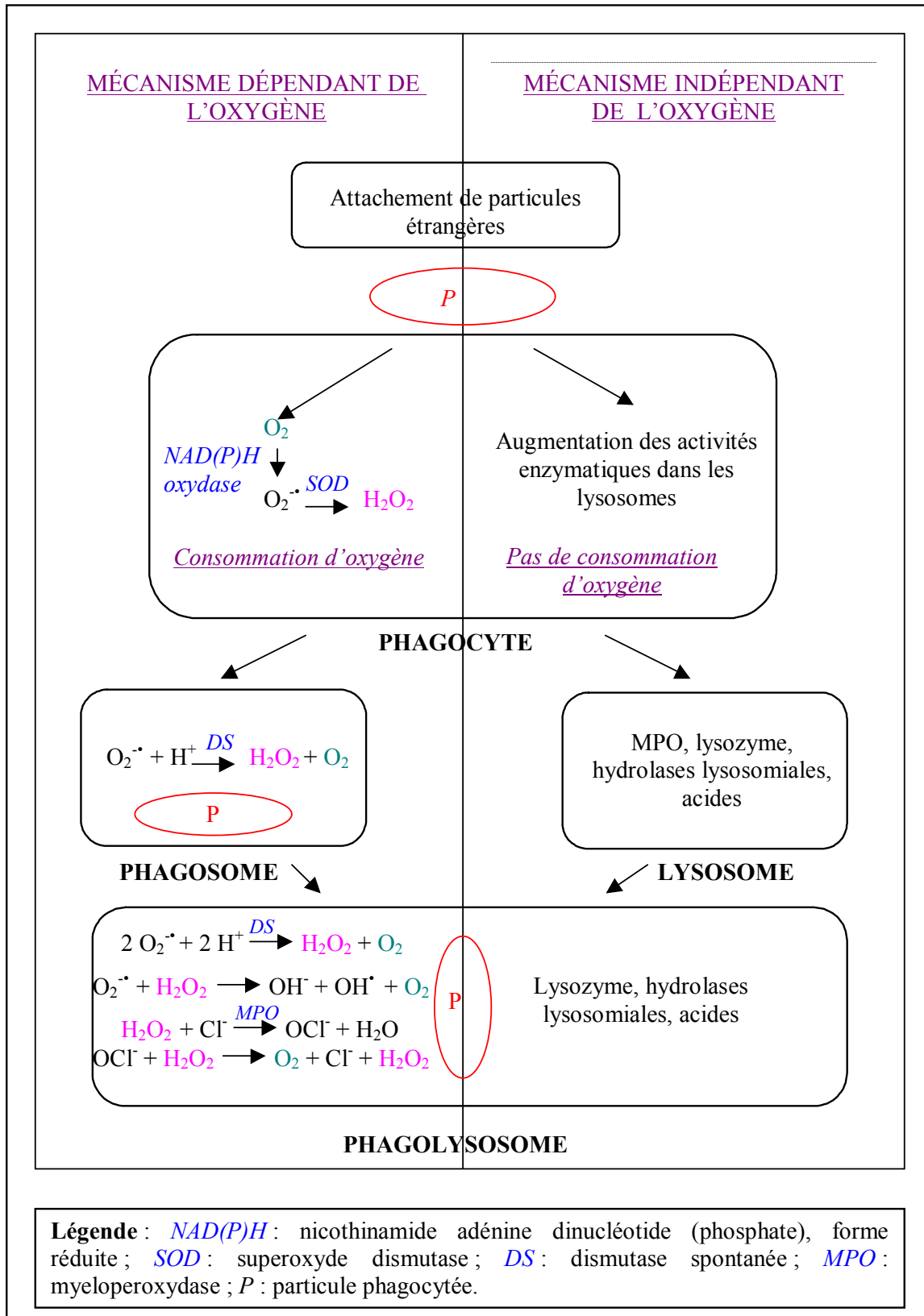
Famille des Ostréidés : valve gauche en général plus profonde que la droite ; forme et sculpture très variables ; bords des valves assez plissés. La grande variabilité des huîtres ne permet guère d'utiliser les caractères de la coquille pour leur identification.

Genre *Crassostrea* : Ce terme remplace actuellement celui de *Gryphea*. Larve : prodissoconque inéquivalve à provinculum (charnière) munie de 2 crénelures à chacune de ses extrémités ; ligament interne, hors de la charnière. Adulte : chambres crayeuses à structure feuilletée ; ventricule non traversé par le rectum ; femelles ovipares ; valve inférieure subplissée ou plissée ; valve supérieure lisse, très rarement plissée.

Le nom « *Ostrea* » a été donné par Linné en 1758 à un nombre de mollusques décrits comme suit : « *Ostrea. Animal Tethys, testa bivalvis inaequivalvis, subaurita. Cardo edentulus et fossula cava ovata, striisque lateralibus transversis. Vulva anusve nullus.* » Le nom Tethys (de la mythologie Grecque, faisant référence à la mer) s'applique au type d'animaux marins, vivant dans leur coquille ou nus, que Linné a listé sous le nom général de « Vermes » comprenant les vers, les mollusques, les échinodermes et d'autres. La traduction de la description de Linné peut s'écrire comme suit : « Bivalve à coquille inégale en forme d'oreille. Charnière dépourvue de dents, dépression concave et ovale, avec des lignes transversales sur les côtés. Pas de vulve ni d'anus. » Cette définition regroupe un grand nombre de genres tels que les coquilles Saint-Jacques, les couteaux, et d'autres mollusques qui ne sont pas des huîtres.



Annexe 1b : mécanisme général de la phagocytose (Xue, 1998).



Annexe 1c : mécanismes de dégradation des particules phagocytées (Xue, 1998).

Espèce	Enzymes	Source	Référence
<i>C. virginica</i>	Lysozyme B-glucuronidase Phosphatase acide Aminopeptidase Phosphatase alcaline	Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes	Cheng & Rodrick, 1975 Cheng & Downs, 1988
<i>M. mercenaria</i>	Lysozyme B-glucuronidase Phosphatase acide Aminopeptidase Phosphatase alcaline Estérase non spécifique B-galactosidase Peroxydase Myéloperoxydase Aryl-sulfatase B-N-acetyl-glucosaminidase	Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Cheng <i>et al.</i> , 1975 Cheng & Rodrick, 1975 Moore & Eble, 1977 Moore & Gelder, 1985 Gelder & Moore, 1986
<i>M. edulis</i>	Lysozyme Estérase (C4) Estérase lipase (C8) Leucine arylamidase Valine arylamidase Cystine arylamidase Phosphatase acide Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase B-galactosidase B-glucuronidase a-glucosidase B-N-acetyl-glucosaminidase a-mannosidase a-fucosidase Peroxydase Phénoloxydase SOD Glutation peroxidase	Hémolymph Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Pipe, 1990a Coles & Pipe, 1994 Pipe <i>et al.</i> , 1993
<i>M. galloprovincialis</i>	Lysozyme Phosphatase alcaline Leucine arylamidase Valine arylamidase Cystine arylamidase Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase B-galactosidase a-glucosidase B-N-acetyl-glucosaminidase a-mannosidase a-fucosidase a-naphtyl butyrate estérase Naphthol-AS-D-chloroacétate estérase a-naphtyl acétate estérase Estérase lipase (C8) Lipase (C14) B-glucuronidase Phosphatase acide Estérase (C4) Peroxydase NADH oxydase Phénoloxydase	Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Carballal <i>et al.</i> , 1997 Torreilles <i>et al.</i> , 1997

Espèce	Enzymes	Source	Référence
<i>C. gigas</i>	Lysozyme Phosphatase acide NADH oxydase Phosphatase alcaline Estérase (C4) Estérase lipase (C8) Lipase (C14) Leucine arylamidase Valine arylamidase Cystine arylamidase Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase B-galactisodase B-glucuronidase B-glucosidase a-mannosidase B-N-acetyl-glucosaminidase Phénoloxydase TIMP Peroxydase Aminopeptidase a-glucosidase a-fucosidase	Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes et sérum Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Mon <i>et al.</i> , 1984 Auffret, 1989 Gagnaire <i>et al.</i> , 2004 Chagot, 1989 Xue & Renault, 2000 Montagnani <i>et al.</i> , 2001 Luna-Gonzales <i>et al.</i> , 2003
<i>Mya arenaria</i>	B-glucuronidase Phosphatase acide Estérase non spécifique B-N-acetyl-glucosaminidase	Hémocytes et sérum Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Beckmann <i>et al.</i> , 1992
<i>R. philippinarum</i>	B-glucuronidase Phosphatase alcaline Estérase non spécifique Peroxydase	Hémocytes Hémocytes Hémocytes Hémocytes	Cima <i>et al.</i> , 2000
<i>O. edulis</i>	NADH oxydase Phosphatase alcaline Estérase (C4) Estérase lipase (C8) Lipase (C14) Leucine arylamidase Valine arylamidase Cystine arylamidase Phosphatase acide Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase B-galactisodase B-glucuronidase B-N-acetyl-glucosaminidase a-mannosidase a-fucosidase Peroxydase	Hémocytes et sérum Hémocytes	Chagot, 1989 Xue & Renault, 2000

Annexe 1d : enzymes lysosomales mises en évidence chez quelques mollusques bivalves marins.

Annexe 1e : informations relatives aux polluants utilisés.

Légende du tableau :

Xn nocif, dangereux pour l'environnement

T toxique

T+ très toxique, dangereux pour l'environnement

N nocif

Xi irritant, dangereux pour l'environnement

R22 nocif en cas d'ingestion

R26 très toxique par inhalation

R26/28 très toxique par inhalation et ingestion

R37 irritant pour les voies respiratoires

R40 Possibilité d'effets irréversibles

R41 risque de lésions oculaires graves

R42 peut entraîner une sensibilisation par inhalation

R43 peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

R45 peut causer des effets cancérigènes

R48/22 nocif : risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion

R49 peut causer des effets cancérigènes par inhalation

R50 très toxique pour les organismes aquatiques

R50/53 très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme sur l'environnement aquatique

R51/53 toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme sur l'environnement aquatique

R60 peut altérer la fertilité

R61 risque pendant la grossesse d'effets néfastes sur l'enfant

R62 risque possible d'altération de la fertilité

R63 risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes sur l'enfant

R68 risque possible d'effets mutagènes irréversibles

S2 conserver hors de portée des enfants

S26 en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

S28 après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec...(produits appropriés indiqués par le fabricant)

S36/37 porter un vêtement de protection et des gants appropriés

S36/37/39 porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

S39 porter un appareil de protection des yeux/du visage

S45 en cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'emballage ou l'étiquette)

S46 en cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

S60 éliminer le produit et/ou son récipient comme un déchet dangereux

S61 éviter le rejet dans l'environnement ; consulter les instructions spéciales/ la fiche de données de sécurité

Catégories :

1 = connu pour être

2 = doit être regardé = comme si

3 = suscite l'intérêt

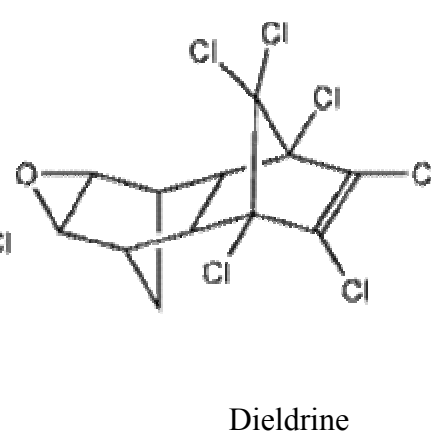
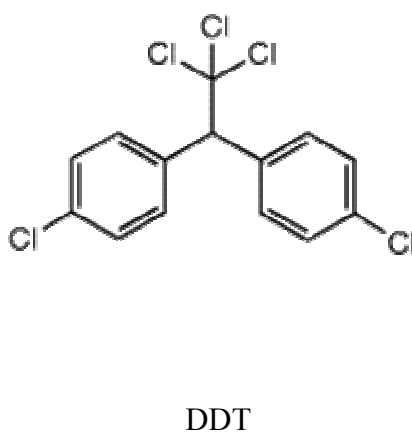
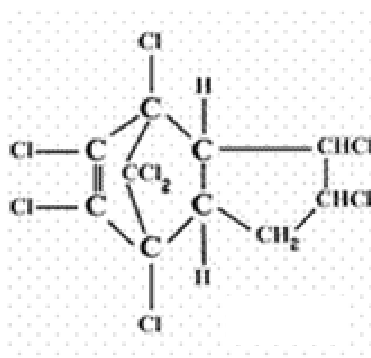
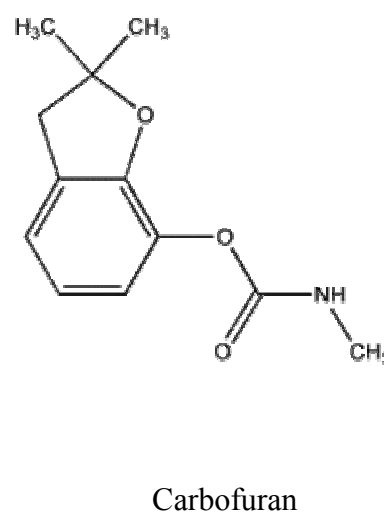
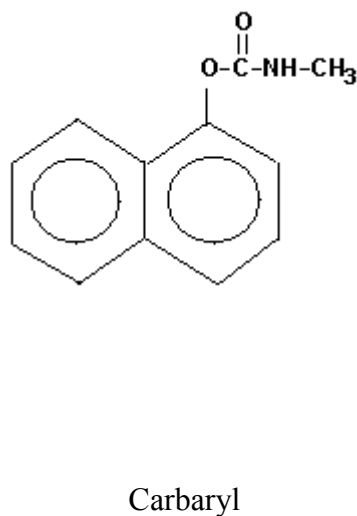
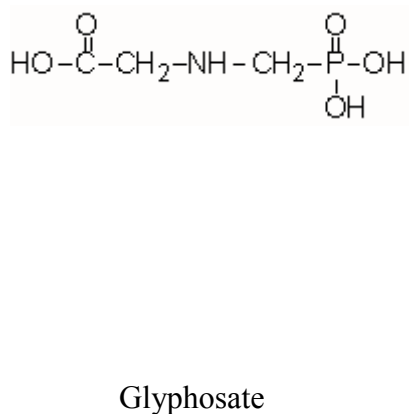
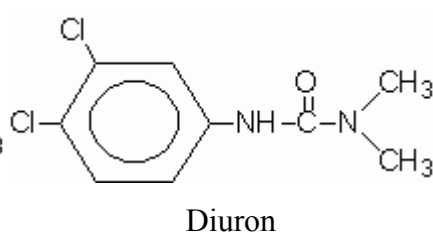
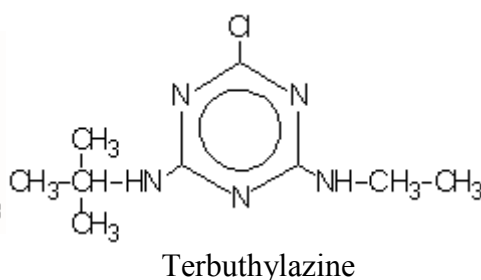
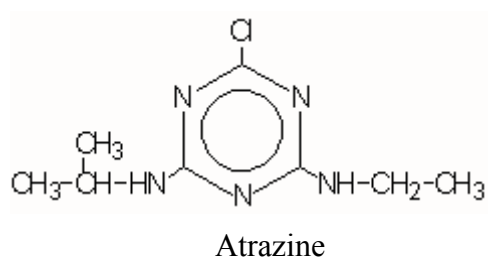
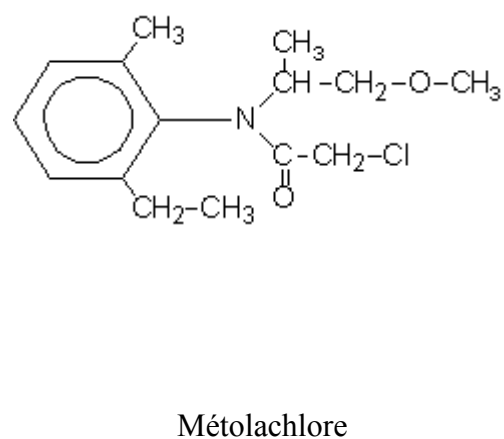
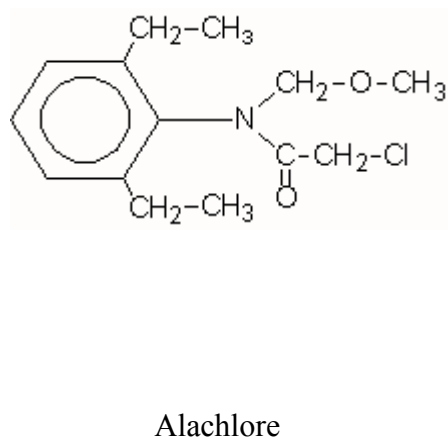
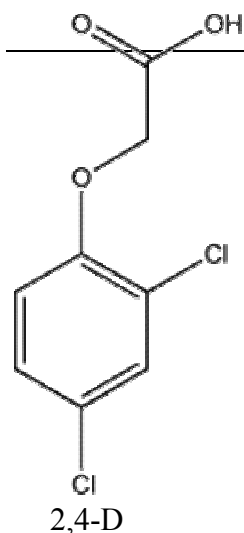
Sources : Directive substances dangereuses 67/548/CEE, remplacée par la 2001/59/CE (Classification and Labelling), (Rostagno *et al.*, 1999; INRA, 2005; PAN, 2005)

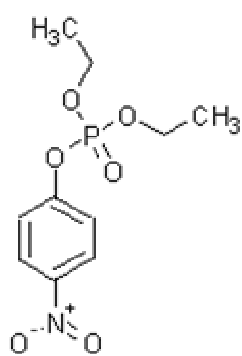
Liste des substances actives	Famille	N° CAS	Masse molaire	Solubilité dans l'eau (g/L)	log P	Facteur	Temps de 1/2 vie dans l'eau (jrs)	Temps de 1/2 vie dans les estuaires (jrs)	Toxicité aiguë	Toxicité chronique	PNE C (µg/L)	DJA (mg/kg/jr)	Effets insidieux	Classification	Labelling	Toxicité mollusques
2,4-D 2,4-dichlorophenoxyacetic acid	Herbicide aryloxyacide	94-75-7	221.04	27.64	2.15	2	730		<i>C. carpio</i> - CL50 > 560 mg.L ⁻¹ (96h) <i>O. mykiss</i> - CL50 = 240 mg.L ⁻¹ (96h) <i>D. magna</i> - CE50 = 100 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO = 79 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	58	0.05			Xn Xi R: 22-37-41-43-52/53 S: (2-)24/25-26-36/37/39-46-61	
Alachlore 2-chloro-2',6'-diethyl-N-(methoxymethyl)acetanilide	Herbicide chloracétanilide	15972-60-8	269.77	0.2	1.48	1		14-21	<i>O. mykiss</i> - CL50 = 1.8 mg.L ⁻¹ (96h)		1.3	0.0005		Carc. Cat. 3	Xn N R: 22-40-43-50/53 S: 2-36/37/39-46-60-61	
Métolachlore	herbicide chloroacétanilide	51218-45-2	283.81	0.53	1.89	1							mutagènes et cancérogènes			
Atrazine 2-chloro-4-ethylamine-6-isopropylamine-1,3,5-triazine	Herbicide triazine	1912-24-9	215.69	0.03	2.7	2		60-100					tératogènes et mutagènes		Xn N R: 43-48/22-50/53 S: (2-)36/37-60-61	faible à modérée
Terbutylazine	Herbicide triazine	5915-41-3		0.0085	2.5	2	>200	200	<i>O. mykiss</i> - CL50 = 4.6 µg.L ⁻¹ (96h)	<i>O. mykiss</i> - CSEO = 6.5 µg.L ⁻¹						
Diuron 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea	Herbicide urée	330-54-1	233.1	0.042	2.77	2	>500	120	<i>D. magna</i> - CE50 = 1.4 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>O. mykiss</i> - CSEO = 0.41 mg.L ⁻¹ (28 jrs) <i>D. magna</i> - CSEO = 1 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.52	0.0015		Carc. Cat. 3	Xn N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61	faible à modérée
Glyphosate	herbicide acide aminé phosphonoglycine	1071-83-6	169.09	12	-2	2	>30	1-174	<i>O. mykiss</i> - CL50 = 38 mg.L ⁻¹ (96h) <i>D. magna</i> - CE50 > 40 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO > 30 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	60	0.3			Xi R: 41-51/53 S: 2-26-39-61	

Carbaryl 1-naphthyl methylcarbama te	Insecticide carbamate	63-25- 2	201.23	0.11	1.59	1	16.5	7 - 14.	<i>O. mykiss</i> - CL50 = 1.3 mg.L ⁻¹ (96h) <i>D. magna</i> - CE50 = 0.26-5.6 µg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO = 0.0015 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.05 6	0.00 8		Carc. Cat. 3	Xn R: 22-37-40- 50/53 S: (2-)22-24- 36/37-46-61	modérée à forte
Carbofuran	Insecticide nématocide carbamate	1563- 66-2	221.25	0.7	0.22	0	121		<i>O. mykiss</i> - CL50 = 0.1-1 mg.L ⁻¹ (96h) <i>D. magna</i> - CE50 = 15 µg.L ⁻¹ (48h)			0.00 2	suspec té cancéri gène		T+ R: 26/28-50	
Chlordane 1,2,4,5,6,7,8,8- octachloro- 3a,4,7,7a- tetrahydro-4,7- methanoindan	Insecticide organochlori ne	57-74- 9	409.8											Carc. Cat. 3	Xn N R: 21/22-40- 50/53 S: (2-)36/37-60- 61	modérée
DDT 1,1,1-trichloro- 2,2-bis(4- chlorophenyl)et hane dichlorodiphen yltrichloroethan e	Insecticide organochlori ne	50-29- 3	354.49											Carc. Cat. 3	T N R: 25-40-48/25- 50/53 S: (1/2-)22- 36/37-45-60-61	faible à très forte
Dieldrine	Insecticide organochlori ne	60-57- 1	380.91											Carc. Cat. 3	T+ N R: 25-27-40- 48/25-50/53 S: (1/2-)22- 36/37-45-60-61	faible à forte
Paraoxon	Insecticide organophos phoré	950- 35-6	247.14													
Chlorothalonil tetrachloroisop hthalonitrile	fongicide isophtalonitr ile (substitut du benzène)	1897- 45-6	265.9	0.00 1	4.37	4	16.1		<i>C. carpio</i> - CL50 = 0.076 mg.L ⁻¹ <i>O. mykiss</i> - CL50 = 0.038 mg.L ⁻¹ <i>D. magna</i> - CE50 = 0.084 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>O. mykiss</i> - CSEO = 0.003 mg.L ⁻¹ (21 jrs) <i>D. magna</i> - CSEO = 0.0085 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.2	0.01 5		Carc. Cat. 3	T+ R: 26-37-40-41- 43-50/53 S: 2-28- 36/37/39-45-60- 61	faible à modérée

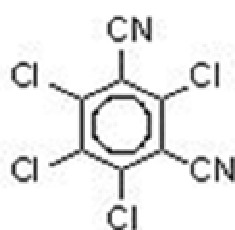
Fosetyl aluminium	Fongicide	39148-24-8	354.1	136	-2.1	2			<i>O. mykiss</i> - CL50 > 122 mg.L ⁻¹ (96h) <i>D. magna</i> - CE50 > 100 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>O. mykiss</i> - CSEO > 100 mg.L ⁻¹ (28 jrs) <i>D. magna</i> - CSEO = 17 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	296	3			Xi R: 41-48/22-51/53-26-39-61	
PCP	pesticide phénol chloriné	87-86-5	266.34	2					<i>O. mykiss</i> - CL50 = 1.71 mg.L ⁻¹ (96 hs) <i>D. magna</i> - CE50 = 76 mg.L ⁻¹ (48h)			0.003			Carc. Cat. 3 T+ N Xi R: 24/25-26-36/37/38-40-50/53 S: (1/2)-22-36/37-45-52-60-61	modérée à très forte
BaP	HAP	50-32-8	252.3	3.10-6			57-530	<i>D. magna</i> - CE50 > 2.7 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>O. mykiss</i> - CSEO = 2.4 µg.L ⁻¹ (36 jrs)	0.05	0.012			Carc. Cat. 2 Muta. Cat. 2 Repr. Cat. 2 T N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
Phénanthrène	HAP	85-01-8	178.23	0.0012			150	<i>O. mykiss</i> - CL50 = 0.25 mg.L ⁻¹ (7 jrs) <i>D. magna</i> - CE50 = 0.35 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO = 0.021 µg.L ⁻¹ (21 jrs)	1.34				Carc. Cat. 2 T R: 45 S: 53-45		
Fluoranthène	HAP	206-44-0	202.26	0.0026			50 à 1760	<i>D. magna</i> - CE50 = 0.017 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	<i>D. magna</i> - CSEO = 0.01 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.1	0.05					
Anthracène	HAP	120-12-7	178.23	0.00129				<i>D. magna</i> - CE50 > 25 µg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO = 2.1 µg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.063	0.04			Carc. Cat. 2 T R: 45 S: 53-45		
Pyrène	HAP	204-927-3	202.26	0.0013			1 à 10 ans	<i>D. magna</i> - CE50 = 24.6 mg.L ⁻¹ (48h)	<i>D. magna</i> - CSEO = 2.1 mg.L ⁻¹ (21 jrs)	0.012	0.5			Carc. Cat. 2 T R: 45 S: 53-45		
PCB 77 3,3',4,4'-tetrachloro-1,1'-biphenyl	PCB non coplanaire	32598-13-3	291.99													
PCB 153 2,2',4,4',5,5'-hexachloro-1,1'-biphenyl	PCB coplanaire	35065-27-1	360.88													

Annexe 1e : informations relatives aux polluants utilisés.

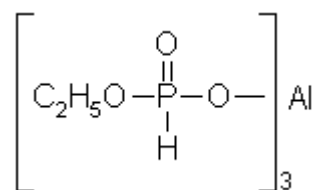




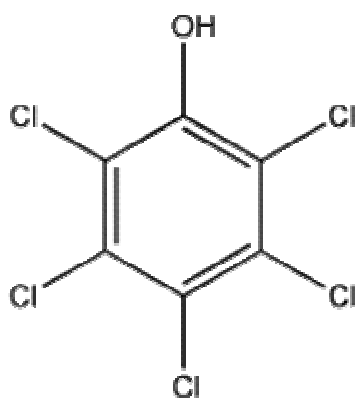
Paraoxon



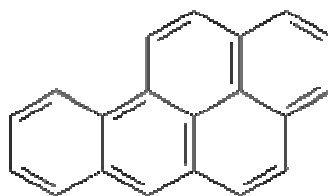
Chlorothalonil



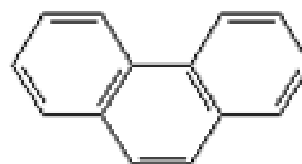
Fosteyl aluminium



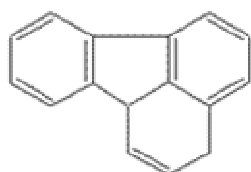
PCP



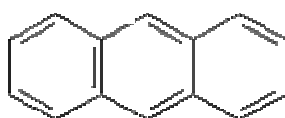
BaP



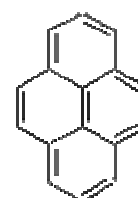
Phénanthrène



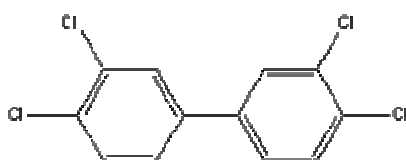
Fluoranthène



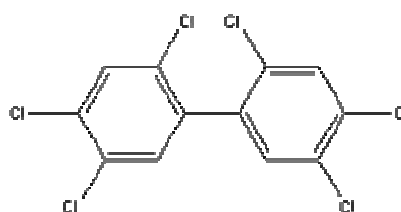
Anthracène



Pyrène

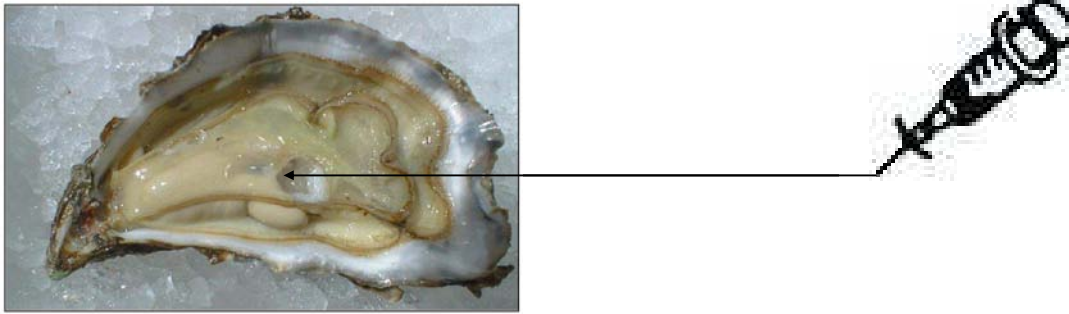


PCB 77

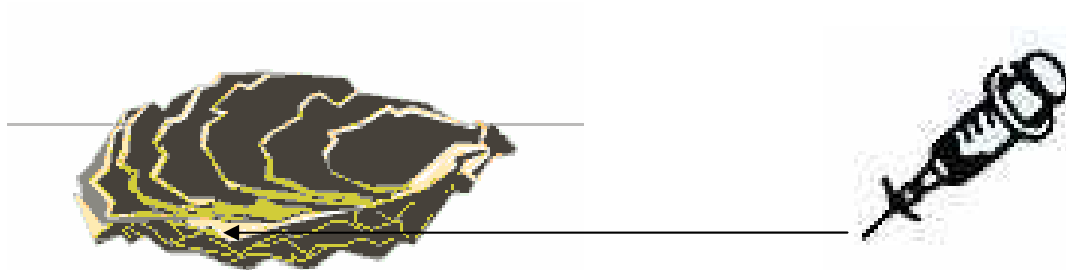


PCB 153

Annexe 1f : structure chimique des molécules utilisées.



Annexe 2a : prélèvement de l'hémolymphe dans la cavité péricardique.



Annexe 2b : prélèvement de l'hémolymphe dans le sinus du muscle adducteur postérieur.

Annexe 2 - Matériel et Méthodes

2.1. Animaux

Les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, utilisées provenaient de familles bi-parentales obtenues dans le cadre du projet MOREST (IFREMER) (Dégremont, 2003). Les huîtres étaient diploïdes. Ces huîtres ont servi aux expériences de la première, la deuxième et la troisième partie. Pour la première et la deuxième partie, les individus ont été produits en février 2002 et provenaient d'un mélange de familles « R » et « S ». Elles étaient âgées de 1 à 1.5 ans au moment des expériences et mesuraient de 7 à 10 cm. Pour la troisième partie, les individus ont été produits en février 2003 et provenaient des mélanges de six familles « R » entre elles et de trois familles « S » entre elles. Elles étaient âgées de 1.5 à 2 ans au moment des expériences pour une taille de 5-6 cm.

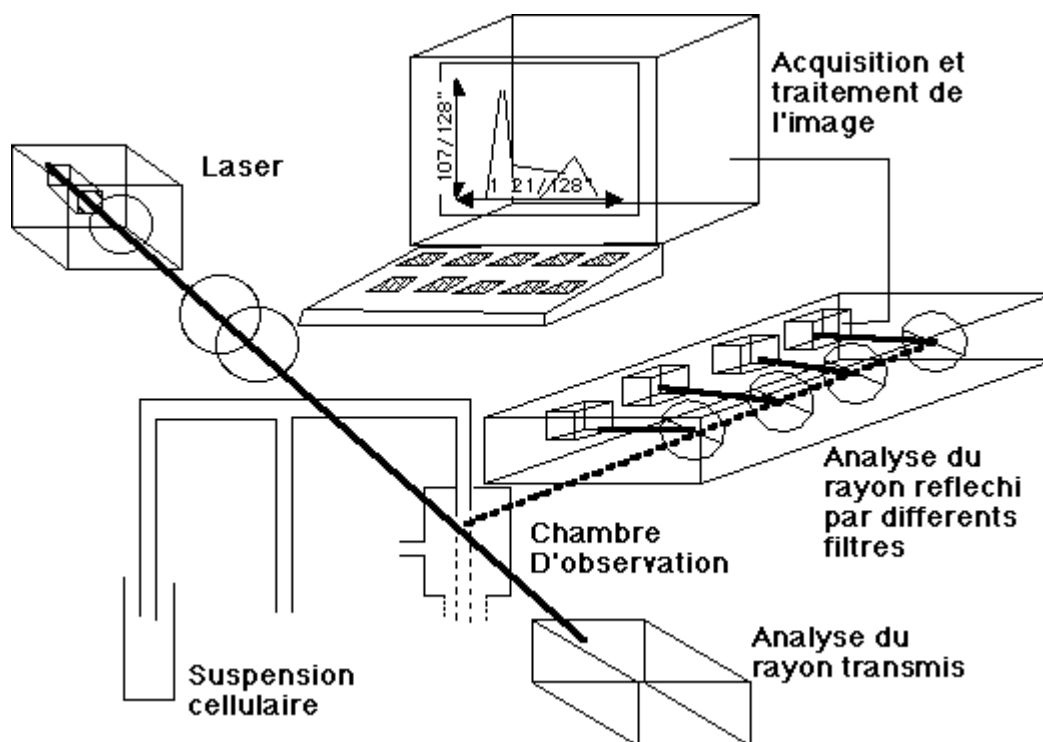
Toutes les huîtres ont été stockées en dégorgeoir à l'extérieur à la station IFREMER La Tremblade (Charente-Maritime).

2.2. Prélèvements d'hémolymphe

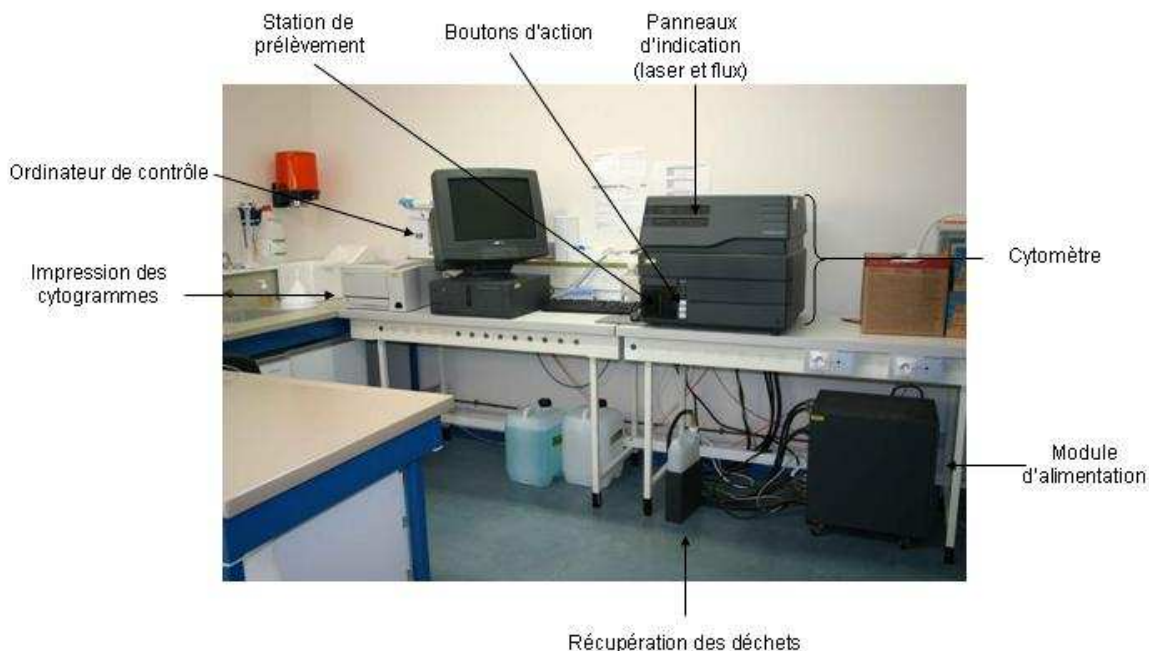
L'hémolymphe a été prélevée juste avant les expériences par ponction à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9X25 mm. Lors du prélèvement dans la cavité péricardique, l'huître a été précautionneusement ouverte au niveau de la charnière, puis l'hémolymphe a été directement ponctionnée dans la cavité péricardique (**Annexe 2a**). Entre 0,5 et 1 mL d'hémolymphe a été prélevé pour chaque huître. Lors du prélèvement dans le sinus du muscle adducteur postérieur, un trou a été percé dans la coquille à l'aide d'une pince au niveau du muscle (**Annexe 2b**). L'hémolymphe a été prélevée dans le muscle adducteur et entre 1 à 2 mL d'hémolymphe a été prélevé pour chaque huître. Quelque soit le type de prélèvement (cœur ou muscle), l'hémolymphe a ensuite été filtrée sur une maille de 60 µm et les hémocytes ont été conservés dans la glace le temps de réaliser les expériences de façon à éviter l'agrégation hémocytaire.

2.3. Traitement statistique des données

Les pourcentages obtenus pour les différents paramètres hémocytaires (phagocytose, estérases, EOR, lysosomes, granulocytes, mortalité) ont été transformés en utilisant la formule arcsinus (\sqrt{x}). Après cette transformation, les données suivaient la loi normale. Les ANOVAs, les matrices de corrélations et le modèle de régression multiple à sélection ascendante ont été réalisés avec le logiciel Statgraphics ® Plus Version 5.1. Après les ANOVAs, dans le cas du rejet de H_0 , un test LSD (Least Significance Difference) a été appliqué.



Annexe 2c : principe schématique du fonctionnement d'un cytomètre en flux.



Annexe 2d : composition du cytomètre de flux Beckman Coulter EPICS XL4 utilisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie (IFREMER La Tremblade).

2.4. Cytométrie en flux

Cette technique est née du besoin d'automatiser le comptage des constituants cellulaires du sang. En 1934, Moldovan conçoit le premier appareil qui réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photoélectrique. En 1949, W. Coulter mis au point un appareil qui associait la numération des cellules et la mesure de la taille par variation de la résistance du courant liquidien. Au cours des 35 dernières années, de nombreux progrès techniques ont conduit à la mise au point de méthodes de plus en plus fines pour analyser des populations hétérogènes.

2.4.1. 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 composante électronique qui sont gérées au moyen d'une interface informatique (Cram, 2002). L'appareil utilisé dans cette étude est un EPICS XL 4 (Beckman Coulter).

Le système fluidique permet d'entraîner la suspension cellulaire à l'intérieur de la chambre d'analyse. Le flux contenant la suspension cellulaire est entraîné passivement dans un second flux liquide coaxial (solution saline isotonique). Les deux flux sous pression arrivent conjointement dans la chambre d'analyse et entraînent les cellules alignées défilant à grande vitesse vers la source lumineuse (système optique). 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 volts. Le voltage maximal étant de 10.24 volts, 1024 canaux sont disponibles pour l'analyse des évènements (**Annexe 2c**).

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 réfléchiée 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) (**Annexe 2d**) possède quatre lentilles permettant de recueillir quatre plages de 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).

2.4.2. Protocoles utilisés

2.4.2.1. Taille/complexité

Sur le cytogramme obtenu pour la mesure de la mortalité cellulaire, il est possible de séparer deux populations en fonction de leur taille et de leur complexité. Ceci permet d'une part, d'éliminer les débris, et d'autre part, de séparer les hyalinocytes des granulocytes. Le pourcentage de granulocytes est retenu.

2.4.2.2. Mortalité cellulaire

Un volume de 10 μL d'iodure de propidium (**Annexe 5**) est ajouté à 200 μL d'hémolymphe. Une incubation de 30 minutes a été réalisée dans la glace à l'obscurité avant l'analyse.

2.4.2.3. Activité de phagocytose

Un volume de 10 μL de billes dilué au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution-mère dans de l'eau bidistillée (**Annexe 5**) de 1 μm de diamètre est ajouté à 200 μL d'hémolymphe. L'incubation est d'une heure à l'obscurité à température ambiante. Lorsque la concentration hémocytaire est de 10^6 cellules. mL^{-1} , le ratio final de billes/hémocytes est de 700/1.

2.4.2.4. Activité de type estérase

L'étude de l'activité de type estérase est réalisée avec un substrat liposoluble non spécifique : le diacétate de fluorescéine (FDA, **Annexe 5**). Un μL d'une solution de FDA à $400 \mu\text{M}$ dans du DMSO (**Annexe 5**) est ajouté à $200 \mu\text{L}$ d'hémolymphe (soit $C_f = 2 \mu\text{M}$). L'incubation est de 30 minutes à l'obscurité à température ambiante, puis la réaction a été arrêtée par un traitement de 5 minutes sur glace à l'obscurité.

2.4.2.5. Production d'EOR

L'étude de la production d'EOR a été réalisée par l'intermédiaire de la dihydrorhodamine 123 (**Annexe 5**). Le protocole consiste en l'ajout d' $1 \mu\text{L}$ d'une solution de DHR123 à 29 mM dans du DMSO (**Annexe 5**) dans $200 \mu\text{L}$ d'hémolymphe ($C_f = 145 \mu\text{M}$). Une incubation est réalisée à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes, puis la réaction est arrêtée par un traitement de 5 minutes sur glace à l'obscurité.

2.4.2.6. Présence de lysosomes

La présence de lysosomes peut être suivie en cytométrie de flux par l'utilisation d'un kit du commerce (LysoTracker®, **Annexe 5**). Le protocole consiste à ajouter $1 \mu\text{L}$ d'une solution de LysoTracker® à $500 \mu\text{M}$ dans du DMSO (**Annexe 5**) dans $200 \mu\text{L}$ d'hémolymphe ($C_f = 2.5 \mu\text{M}$). L'incubation est réalisée à l'obscurité à température ambiante pendant 2 heures, puis la réaction est arrêtée par un traitement de 5 minutes sur glace à l'obscurité.

2.5. Biologie moléculaire

2.5.1. Extraction d'ARN totaux des hémocytes

Le protocole suivi est celui indiqué sur la notice du TRIzol (**Annexe 5**). Tous les tubes utilisés sont autoclavés et les cônes doivent être stériles et dépourvus d'ADN et d'ARN (DNAse et RNAse free).

2.5.1.1. Homogénéisation

Centrifuger les hémocytes. Ajouter 1 mL de TRIzol pour 5-10 millions de cellules. Homogénéiser l'échantillon dans le TRIzol en faisant des allers-retours avec la pipette pour lyser les cellules.

2.5.1.2. Séparation de phase

Incuber 5 minutes à $15\text{-}30^\circ\text{C}$ pour permettre une dissociation des complexes nucléoprotéiques. Ajouter $200 \mu\text{L}$ de chloroforme isoamyl alcool (**Annexe 5**) par mL de TRIzol. Vortexer les tubes pendant 15 secondes. Incuber 2-3 minutes à $15\text{-}30^\circ\text{C}$. Centrifuger à $12\ 000 \text{ g}$ pendant 10 minutes ($2\text{-}8^\circ\text{C}$). L'échantillon est séparé en trois phases : la phase inférieure rose contenant le phénol-

chloroforme, une interphase et la phase aqueuse supérieure incolore contenant l'ARN (60 % du volume initial de TRIZOL).

2.5.1.3. Précipitation des ARN

Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube. Ajouter 500 µL d'isopropanol (**Annexe 5**) froid par mL de TRIZOL pour précipiter les ARN. Incuber 10 minutes à 15-30°C. Centrifuger à 12 000 g pendant 10 minutes à 2-8°C.

2.5.1.4. Lavage des ARN

Vider précautionneusement le surnageant : les ARN forment un culot souvent invisible à l'œil nu. Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 75 % par mL de TRIZOL puis centrifuger à 7 500 g pendant 5 minutes à 2-8°C.

2.5.1.5. Redissolution des ARN

Sécher rapidement le culot à l'air ou sous vide pendant 5-10 minutes. Ne pas centrifuger sous vide. Ne pas laisser le culot sécher complètement sinon sa solubilité diminue. Un ARN partiellement dissous aura un ratio $A_{260}/A_{280} < 1.6$. Dissoudre l'ARN dans de l'eau DEPC (**Annexe 3.7**) en faisant des allers-retours avec la pipette et incuber 10 minutes à 55-60°C (optionnel). Mesurer en DO le rapport A_{260}/A_{280} : seuls les ARN ayant un rapport de DO compris entre 1.8 et 2 sont de bonne qualité.

2.5.2. Gel d'électrophorèse

Gel à 1 % d'agarose dans TAE 1X

BET : 5 µL pour 50 mL de TAE 1X

Bleu de charge : 1 µL pour 5 µL d'échantillon

Echantillon : 5 µL

Marqueur de taille : 5 µL

Migration : 120 Volts pendant 45 minutes

2.5.3. Traitement des ARN à la DNase et précipitation des sels

2.5.3.1. Traitement à la DNase

Dans un tube Eppendorf RNase-free et sur glace, ajouter 10 µg d'ARN totaux, 4 µL de tampon de réaction 10X, 10 µL de DNase I (1 unité.µL⁻¹) (**Annexe 5**) et de l'eau distillée (q.s.p. 40 µL). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 5 µL de solution STOP (**Annexe 5**). Chauffer à 70°C pendant 10 minutes. Refroidir sur glace.

2.5.3.2. Précipitation des sels

Ajouter $1/10^{\text{ème}}$ de volume final d'acétate de sodium (**Annexe 5**). Ajouter ensuite 3 volumes d'éthanol absolu froid. Agiter. Incuber 15 minutes à -80°C . Centrifuger à 7 500 g pendant 15 minutes à 4°C . Enlever le surnageant. Laver 2 fois en éthanol absolu (centrifugation). Reprendre le culot dans de l'eau ultra pure pour biologie moléculaire (**Annexe 5**). Le volume est calculé en fonction des besoins de l'échantillon.

2.5.4. Protocole de Transcription Reverse (RT)

Pour chaque groupe d'échantillons (T/P ou T/c1/c2), la quantité d'ARN traitée à la DNase et soumise à la RT était identique pour T et P ou T, c1 et c2.

2.5.4.1. Mix RT pour 1 μg d'ARN et 25 μL final

Eau distillée RNase free (**Annexe 5**).....q.s.p. 25 μL soit 25 μL – (10 μL de pré-mix + V_{matrice})

Tampon MMLV + D.T.T (**Annexe 5**).....7.5 μL

Rnasine (**Annexe 5**).....0.375 μL

DNTPs (**Annexe 5**).....1.0 μL

Oligo dT (**Annexe 5**).....0.5 μL

MMLV (**Annexe 5**).....0.625 μL

$$V_{\text{mix}} = 10 \mu\text{L}$$

Matrice.....volume nécessaire pour 1 μg d'ARN totaux, mais q.s.p. 15 μL

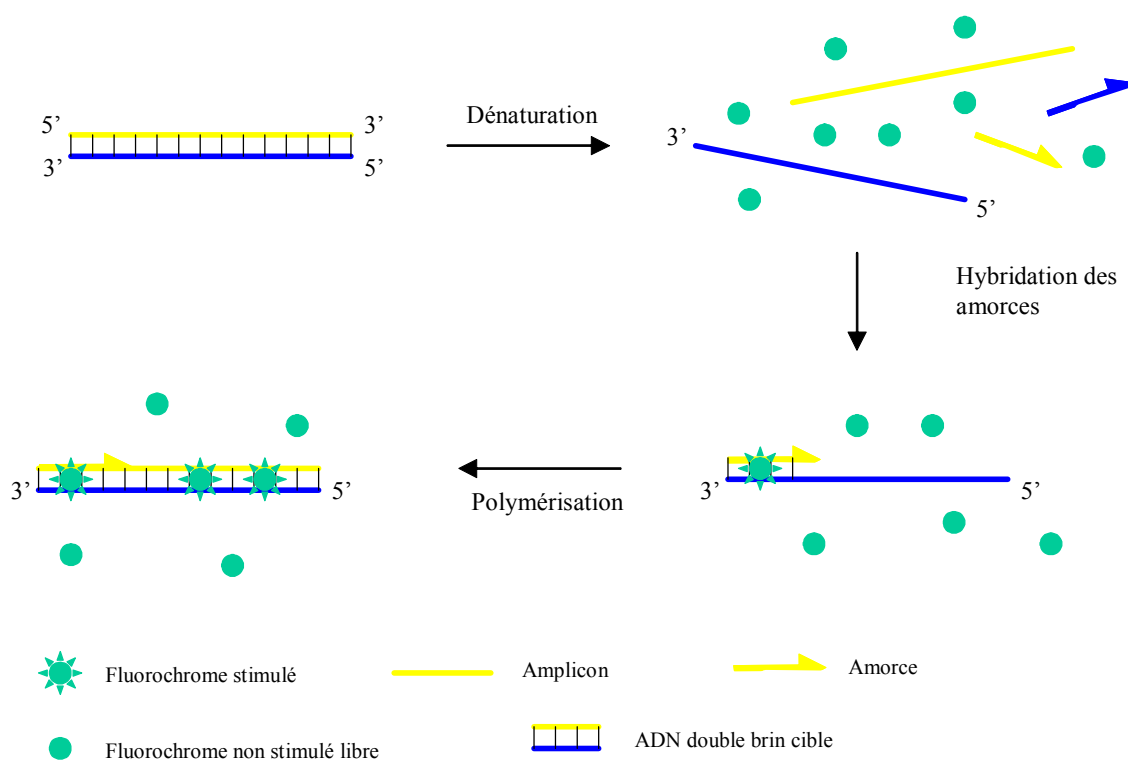
$$V_{\text{f}} = 25 \mu\text{L}$$

2.5.4.2. Réalisation de la RT

- Dans des tubes PCR ou sur plaque, sur glace :
- Déposer le volume d'eau distillée calculé d'après celui de la matrice
- Déposer la matrice
- Dénaturer 10 minutes à 70°C au Bain-Marie
- Mettre sur glace immédiatement
- Centrifuger rapidement
- Ajouter le pré-mix (10 μL) et mélanger sans ajouter d'huile
- Centrifuger rapidement

2.5.4.3. Cycles de RT

Soit à l'appareil de PCR, soit aux Bain-Marie, respecter les cycles suivants : 15 minutes à 25°C , 50 minutes à 42°C et 5 minutes à 94°C . Mettre sur glace immédiatement, centrifuger et conserver au réfrigérateur.



Annexe 2e : modèle d'action des fluorochromes de type SYBRGreen utilisés en PCR en temps réel (Poitras & Houde, 2002).

2.6. PCR en temps réel

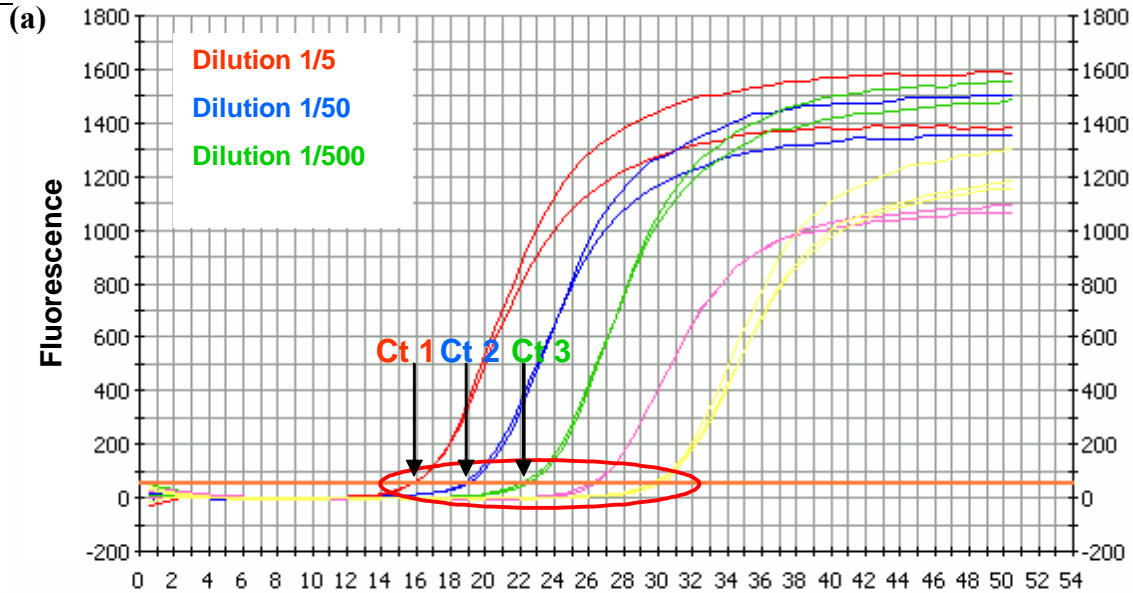
2.6.1. Principe de la technique

La PCR en temps réel, initialement mise au point par Russel Higuchi, est une technique d'amplification de l'ADN qui permet de quantifier et de caractériser l'amplicon formé en temps réel, grâce à l'utilisation d'un marquage fluorescent (« reporter ») du produit formé. La PCR en temps réel permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé (house-keeping gene) ou une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à un standard externe (Poitras & Houde, 2002). La quantité de transcrits d'un gène déterminée par cette technique représente l'expression du gène, les transcrits en cours de synthèse, mais aussi les transcrits déjà formés et stockés dans les cellules. La détection de la quantité d'amplicons peut se faire par des agents non spécifiques se liant à l'ADN double brin, par exemple le SYBR Green I qui a été utilisé dans cette étude ou par des sondes fluorescentes spécifiques comme les sondes Taqman ou les « Molecular Beacons » (Poitras & Houde, 2002).

L'émission de fluorescence des molécules comme le SYBR Green I augmente lorsqu'ils se lient à l'ADN double brin. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lors du suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation, puis ce signal diminue lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'émission de fluorescence est donc mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (**Annexe 2e**).

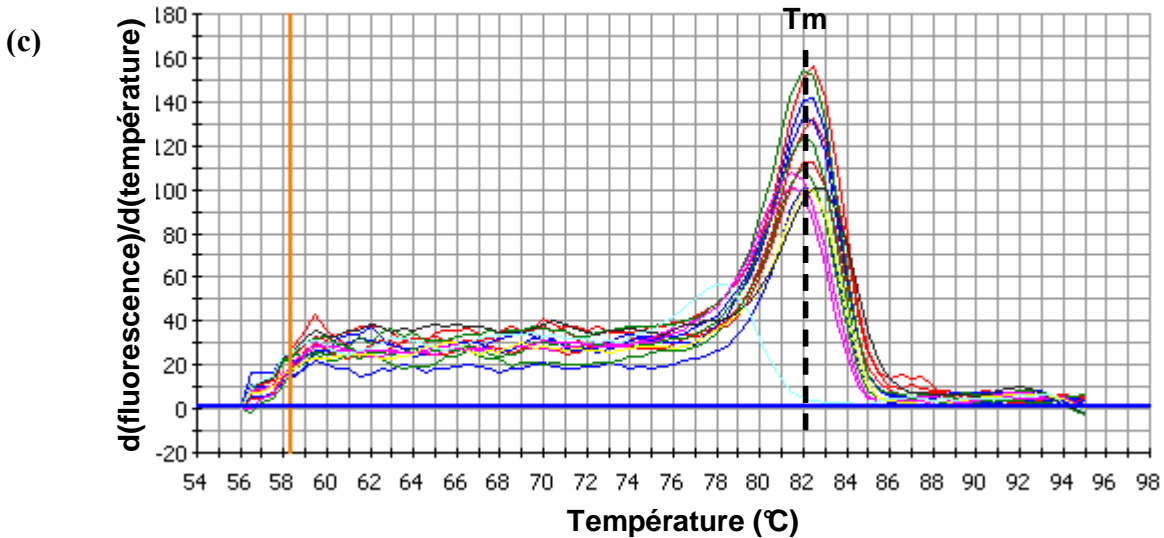
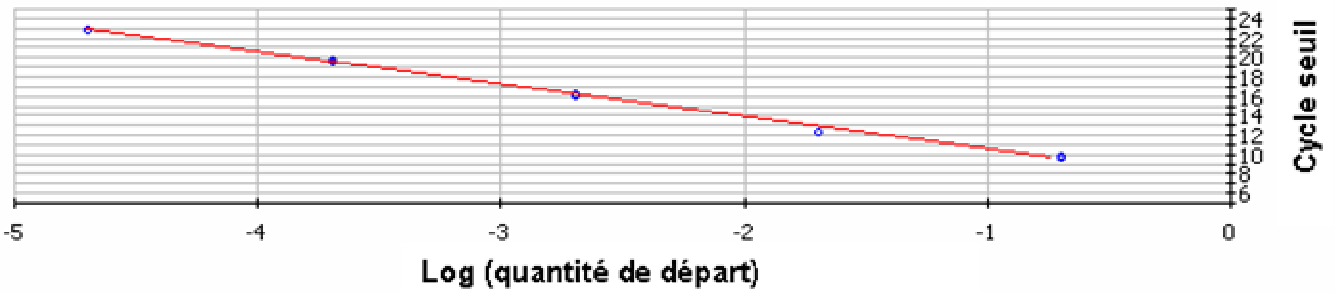
L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. L'analyse de la quantité d'amplicons formés se fait pendant la phase exponentielle de la PCR. En effet, pendant cette étape, le nombre de copies d'amplicons observé est directement proportionnel au nombre initial de copies. Plus il y a de matrice au départ de la réaction et moins le nombre de cycles nécessaires pour entrer dans la phase exponentielle est élevé. Le point où la fluorescence dépasse significativement le bruit de fond, *i.e.* où la phase exponentielle débute, est défini comme le seuil cycle ou Ct (Gibson *et al.*, 1996) (**Annexe 2f a**).

Pour chaque couple d'amorces utilisé, l'amplification d'une gamme de dilution d'un échantillon d'ADNc doit être réalisée pour vérifier que l'efficacité de la PCR ($E = 10^{(-1/\text{pente})}$) est comprise entre 99 % et 100 % et pour déterminer la dilution à laquelle il faut travailler (**Annexe 2f b**). La



(b) Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.322 Intercept: 7.274 $Y = -3.322 X + 7.274$ PCR Efficiency: 100.0 %

Legend: ■ Unknowns ● Standards



Annexe 2f : courbes d'amplification d'ADNc par PCR en temps réel : exemple de l'amplification d'une gamme de dilution d'un échantillon (a). Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles pour lequel le signal d'émission de fluorescence est plus élevé que la ligne de base (bruit de fond) ; droite de régression des cycles seuils de chaque point de gamme, calcul de l'efficacité de PCR (b) ; courbe de fusion : le pic de la courbe de fusion correspond au T_m de l'amplicon (c).

concentration de travail ne doit être ni trop forte pour éviter l'inhibition de la réaction de PCR, ni trop faible pour ne pas être en dessous du seuil de détection. A la fin de la PCR, une courbe de fusion est réalisée entre 95°C et 70°C en descendant de 0.5°C toutes les 10 secondes de façon à suivre la renaturation des amplicons à chaque palier de température (**Annexe 2f c**). Cette courbe unimodale permet de définir le T_m de l'amplicon (température de fusion), *i.e.* la température à laquelle les deux brins de l'amplicon s'hybrident. Le T_m est spécifique d'un amplicon et renseigne sur sa composition. La courbe de fusion permet également de détecter la présence éventuelle de dimères d'amorces qui peuvent biaiser les résultats de quantification, dans ce cas, la courbe de fusion est bimodale.

Les amorces utilisées pour la PCR en temps réel doivent remplir des conditions précises : les amplicons définis par ces amorces doivent être de petite taille (90-120 bp) ; le nombre de bases G et C doit être supérieur à 50 % ; les répétitions de nucléotides doivent être évitées (pas plus de 3 consécutifs) ; les amorces ne doivent pas être complémentaires pour ne pas créer des dimères d'amorces lors de la réaction de PCR ; le T_m des amorces doit se situer autour de 60°C et il ne doit pas différer de plus d'1°C entre deux amorces d'un même couple.

Le calcul de la quantité de transcrits d'un gène dans un échantillon utilisée dans cette étude est basé sur la méthode de comparaison des Ct. La quantité relative de l'expression du gène d'intérêt (gène cible) dans un échantillon est normalisée par l'expression d'un gène de référence et relative à un échantillon contrôle. La quantité relative de transcrits d'un gène cible dans un échantillon donné est exprimée par la formule des $\Delta\Delta Ct$, où $\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{contrôle}}$ pour le gène cible et le gène de référence, et $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gène cible}} - \Delta Ct_{\text{gène de référence}}$. Les quantités relatives de gène cible (rapportées au gène de référence) sont des valeurs sans unité.

2.6.2. Mise au point de la technique pour cette étude

La gamme de dilution réalisée pour mesurer l'efficacité de PCR de chaque couple d'amorces comportait les cinq points de dilution suivants : 1/5, 1/50, 1/500, 1/5 000, 1/50 000.

Trois gènes de référence, le facteur d'élongation I (*fElongI*) (Gueguen *et al.*, 2003), la sous-unité ribosomale 18 S et l'actine (Cadoret *et al.*, 1999), ont été utilisés sur les échantillons. Sur chaque plaque, deux gènes de référence ont été testés afin de choisir celui dont l'expression était la plus constante dans le cadre de l'expérience considérée.

Les amorces utilisées pour amplifier les gènes candidats et les gènes de référence ont été dessinées avec le logiciel « primer3 » (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) puis fabriquées par l'entreprise Eurogentec.

Nom du gène	Séquence 5' - 3' des amorces		Nombre de bases	Efficacité de PCRq des amorces	E value	Espèce	Numéro d'accession GenBank	Référence
Ficoline 3	forward	Gca aag gct gtg ttc tgt ga	20	2.009	5e ⁻¹¹	<i>Halocynthia roretzi</i>	BQ426875	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Ctt gta atc cgt cca gtt acg g	22					
Galectine 4	forward	Aga aca gac cta cca tgc cac t	22	2.01	8e ⁻¹⁶	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	BQ426390	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Atc cgt ctt gtc cag agc ac	20					
LBP/BPI I	forward	Acg gca cag aac gga tct ac	20	1.983	4e ⁻⁵³	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AY165040	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Tgg ttg aca tgg ttg ctg ac	20					
LPS/β-1,3-glucan	forward	Tgc ggt gaa ctc tga ctt gt	20	2.009	8e ⁻⁴⁹		CB617438	Boutet <i>et al.</i> , 2004
	reverse	Aat gta gct gtg gga ggt gtg	21					
Vav-3 oncogene homologue	forward	Gcg ttg act ggc tgg tta g	19	2.004	5e ⁻³⁹	<i>Homo sapiens</i>	BQ427355	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Gca ctc cat ctc gca aag tt	20					
Importine α	forward	Acg cag cag att gaa cga c	19	1.989	3e ⁻³⁰		CB617497	Boutet <i>et al.</i> , 2004
	reverse	Gca gga gac agt gca gaa tg	20					
ECSIT	forward	Gtg tga ttc cgg atg agg ag	20	1.908	2e ⁻¹⁹	<i>Drosophila melanogaster</i>	BQ427193	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Act tgg gca tcc agt aca gc	20					
protéine DOCK 180	forward	Caa cga ctc cgt tca aca ac	20	1.997	8e ⁻³⁷	<i>Homo sapiens</i>	BQ426954	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Cgc tgg aaa caa cga aca	18					
c-Src kinase	forward	Aca aca gga ggc tga agg tg	20	2.004	4e ⁻²⁴	<i>Xenopus laevis</i>	BQ426966	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Gtg tgg cgt gtt tca tgg t	19					
Ankyrine brank-2	forward	Gtt cgg agc taa cgt gaa cc	20	1.985	e ⁻¹²	<i>Homo sapiens</i>	BQ426701	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Tag ctg gac gat cag gga gt	20					
Cofiline	forward	Cgt ggg tga cgg ata gtc tt	20	1.985	9e ⁻²⁰	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	BQ426293	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Tca gtg gcg tgg tta cac tg	20					
Filamine	forward	Gtg acc ttt gat ggc tgt ga	20	1.99	5e ⁻¹¹	<i>Homo sapiens</i>	BQ426716	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Ggt acg aag tcc gtc tcc tg	20					
Protéine Rho	forward	Agc aaa gac cag ttc cca ga	20	2.002	e ⁻¹⁰³	<i>Aplysia californica</i>	BQ426365	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Ccc ata atg cca act caa cc	20					
Isocitrate déshydrogénase	forward	Ccg acg gaa aga ctg tgg	18	1.99	e ⁻¹⁷⁴	<i>Danio rerio</i>	AY551096	Huvet <i>et al.</i> , 2004
	reverse	Ctg gct acc ggg ttt gtg	18					
Précurseur de Cathepsine L	forward	Cca gcc aga agc tgt agt cc	20	2.134	e ⁻¹²		CF369221	Boutet <i>et al.</i> , 2004
	reverse	Gag cgg aag acg aag cta ga	20					
TIMP	forward	Att gcc gtg gtg aga act g	19	1.995	e ⁻¹¹⁸	<i>Crassostrea gigas</i>	BQ427105	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Tag cgt agc agt cgt tgg tg	20					
similaire à SOD	forward	Atg tca cag gaa cgg tcc a	19	2.015	2e ⁻⁵⁹	<i>Mus musculus</i>	BQ426796	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Tcc atg ctg tcc agg tgt ta	20					
similaire à Lysozyme	forward	Gca gcc gga ttc aac ct	17	1.996	8e ⁻¹⁹		AB179775	Nakamura <i>et al.</i> , non publié
	reverse	Cgt tgt ggt ctt tgc ttc ac	20					
Défensine	forward	Tgt cct tct gat ggt ttc tgc	21	2.007			non déposé	
	reverse	Gcc cgc tct aca act aat gg	20					
sous-unité ribosomale 18S	forward	Caa ctg tgg gat ggt acg tg	20	1.983			AB064942	Itoh <i>et al.</i> , non publié
	reverse	Gcc ttc ctt gga tgt ggt ag	20					
Facteur d'élongation I	forward	Acc acc ctg gtg aga tca ag	20	2.014	e ⁻¹¹⁰	<i>Dreissena polymorpha</i>	BQ426516	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	reverse	Acg acg atc gca ttt ctc tt	20					
Actine	forward	Gcc ctg gac ttc gaa caa	18	2.002		<i>Crassostrea gigas</i>	AF026063	Cadoret <i>et al.</i> , 1999
	reverse	Cgt tgc caa tgg tga tga	18					

Annexe 2g : informations relatives aux gènes sélectionnés pour l'analyse en PCR en temps réel.

Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicat pour chaque échantillon avec 5 µL d'ADNc (dilué au 1/10) dans un volume total de 15 µL. Le mélange de réaction était composé de : 0.5 µL de chaque amorce à 10 µM, 1.5 µL d'eau distillée et 7.5 µL de « iQTM SYBR® Green supermix » 2X (**Annexe 5**) comprenant une enzyme *Taq* polymérase, de la fluorescéine, un fluorochrome (SYBR Green I), des dNTPs ainsi que les différents tampons et autres composés nécessaires à la réaction. La fluorescéine permet d'avoir un contrôle interne de la fluorescence. Le programme de PCR utilisé était le suivant : activation de la *Taq* polymérase pendant 1 min 30 à 95°C, 40 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 sec à 95°C et une phase d'hybridation-élongation de 1 min à 60°C. Chaque réaction de PCR incluait : (1) un échantillon d'ADNc contrôle commun à toutes les réactions (témoin de plaque), (2) un contrôle négatif d'ARNm total traité à la DNase par échantillon qui permet de détecter toute trace de contamination des échantillons par de l'ADN génomique et (3) un blanc (eau distillée) pour détecter les contaminations possibles du mélange réactionnel et les dimères d'amorces. Un plan de plaque a été défini pour chacune des réactions. Dans cette étude, les analyses ont été réalisées avec un appareil Icyler (BioRad). Les résultats d'amplification (courbes d'amplification, valeurs de cycles seuil (Ct), courbes de fusions) ont été analysés avec le logiciel iCyclerTMiQ, Optical System Software, v. 3.0a (BioRad).

2.6.3. Gènes sélectionnés

Parmi les 25 gènes identifiés comme susceptibles d'être impliqués dans la phagocytose (cf troisième partie, IV.2.3), l'expression de 19 gènes a été suivie en PCR en temps réel dans les ARN des animaux témoins et contaminés (**Annexe 2g**). Pour chaque couple d'amorces, les courbes de fusion obtenues étaient unimodales et aucune amplification des blancs (eau) ni des témoins ARNm n'a été détectée. Les produits de PCR ont été analysés par PCR-RFLP (**Annexe 2.7**).

2.6.4. Analyse des données

Les résultats ont été analysés avec le logiciel REST-384 © (Relative Expression Software Tool), qui permet de comparer deux traitements entre eux en pondérant l'expression des gènes cibles par un gène de référence (<http://www.gene-quantification.de/rest-384.html>). Le modèle mathématique est basé sur la correction par les efficacités de PCR exactes et la déviation de la moyenne du point de croisement (« mean crossing point deviation ») entre l'échantillon et le témoin, comme représenté sur l'équation 1.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta Ct_{\text{cible}}(\text{contrôle} - \text{échantillon})}}{(E_{\text{référence}})^{\Delta Ct_{\text{référence}}(\text{contrôle} - \text{échantillon})}} \quad (1)$$

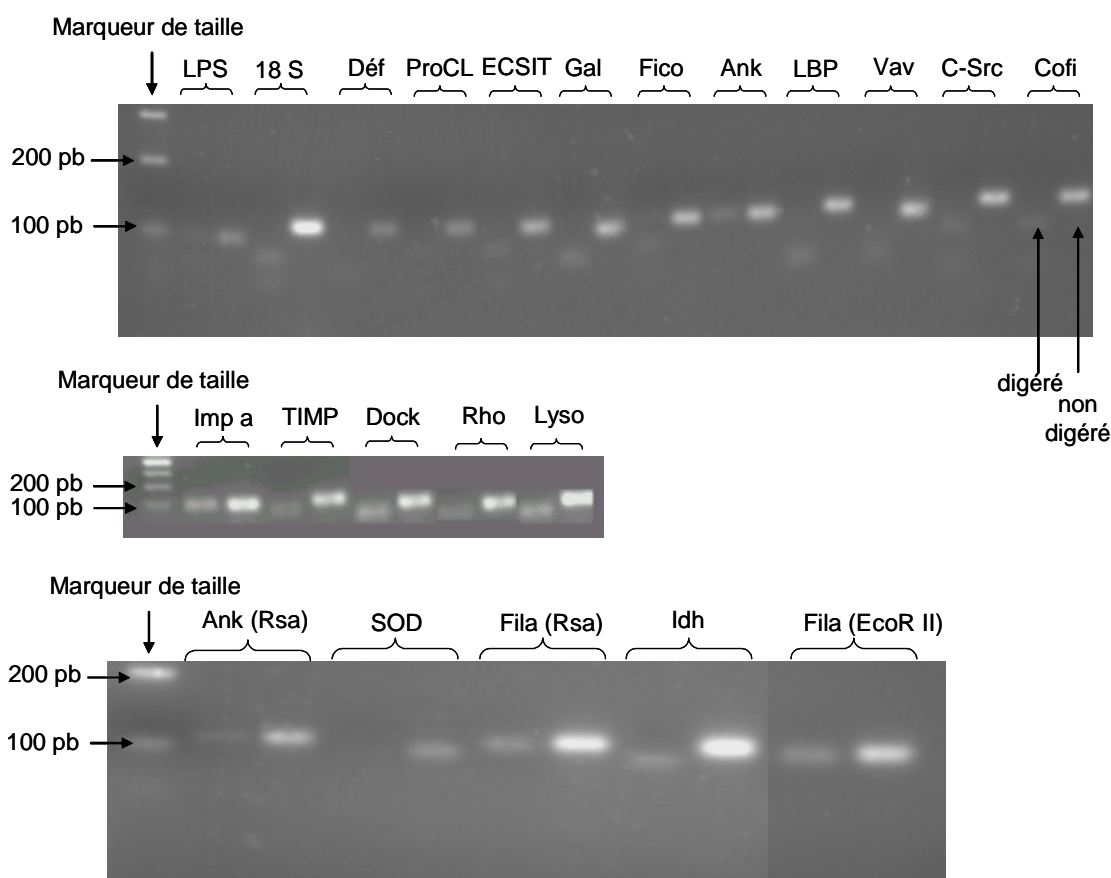
Le ratio d'un gène cible est exprimé dans un échantillon *versus* un contrôle en comparaison avec un gène de référence. E_{cible} est l'efficacité de PCRq du transcrite du gène cible ; $E_{\text{référence}}$ est l'efficacité de PCRq du transcrite du gène de référence ; ΔCt_{cible} est la déviation du Ct entre le contrôle et l'échantillon pour le transcrite du gène cible ; $\Delta Ct_{\text{référence}}$ est la déviation du Ct entre le contrôle et l'échantillon pour le transcrite du gène de référence (Pfaffl, 2001).

Les différences d'expression entre l'échantillon contrôle et l'échantillon traité sont testées statistiquement par le « Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test © ». Les tests de permutation aléatoire représentent une alternative utile à la majorité des tests paramétriques pour analyser des données expérimentales. Ils présentent l'avantage de ne faire aucune hypothèse de distribution statistique des données, tout en étant aussi puissants que la plupart des tests standards (Pfaffl *et al.*, 2002).

Le test de permutation aléatoire réassigne simultanément les valeurs de Ct observées pour les gènes de référence et les gènes cibles dans les deux groupes (témoin et traité) pour chaque échantillon à maintes reprises et de manière aléatoire et note à chaque fois l'effet apparent (le ratio d'expression, calculé sur la base de la moyenne des valeurs). La proportion de ces effets, qui sont très proches de ceux réellement observés dans les expériences, donne la valeur de P du test. Si 2 000 ou plus de permutations aléatoires sont effectuées, l'estimation de la valeur de P est correcte ($SE < 0.005$ à $P = 0.05$) (Pfaffl *et al.*, 2002).

Gène recherché	Enzyme de restriction	Tampon	Température	Taille attendue du produit non digéré	Tailles attendues des fragments du produit digéré		Digestion
LPS	Msp I	B	37°C	93	32	61	oui
18 S	Msp I	B	37°C	112	70	42	oui
Défensine	Msp I	B	37°C	106	51	55	oui
Pro Cathepsine L	Sau3A I	B	37°C	105	74	31	oui
Ecsit	Sau3A I	B	37°C	105	32	73	oui
Galectine 4	Sau3A I	B	37°C	99	43	56	oui
Ficoline	Sau3A I	B	37°C	108	71	37	oui
Ankyrine	Sau3A I	B	37°C	91	79	12	non
	Rsa I	C	37°C	91	63	28	non
Filamine	Rsa I	C	37°C	108	106	2	?
	EcoR II	tampon spécial	37°C	108	70	38	non
SOD	EcoR II	tampon spécial	37°C	95	36	45	14
LBP	Hha I	C	37°C	115	58	57	oui
Vav	Alu I	B	37°C	105	49	56	oui
c-Src	Alu I	B	37°C	119	84	35	oui
Cofiline	Hinf I	B	37°C	118	83	35	oui
Importin alpha	Hinf I	B	37°C	109	32	31	46
TIMP	Hae III	C	37°C	96	63	33	oui
Dock	Rsa I	C	37°C	105	38	67	oui
Rho	Taq I	E	65°C	100	56	44	oui
Lysozyme	Taq I	E	65°C	120	73	47	oui
Isocitrate dh	Taq I	E	65°C	103	17	86	oui

Annexe 2h : enzymes de restriction utilisées pour chacun des produits de PCR avec les températures et les tampons d'incubation utilisés.



Annexe 2i : gel d'électrophorèse des produits de PCR pour les 19 gènes cibles et un gène de référence. Pour chaque gène, le dépôt de gauche est le produit digéré par les enzymes de restriction, le dépôt de droite est le produit non digéré.

2.7. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

2.7.1. Principe général de la RFLP

Cette technique permet de montrer la spécificité du produit obtenu après amplification par PCR en temps réel. Des enzymes de restriction sont utilisées pour couper la séquence d'intérêt en des sites précis et donner naissance à des fragments de taille inférieure à celle du produit non digéré.

Le logiciel « BioEdit Sequence Alignment Editor » permet d'analyser des séquences connues selon les amorces utilisées et de déterminer la carte de restriction de ces fragments obtenus par PCR s'ils sont spécifiques. Les différents sites de coupure des enzymes de restriction présents sur le fragment d'intérêt sont ainsi obtenus.

2.7.2. Application à l'étude

Les produits de PCR obtenus pour chacun des 19 gènes cibles et pour l'ARN 18 S ont été digérés par différentes enzymes (**Annexe 2h**). Les produits de PCR de l'actine et du facteur d'élongation ont été séquencés par le LPI de Brest et ont été validés.

Pour chaque réaction, les volumes suivant ont été placés dans un tube pour PCR décontaminé aux UV : 5 µL de produit de PCR, 2 µL de tampon, 1 µL d'enzyme et 12 µL d'eau ultra pure (**Annexe 5**). Les tubes ont été incubés pendant 1 heure. Les produits ont été déposés sur un gel d'agarose 2 %.

2.7.3. Résultats

Pour une grande majorité de produits de PCR digérés avec les enzymes de restriction, les tailles des fragments attendus sont observées sur le gel (**Annexe 2i**). Seules l'ankyrine et la filamine ne semblent pas avoir les fragments attendus, bien que deux enzymes de restriction aient été testées pour chacun de ces gènes. Il faudrait essayer d'autres enzymes et séquencer ces produits pour avoir la confirmation que ce sont bien les gènes recherchés. Pour les autres gènes, les produits obtenus correspondent aux gènes recherchés.

Nom	Séquence 5' - 3' des amorces	Nombre de bases	Taille attendue	Taille	MgCl2 (mM)	Température (°C)	E value	Espèce	Numéro d'accèsion GenBank	Référence
G-protein coupled receptor 48	f CCGTGTTCGGAATCTCTAC	20	226	OK + bandes	2; 3	50	8e ⁻¹⁵		CB617400	Boutet <i>et al.</i> , 2004
	r GCAAACGCAAAGTCTCAAT	20								
Galectine 8	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		171	OK faible	2; 3	55	e ⁻¹⁵	<i>Mus musculus</i>	BQ427054	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
Importine B	f CCGTCTTTGGTGTAGTACGA	20	191	OK faible	2; 3; 4	55	3e ⁻⁶⁶	<i>Homo sapiens</i>	BQ426765	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	r CCCTTTCAATCCCTGTACGA	20								
cdc-like kinase	f GCACCAGACGAGATCAAAACA	20	238	OK	2	50	7e ⁻⁵⁴		CB617496	Boutet <i>et al.</i> , 2004
	r ATTCCAGACGCATGACAACA	20								
α-2-macroglobuline	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		199	OK	4; 5	55	3e ⁻²⁰	<i>Limulus sp.</i>	BQ426790	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
α-N-Acétyle Cystéine	f ACGGCTTTTGATCTGGACAC	20	182	OK + bandes	2	55	4e ⁻³⁸	<i>Mus musculus</i>	CD526829	Tanguy <i>et al.</i> , 2004
	r GCCGTGAGAAATTCAGAC	20								
Actine cytosquelettique	f TGTGGATCAGCAAACAGGAG	20	172	OK	2; 3; 4	50; 55	4e ⁻¹³	<i>Lytechinus pictus</i>	BQ426419	Gueguen <i>et al.</i> , 2003
	r TTGATGGCCAGAAGGTCTTT	20								
18S amorce universelle	f ggaattgacggaagggcacc	20	512	OK	2; 3; 4; 5; 6	50; 55; 60	-	-	-	Le Roux <i>et al.</i> , 1999
	r acggcggtgtgtacaaagg	20								
28S	f aagggcaggaaaagaaactaac	22	350	OK	2; 3; 4; 5; 6	55			AB105362	Hosoi <i>et al.</i> , 2004
	r ttccctctaagtgtttcac	21								
Ficoline 3	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		193	OK faible	2	55				
Galectine 4	f ATTTGCGTACGAAACGCTCT	20	189	OK	2	55				
	r CTTGCCCTCTGAAGTCTG	20								
LBP/BPI 1	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		221	OK faible+ bandes	2; 6	55				
LPS/β-1,3-glucan	f TTCAGGGTTTAGGGTAGGG	20	162	non						
	r GGGAGAAGTGGACAAAACCA	20								
Vav-3 oncogene homologue	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		199	OK faible	2; 3; 4; 5	55				
Importine α	f GTTCTGCCGAGATGTTTGT	20	165	non						
	r GAACCTGAGGACGCTTCGAC	20								
ECSIT	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		227	OK faible	2	60				
protéine DOCK 180	f TGGGCACACATGATTGAGAT	20	164	OK faible	2; 3; 4; 5; 6	55				
	r CAGGCGAAAGGTTTCAGAAG	20								
c-Src kinase	f TGACAGCTGACATTGGGAAA	20	235	OK faible	5; 6	50				
	r TATGCATGCCATCGAACATT	20								
Ankyrine brank-2	f CAATTTCGAAGTGGGATGTT	20	236	OK faible	2	50				
	r TGCAACATCGAACTGGTCAT	20								
Cofiline	f AAGCGACGACTTCAAGGAAA	20	202	OK	2	50				
	r CGTCACCCACGTGATAAAGA	20								
Filamine	f GTGGCAGCACTTCAACAGAA	20	248	OK	2	55				
	r ACCCTGAATGGACTGTCTGG	20								
Protéine Rho	f AGCAAAGACCAGITCCCAGA	20	159	OK	2	55				
	r GTCTGTGTCGGGGTAGGAGA	20								
Isocitrate déshydrogénase	Mêmes séquences que pour la PCRq			OK faible	2; 3; 4; 5	55				
Précurseur de Cathepsine L	f CGGAACTCCTCATTGGTCAT	20	155	non						
	r AAGCAGTATGGAGCGGAAGA	20								
TIMP	f GATGAGCAGTACAACCTCC	20	212	OK faible	2; 4; 6	55				
	r GGTCTGTGTCGGATTCAATG	20								
similaire à SOD	f TAACACCTGGACAGCATGGA	20	211	OK faible	2; 4; 6	55				
	r CCTGCCAAGTCGATCATTTT	20								
similaire à Lysozyme	f ACACAGTTAGTGGCGCTGGT	20	192	non						
	r TTTCTCGACATGTTTGAG	20								
Défensine	Amorces développées par Tirape <i>et al.</i> (manuscript en préparation)		297	OK faible	3; 4	65				

Annexe 2j : informations relatives aux gènes sélectionnés pour l'étude en RT-PCR semi-quantitative. f : forward, r : reverse.

	Volume (µL)	Concentration finale
Tampon AMV/ <i>Tfl</i> 5X	10	1X
dNTP mix (10 mM de chaque)	1	0,2 mM
MgSO ₄ (2.5 mM)	2	0.05 mM
AMV Reverse Transcriptase (5 u.µL ⁻¹)	1	0,1 u.µL ⁻¹
<i>Tfl</i> DNA polymerase (5 u.µL ⁻¹)	1	0,1 u.µL ⁻¹
Eau exempte de nucléase	30	
Volume final	45	

Annexe 2k : préparation du mix réactionnel pour la RT-PCR (en bleu : paramètre optimisé).

2.8. Suivi de l'expression de gènes en RT-PCR semi-quantitative

2.8.1. Principe

Trente gènes d'intérêt ont été suivis en RT-PCR semi-quantitative. Un gène témoin codant pour la sous-unité ribosomale 18 S universelle (gène cas) (Le Roux *et al.*, 1999) dont l'expression est homogène dans les deux populations d'ARN a également été suivi afin d'effectuer les comparaisons (**Annexe 2j**).

Des amorces spécifiques de ces gènes ont été dessinées avec le logiciel « primer3 » puis fabriquées par l'entreprise Eurogentec.

Les analyses ont été réalisées avec le kit « Access RT-PCR system » (**Annexe 5**). Le mix a été rajouté aux tubes de réaction de PCR précédemment décontaminés aux UV contenant 2 µL de chaque amorce (forward et reverse) et 1 µL d'ARN matrice à une concentration identique de 100 ng.µL⁻¹ pour tous les échantillons afin de pouvoir comparer les résultats (**Annexe 2k**). Le volume final de la réaction était de 50 µL. La quantité de MgSO₄ a été optimisée entre 1 et 3 mM pour chaque gène étudié.

Le profil de la réaction était le suivant :

45°C pendant 45 minutes : transcription reverse

94°C pendant 2 minutes : inactivation de la reverse transcriptase

94°C pendant 30 secondes : dénaturation

60°C pendant 1 minute : hybridation

68°C pendant 2 minutes : élongation

68°C pendant 7 minutes : extension finale

x cycles

La température d'hybridation varie suivant les amorces utilisées à cause de la température de fusion et a été optimisée pour chaque gène étudié.

Afin d'étudier l'évolution de l'intensité du signal en fonction du nombre de cycles de PCR, plusieurs PCR ont été réalisées avec un nombre de cycles variable (x = entre 10 et 40 cycles).

2.8.2. Analyse électrophorétique

Les produits de RT-PCR ont été déposés sur gel d'agarose (1 %) pour effectuer une électrophorèse. Une caméra a permis de numériser les photos de gel afin de réaliser l'analyse d'images. L'analyse d'images a été réalisée avec le logiciel Scion Image version β 4.0.2 (Scion Corporation ©).

Annexe 3 - Composition des milieux

3.1. Zobell

Zobell solide

Pastone (BioRad)	2 g
Extrait de levure (BioRad)	0.5 g
Agar (BioRad)	6 g
EDMAS	500 mL

Zobell liquide

Pastone (BioRad)	2 g
Extrait de levure (BioRad)	0.5 g
EDMAS	500 mL

Les milieux sont ajustés en pH à 7.4 et autoclavés avant utilisation (20 min, 121°C). Pour le milieu Zobell solide, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri stériles sous hotte à flux laminaire avant le refroidissement. Les milieux sont conservés à 4°C et sont utilisables pendant un mois.

3.2. Eau de Lewis (EDMAS) (10 X)

NaCl (Sigma)	234 g
KCl (Sigma)	15 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O (Sigma)	12 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O (Sigma)	2 g
ou CaCl ₂ anhydre (Sigma)	1.5 g
Eau distillée	1 L

Autoclavage (20 min, 121°C), conserver à 4°C et utiliser à 1 X (dilution 1/10^{ème})

3.3. Solution anti-agrégante pour les hémocytes (SAAH)

Solution A Na₂HPO₄ FW : 142 .0 (Sigma) : peser 7.1 g pour 500 mL (eau distillée)

Solution B NaH₂PO₄ FW : 120 (Sigma) : peser 1,2 g pour 100 mL

Ratio solution A et B pour un pH de 7,4 : 40,5 mL de A et 9,5 mL de B. Pour 500 mL de tampon phosphate à 100 mM (0,1 M), mélanger 405 mL de la solution A et 95 mL de la solution B.

Ensuite peser

NaCl (Sigma) 12.5 g

EDTA (Sigma) 7.5 g

Puis filtrer.

Osmolarité finale : 1100 mOsmol

Ajuster le pH à 7.4 avec une solution HCl 1N ou NaOH 1N selon la valeur du pH mesurée.

3.4. Milieu d'incubation pour les hémocytes (MIH)

NaCl (Sigma) 1.4 g

BSA (Sigma) 100 mg

D-glucose (Sigma) 50 mg

CaCl₂ (Sigma) 67 mg

MgCl₂ (Sigma) 85 mg

Tris-HCl (0.05 M, pH=7.6) (Sigma) 50 mL

3.5. Milieu SAAH trypsine 5X

NaCl (Sigma) 2 g

Tris (Sigma) 2.42 g

EDTA (Sigma) 1 g

HCL 1N (Promega) 15 mL

Trypsine (Sigma) 210 mg

Eau distillée q.s.p. 100 mL

3.6. Solution d'Antibiotiques

Kanamycine (Sigma) 0.1 mg.mL⁻¹

Erythromycine (Sigma) 0.1 mg.mL⁻¹

Acide oxolinique (Sigma) 0.1 mg.mL⁻¹

Filtrer à 0.22 µm. Conserver à -20°C.

3.7. Eau DEPC

Mettre 100 µL de DEPC (diéthylpyrocarbonate) (**Annexe 5**) (BDH) dans 100 mL d'eau bidistillée dans un flacon propre. Agiter toute une nuit à 37°C, puis autoclaver. Aliquoter et conserver à -20°C.

Annexe 4 - Liste des espèces citées

Nom Latin	Nom Français	Nom Anglais	Descripteur	Année
<i>Anodonta cygnea</i>	Anodonte des cygnes	Swan mussel	Linné	1758
<i>Aplysia californica</i>	Lièvre de mer	California sea hare	Cooper	1863
<i>Argopecten irradians</i>	Peigne baie	Atlantic bay scallop	Lamarck	1819
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Planorbe	Bloodfluke planorb	Say	1818
<i>Bonamia ostreae</i>	-	-	Pichot & Comps	1979
<i>Cerastoderma edule</i>	Coque commune	Common edible cockle	Linné	1758
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Coque glauque	Olive green cockle	Bruguère	1789
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	-	-	Paulsen	1871
<i>Chaetoceros gracilis</i>	-	-	Schütt	1895
<i>Chamelea gallina</i>	Petite praire	Striped venus	Linné	1758
<i>Chlamys islandica</i>	Peigne islandais	Iceland scallop	Müller	1776
<i>Chlamys varia</i>	Pétoncle	Variegated scallop	Linné	1758
<i>Ciona intestinalis</i>	Ascidie jaune	Sea vase	Linné	1758
<i>Corbicula fluminea</i>	Clam d'Asie	Asian clam	Müller	1774
<i>Crassostrea angulata</i>	Huître creuse portugaise	Portuguese cupped oyster	Lamarck	1819
<i>Crassostrea gigas</i>	Huître creuse du Pacifique ou huître japonaise	Pacific cupped oyster	Thunberg	1753
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Huître creuse des Caraïbes	Mangrove cupped oyster	Guilding	1828
<i>Crassostrea virginica</i>	Huître creuse américaine	American cupped oyster Eastern oyster	Gmelin	1791
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune	Common carp	Linné	1758
<i>Danio rerio</i>	Danio	Striped danio Zebrafish	Hamiton	1822
<i>Daphnia magna</i>	Daphnie	Daphnia	Straus	1820
<i>Donax trunculus</i>	Flion tronqué	Wedge shell	Linné	1758
<i>Dreissena polymorpha</i>	Moule zébrée	Zebra mussel	Pallas	1771
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosophile Mouche du vinaigre	Vinegar fly	enMeign	1830
<i>Echinostoma caproni</i>	-	-	Iomini & Justine	1997
<i>Eisenia andrei</i>	Ver rouge de Californie	Red earthworm	Bouché	1972
<i>Eisenia fetida</i>	Ver rose	Brandling earthworm Tiger earthworm	Savigny	1826
<i>Elliptio complanata</i>	Elliption maigre de l'Est	Eastern Elliptio	Lightfoot	1786

<i>Ensis siliqua</i>	Couteau-silique	Sword razor shell	Linné	1758
<i>Escherichia coli</i>	-	-	Migula	1895
<i>Flexopecten flexuosus</i>	Pétoncle onde	Flexuous scallop	Poli	1795
<i>Geukensia demissa</i>	Moule côtelée	Atlantic ribbed mussel	Dillwyn	1817
<i>Haliotis cracherodii</i>	Ormeau noir	Black abalone	Leach	1814
<i>Haliotis diversicolor</i>	Ormeau différemment coloré Ormeau nordique	Variouly common abalone Tokobushi abalone	Reeve	1846
<i>Haliotis rufescens</i>	Ormeau rouge	Red abalone	Swainson	1822
<i>Haliotis tuberculata</i>	Ormeau tuberculeux	Tuberculate abalone Sea ear	Linné	1758
<i>Halocynthia roretzi</i>	Tomate de mer	Red oyas Sea squirt	Von Drasche	1884
<i>Haplosporidium nelsoni</i>	-	-	Haskin, Stauber & Mackin	1966
<i>Haslea ostrearia</i>	Navicule bleue	Blue green algae	Simonsen	1974
<i>Homo sapiens</i>	Homme	Man	Linné	1758
<i>Isochrysis galbana</i>	-	-	Parke	1950
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Lymnée des étangs Limace de boue	Stagnant pond snail Swamp lymnaeal	Linné	1758
<i>Lymnaea palustris</i>	Lymnée palustre	Marsh snail Marsh pond snail	Müller	1774
<i>Lytechinus pictus</i>	Oursin blanc	Painted sea urchin White sea urchin	Verrill	1867
<i>Mactromeris polynyma</i>	Mactre de Stimpson	Stimpson ou Artic surf clam	Stimpson	1860
<i>Marteilia refringens</i>	-	-	Herrbach	1971
<i>Mercenaria (=Venus) mercenaria</i>	Palourde américaine Praire	Northern quahog Cherry stone Round-shell clam	Linné	1758
<i>Meretrix lusoria</i>	Cythérée du Japon	Japanese hard clam	Roding	1798
<i>Metapenaeus monoceros</i>	Crevette mouchetée	Speckled prawn	Fabricius	1798
<i>Microcytos roughleyi</i>	-	-	Nell	1993
<i>Mus musculus</i>	Souris commune	House mouse	Linné	1758
<i>Mya arenaria</i>	Mye des sables	Sand gaper Softshell	Linné	1758
<i>Mya truncata</i>	Mye tronquée	Blunt gaper Truncated softshell	Linné	1758
<i>Mytilus californianus</i>	Moule californienne	California mussel	Conrad	1837

<i>Mytilus edulis</i>	Moule commune	Blue mussel Edible mussel	Linné	1758
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule méditerranéenne	Mediterranean mussel	Lamarck	1819
<i>Nocardia crassostrea</i>	-	-	Friedman et al.	1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	Rainbow trout	Walbaum	1792
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Saumon rouge	Sockeye salmon Blueback salmon	Walbaum	1792
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lapin européen	European rabbit	Linné	1758
<i>Oryzias latipes</i>	Medaka japonais	Japanese medaka Japanese rice fish	Temminck & Schlegel	1846
<i>Ostrea edulis</i>	Huître plate européenne	European flat oyster Edible oyster	Linné	1750
<i>Paracentrotus lividus</i>	Oursin-pierre	Stony sea urchin	Lamarck	1816
<i>Physa acuta</i>	Physe	Freshwater snail	Draparnaud	1805
<i>Pavlova lutheri</i>	-	-	Green	1975
<i>Pecten maximus</i>	Coquille St-Jacques Atlantique	Great Atlantic scallop	Linné	1758
<i>Perkinsus olseni</i>	-	-	Azevedo	1989
<i>Perkinsus marinus</i>	-	-	Mackin, Owen & Collier	1950
<i>Perna perna</i>	Moule de roche sudaméricaine	Mexilhao mussel South american rock mussel	Linné	1758
<i>Perna viridis</i>	Moule verte asiatique	Green mussel	Linné	1758
<i>Pinctada fucata</i>	Huître perlière japonaise	Japanese pearl oyster	Gould	1850
<i>Placopecten magellanicus</i>	Pecten d'Amérique	American sea scallop	Gmelin	1791
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	Schroeter	1872
<i>Rana catesbeiana</i>	Ouaouaron	Bullfrog	Shaw	1802
<i>Rana pipiens</i>	Grenouille léopard	Northern leopard frog	Schreber	1782
<i>Ruditapes (=Tapes = Venerupis) decussatus</i>	Palourde croisée d'Europe	Grooved carpet shell	Linné	1758
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Palourde japonaise	Japanese carpet shell Japanese littleneck	Adams & Reeve	1850
<i>Ruditapes semidecussatus (ou semidecussata)</i>	Palourde méditerranéenne	Manila clam Mediterranean clam	Reeve	1864
<i>Saccostrea glomerata</i>	Huître de roche de Nouvelle- Zélande (ou de Sidney)	New Zealand (ou Sidney) rock oyster	Gould	1850

<i>Sanguinicola inermis</i>	Douve du sang	Blood fluke	Plehn	1905
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiase	Snail fever	Sambon	1907
<i>Scrobicularia plana</i>	Lavignon poivre	Peppery furrow	Da Costa	1778
<i>Skeletonema costatum</i>	-	-	Greville	1866
<i>Tetraselmis suecica</i>	-	-	Kylin	1959
<i>Tilapia sparmanii</i>	Tilapia	Banded tilapia	Smith	1840
<i>Tubifex tubifex</i>	Ver d'eau douce	Freshwater tubificid	Müller	1774
<i>Vibrio aesturianus</i>	-	-	Tison & Seidler	1983
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	Miyamoto et al.	1961
<i>Vibrio(= Listonella) anguillarum</i>	-	-	Bergeman	1909
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	Pacini	1854
<i>Vibrio fischeri</i>	-	-	Bejerinck	1889
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	Fujino et al.	1951
<i>Vibrio tapetis</i>	-	-	Paillard, Percelay, Le Pennec & Le Picard	1989
<i>Vibrio tubiashii</i>	-	-	Tubiash, Chanley & Leifson	1965
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	-	Farmer	1980
<i>Vibrio splendidus</i>	-	-	Nicolas et al.	1996
<i>Xenopus laevis</i>	Xénope Carpaud à griffe	African clawed frog	Daudin	1802
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	-	Yarrow	1977

Annexe 5 - Liste des produits utilisés

- ❖ 2-Propanol, for Molecular Biology, Sigma ®. Code produit 19516, 500 mL. Conserver à 4°C.
- ❖ Access RT-PCR system : Promega, A1280. Conserver à -20°C.
- ❖ Chloroform : isoamyl alcohol 24 :1, Sigma ®. Code produit C-0549, 500 mL.
- ❖ Deoxynucleotide (dNTP) mix, 10 mM solution PCR Reagent, Sigma ®. Code produit D7295, conserver à -20°C. Le mix contient 10 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et TTP). Conserver à -20°C.
- ❖ Deoxyribonuclase I Kit, Sigma ®. Contient : DNase I, RNase-free (1 flacon, code produit D-5307); 10X Reaction Buffer (1 mL, code produit R-6273); Stop Solution (1 mL, code produit S-4809). Code produit AMP-D1. Conserver à -20°C.
- ❖ Dihydrorhodamine 123, Interchim, Molecular Probes ®. Code produit D-632. FW = 346.38 g.mol⁻¹. $\lambda_{\text{excitation}} = 507 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{émission}} = 528 \text{ nm}$ (vert, FL1). 10 mg. Conserver à -20°C.
- ❖ Di-ethyl Pyrocarbonate (DEPC), BDH Laboratory Supplies. Code produit 44170, 25 mL. Conserver à 4°C.
- ❖ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Fisher LABOSI. Code produit D770. 1 L .
- ❖ Enzymes de restriction et tampons (conserver à -20°C) :
 - Alu I, Promega. Code produit R6281, 500 u, 10 u/μL.
 - EcoR II, Sigma. Code produit R-1636, 100 u, 10 u/μL.
 - Hae III, Promega. Code produit R617A, 2500 u, 10 u/μL.
 - Hha I, Promega. Code produit R644A, 1000 u, 10 u/μL.
 - Hinf I, Promega. Code produit R6201, 1000 u, 10 u/μL.
 - Msp I, Fermentas. Code produit # ER0541, 3000 u, 10 u/μL.
 - Rsa I, Promega. Code produit R637A, 1000 u, 10 u/μL.
 - Sau3A I, Promega. Code produit R619A, 100 u, 10 u/μL.
 - Taq I, Promega. Code produit R615A, 1000 u, 10 u/μL.
 - Tampon B, Promega. Code produit R002A, 1 mL.
 - Tampon C, Promega. Code produit R003A, 1 mL.
 - Tampon E, Promega. Code produit R005A, 1 mL.
 - Tampon SB, Promega. Code produit B8781, 5*1 vial.
- ❖ Fluoresceïne diacetate (FDA), Interchim, Molecular Probes ®. Code produit F-1303. FW = 416.39 g.mol⁻¹. $\lambda_{\text{excitation}} = 490 \text{ nm}$. $\lambda_{\text{émission}} = 514 \text{ nm}$ (vert, FL1). 1 g. Conserver à -20°C.

- ❖ Fluospheres® carboxylate-modified microspheres, 1.0 µm, yellow-green fluorescent (505/515 nm) *2% solids*, Interchim, Molecular Probes ®. Code produit F-8823. Concentration = $2.7 \cdot 10^{10}$ particules.mL⁻¹. $\lambda_{\text{émission}} = 515$ nm (vert, FL1). 10 mL. Conserver à 4°C.
- ❖ iQ™ SYBR® Green supermix 2X, BIO-RAD. Code produit 170-8882. 500 * 50 µL. Conserver à -20°C.
- ❖ Lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi*, Sigma ®. Code produit L-5886, 25 mg.
- ❖ LysoTracker® Green DND-26 *1mM solution in DMSO* *special packaging*, Interchim, Molecular Probes ®. Code produit L-7526. FW = 78.13 g.mol⁻¹. $\lambda_{\text{excitation}} = 504$ nm. $\lambda_{\text{émission}} = 511$ nm (vert, FL1). Conditionnement : 20*50 µL, 1 mM. Conserver à -20°C.
- ❖ M-MLV Reverse Transcriptase, Sigma ®, recombinant, expressed in *E. coli*. Code produit M1302. conserver à -20°C. 200 u/µL, 40 ku. Fourni avec le tampon 10X M-MLV Reverse Transcriptase, contenant 50 mM de DTT. Fourni sous forme de tubes de 0.5 mL. Conserver à -20°C.
- ❖ Oligo(dT)₂₃ primers, anchored, Sigma ®. Code produit O-4387. Conserver à -20°C.
- ❖ Phorbol-12-Myristate-13-Acetate, Calbiochem ®. Code produit 524400, 1 g.
- ❖ Propidium iodide, 1.0 mg.mL⁻¹ solution in water, Interchim, Molecular Probes ®. Code produit P-3566. 10 mL. (fluorescence dans le rouge, FL3). Conserver à 4°C.
- ❖ Rnasin ® Ribonuclease Inhibitor, Promega, Catalog # N2111, Lot N211A, taille 2 500 u, concentration 40 u/µL, à conserver à -20°C. Une unité est définie comme la quantité de RNasine requise pour inhiber l'activité de 5 ng de ribonucléase A à 50 %. Conserver à -20°C.
- ❖ Sodium Acetate, anhydrous, Sigma ®. Code produit S-2889, 250 g.
- ❖ TRIZOL ® Reagent, Invitrogen™. Code produit No 15596-026, 100 mL. Conserver 1 an à 4°C.
- ❖ Ultra Pure Water, sterile, Qbiogene. Code produit SWATER01-b, 100 mL.

Annexe 6 - Publication

Article 5 : Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Archives of Environmental Contamination and Toxicology, soumis)

Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Karine Bouilly*, Marc Bonnard, Béatrice Gagnaire, Tristan Renault and Sylvie Lapègue

IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France

Correspondance to: Sylvie Lapègue; email: slapegue@ifremer.fr.

* Present address: University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Centre of Genetics and Biotechnology, 5000-911 Vila Real, Portugal.

Abstract

Diuron is a substituted urea herbicide used for agricultural and non agricultural weed control. Its widespread use and relatively slow breakdown led us to analyze its influence on aneuploidy level (lowered chromosome number in a percentage of somatic cells) and hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Adult oysters were subjected to two diuron concentrations (300 ng L⁻¹ and 3 µg L⁻¹) for eleven weeks. Significantly higher aneuploidy level was observed in diuron-treated oysters compared with the control. Furthermore, the observed impact on aneuploidy persisted to the next generation as offspring exhibited significantly higher aneuploidy levels when their parents had been exposed to diuron. Significant increases in hemocyte parameters (cell mortality, phagocytosis, granulocyte percentage, Reactive Oxygen Species (ROS) and lysosome presence) of the adults were also observed after four weeks of diuron exposure. The effects observed on oyster aneuploidy level and hemocyte parameters could have serious environmental and practical consequences.

Introduction

Diuron [3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] is a phenylurea herbicide (Brian 1964) used for pre- and post-emergence weed control in agriculture. This herbicide may enter aquatic ecosystems by spraydrift, leaching, runoff or accidental spills (Thurman *et al.* 1991; Squillace and Thurman 1992). Diuron is little affected by natural degradation processes (Radosevich *et al.* 1975), resulting in almost permanent contamination of surface and ground waters. This situation continues in France, even though the use of diuron has been deliberately reduced since 1999. Diuron is considered as a 'Priority Hazardous Substance' by the European Commission (Malato *et al.* 2002). Due to its slow breakdown (a month to a year) (Wauchope *et al.* 1992; Okamura 2002), diuron can be found in many environments such as the soil and water (Field *et al.* 2003; Okamura *et al.* 2003).

Crassostrea gigas has a diploid chromosome number of $2n = 20$ (Thiriot-Quiévreux 1986) but hypodiploid aneuploid cells are regularly found (*e. g.* Leitão *et al.* 2001a). Aneuploidy mainly originates from the non-disjunction of chromosomes during mitosis or meiosis (Bond and Chandley 1983; Martin and Rademaker 1990). Somatic aneuploidy in *C. gigas* is negatively correlated with growth rate (Leitão *et al.* 2001a), and some evidence has been shown for genetics influencing the level of this phenomenon (Leitão *et al.* 2001b). Moreover, differential chromosomal susceptibility was observed in aneuploid cells (Leitão *et al.* 2001c; Bouilly *et al.* 2005). Recently, the herbicide atrazine was shown to significantly increase levels of aneuploidy in *C. gigas* (Bouilly *et al.* 2003; Bouilly *et al.* 2004).

Mollusks have an open circulatory system which is continually exposed to the fluctuations of environmental factors including contaminants (Cheng 1981). The cellular defense system of bivalves is mediated by hemocytes which perform various actions including phagocytosis, intracellular degradation of pathogens by enzymatic hydrolysis and production of reactive oxygen metabolites (Cheng and Rodrick 1975; Pipe 1992). In invertebrates, these cellular activities may be affected by the presence of pollutants (Cheng 1988a, 1988b, 1990). Diuron has already been shown to disturb the metaphase spindle microtubules by splitting microtubule organizing centers which eventually divide into multiple poles along with the associated chromosomes (multipolar anaphase) (Chauhan *et al.* 1998). Thus, diuron disrupts mitosis by inhibiting polymerization of tubulin subunits of microtubules and one might expect effects like aneuploidy.

Although numerous studies have been made concerning the toxic effects of diuron in organisms such as phytoplankton (Devilla *et al.* 2005) and fish (Okamura *et al.* 2002; Saglio and Trijasse 1998), no investigation has been carried out to study the genotoxicity and the immunotoxicity of this herbicide on bivalves.

The aim of the present work was to study the genotoxicity and immunotoxicity of diuron in the Pacific oyster at concentrations equivalent to those found in the environment. We investigated whether diuron had any effect on (1) chromosome number (aneuploidy) in adults and their offspring in a controlled environment, and (2) on hemocyte parameters (cell mortality, phagocytosis, granulocyte percentage, Reactive Oxygen Species (ROS) production and lysosome presence) for adults monitored using flow cytometry.

Materials and Methods

Diuron exposure

Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were collected at Bonne Anse, Charente-Maritime, on the French Atlantic coast. These oysters were used in an experiment performed under controlled conditions in the nearby IFREMER hatchery. As three-year-old adults, the oysters were exposed to

diuron added to seawater pumped directly from Marennes-Oléron Bay. Diuron was given by the 'Institut National de la Recherche Agronomique' (INRA, Saint-Laurent-de-la-Prée, Charente-Maritime, France). Pure seawater from Marennes-Oléron Bay was used as a control (treatment 1) and two concentrations of diuron were tested: 300 ng L⁻¹ and 3 µg L⁻¹ (treatments 2 and 3 respectively). For each treatment, two replicate tanks (A and B) were used, each containing 74 oysters for the aneuploidy study and 60 oysters for monitoring hemocyte parameters. Oysters were first acclimated to the hatchery environment for 4 weeks in raceways. The experiment was then conducted over 11 weeks in tanks without automatic water renewal. Each tank contained 130 L of seawater which was changed every day and maintained at 20°C ± 1°C. Diuron, in the form of diluted solutions, was added to the tanks for treatments 2 and 3. Oysters were fed daily with a mixture of algae (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, and *Chaetoceros gracialis*).

Offspring of diuron-exposed oysters

At the end of the diuron exposure, six males and six females from each treatment replicate were used to make crosses. The crosses were performed between parents from the same replicate (1A, 1B, 2A, 2B, 3A or 3B) using all twelve animals for mass fertilization and leading to 6 crosses in all. Gametes were obtained by strip-spawning sexually mature animals. For each fertilization, 400 million spermatozooids were added to approximately 4 million oocytes suspended in 500 mL of seawater. For each cross, the fertilized gametes were divided into two replicates and these were placed in 50-liter fiberglass larval tanks of sea water. Larvae from these crosses were reared for 23 days under standard conditions at 23-24°C and fed with a mixture of algae (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans forma pumillum*). Larval density was evaluated directly by microscope counts for each batch. Larval growth was studied every two or three days by measuring the size of 50 larvae using an image analysis system. Larvae were transferred to a micro-nursery when they were ready to settle. These offspring were examined for aneuploidy after six months.

Chromosome preparation for aneuploidy analysis

Oysters (adults or juvenile offspring) were incubated for 7-8 h in seawater containing 0.005 % colchicine. The gills were then dissected in seawater, treated for 40 minutes in 0.9 % sodium citrate and fixed in a freshly prepared mixture of absolute ethanol-acetic acid (3:1) with two 10 min changes then two 20 min changes. Slides were prepared from a piece of gill tissue, following the air drying technique of Thiriot-Quévèreux and Ayraud (1982). The preparations were stained for 10 min with Giemsa (4 %, pH 6.8).

Aneuploidy scoring

Chromosome counts were made directly by microscope observation (Olympus BH2 microscope) choosing apparently intact and well-spread metaphase cells. Cells with $2n = 19$, 18 or 17 chromosomes were considered as aneuploid. The mean percentage aneuploidy per replicate was estimated by counting 30 metaphase cells per animal in 10 animals per replicate (300 well-spread metaphase cells per replicate in total).

Sampling of circulating hemocytes

Oyster hemocytes were collected at 0, 1, 2, 4 and 11 weeks. On each occasion, ten oysters per raceway were analyzed. Hemolymph was withdrawn from the pericardial cavity using a 1mL syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm). For each oyster, 0.5-1 mL of hemolymph was collected and conserved on ice to prevent hemocyte aggregation. Hemolymph samples were pooled from five oysters giving two pools per raceway and four pools per treatment.

Cell analysis by flow cytometry

Flow cytometry protocols were as described in Gagnaire *et al.* (2003; 2004). For each sample, 3 000 events were counted using an EPICS XL 4 flow cytometer (Beckman Coulter). Results were depicted as cell cytograms indicating cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) with the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used. A gate was defined on the basis of FSC value in order to eliminate cell debris. The type of fluorescence recorded depended on the parameter to be monitored: ROS production, lysosomes and phagocytosis were measured using green fluorescence and cell mortality using red fluorescence. The EPICS XL 4 software allowed differentiation between supposed populations of granulocytes and hyalinocytes based on their FSC and SSC values. Mortality was quantified using 200 μ L of hemolymph. Hemocytes were incubated in the dark for 30 min at 4°C with 5 μ L propidium iodide (PI, 1.0 mg mL⁻¹, Interchim). Lysosome presence was measured using a commercial kit (LysoTracker[®] Green DND-26, 1 mM in DMSO, Molecular Probes). A 1 μ L aliquot of LysoTracker was added to 200 μ L hemocyte suspension. Cells were incubated for 2 hours in the dark at room temperature and the reaction was then stopped by placing the tubes on ice for 5 minutes. ROS production was measured using dihydrorhodamine 123 (DHR123, Molecular Probes), specific to the superoxide anion O₂⁻. A 1 μ L aliquot of a DHR123 solution (145 μ M) was added to 200 μ L hemocyte suspension. Cells were incubated for 30 minutes in the dark at room temperature and the reaction was then stopped by placing the tubes on ice for 5 minutes. Phagocytosis was measured by ingestion of fluorescent beads. Two hundred μ L of hemolymph was incubated for 1 h in the dark at room temperature with 10 μ L of a 1/10 dilution of Fluorospheres[®] carboxylate-modified microspheres (diameter 1 μ m, Interchim).

Statistical analysis

Since the number of metaphase cells evaluated per individual was the same in all the studied material (30 per individual), it was possible to test the replicate effect using a two-way ANOVA (diuron concentration and replicate effect). Results were compared between parents and offspring using a three-way ANOVA in which the effects were generation (parents or offspring) diuron concentration and replicate effect. Effects of parental treatment on the offspring hatching rate and larval growth were analyzed with non-parametric Kruskal-Wallis tests.

For hemocyte parameters, results were expressed as the percentage of positive cells. Values were normalized using an r angular arcsinus $\sqrt{\text{percentage of positive cells}}$ transformation before analysis. ANOVA of the hemocyte parameters was carried out in order to detect any effect of the diuron. When H_0 was rejected, an a posteriori test was used. Significance was set at $P \leq 0.05$. For ROS and lysosomes, gates were defined from the cytograms in order to distinguish different populations according to fluorescence intensity. Three cell populations were defined as follows: a population of negative cells, a population of moderately stained cells and a population of strongly stained cells (Gagnaire *et al.* in press). For both ROS and lysosomes, statistical analysis was only made on strongly stained cells.

Statistical analyses were performed using the computer programs Statgraphics® Plus version 5.1 and SYSTAT 9.0 by SPSS (Wilkinson 1990).

Results

Mortality and developmental parameters

Mortality rates of adult oysters ranged from 0 to 5.4 % except for the replicate 3A (Fig. 1), where this was higher (31.3 %). The hatching rates in offspring batches bred from parents exposed to 0 (control), 300 ng L⁻¹, and 3 µg L⁻¹ of diuron were 59.2 %, 68 %, and 45.7 %, respectively (Fig. 2). There was no significant difference in hatching rate between treatments ($F = 5.34$; $P = 0.06$). The offspring of parents exposed to the two different diuron concentrations did not show any significant difference in larval growth (Fig. 3).

Aneuploidy

Aneuploidy levels in adult oysters from treatments 1 (control), 2 (300 ng L⁻¹) and 3 (3 µg L⁻¹) ranged from 7.3 to 10 %, 16.3 to 16.7 %, and 14.7 to 15.7 %, respectively (Fig. 4). Treatment effect was significant ($F = 13.658$; $P < 0.001$) and there was no significant difference between replicates ($F = 0.115$; $P = 0.736$). Significant differences were observed between treatments 1 and 2 ($F = 25.598$; $P < 0.001$), as well as between treatments 1 and 3 ($F = 17.09$; $P < 0.001$), see Fig. 4. No

significant difference was observed between the two diuron treatments (2 and 3) ($F = 0.617$; $P = 0.437$).

Offspring aneuploidy levels ranged from 10 to 11.8 %, 13.3 to 14.7 %, and 15.9 to 17.3 % for treatments 1, 2, and 3, respectively (Fig. 4). Treatment effect was significant ($F = 3.547$, $P = 0.036$) and there was no significant difference between replicates ($F = 0.137$, $P = 0.713$). A significant difference was observed only between treatment 1 and treatment 3 ($F = 7.289$, $P = 0.011$). There was no significant difference when aneuploidy was compared between parents and offspring ($F = 0.142$, $P = 0.707$).

Hemocyte parameters

The first significant differences in hemocyte parameters were only found after four weeks of exposure to diuron. All hemocyte parameters tested were higher in the two diuron treatments (2 and 3) than the control (1) (Fig. 5). Cell mortality was 13 % in the control and 17.3 % and 16.4 % for 300 ng L⁻¹ (treatment 2) and 3 µg L⁻¹ (treatment 3) respectively ($P < 0.05$). Granulocyte percentage was 11.2% in the control and 17.2% for both diuron concentrations ($P < 0.05$). The largest differences appeared for phagocytosis: values were 37 % for the control and 59.9 % and 58.8 % for diuron treatments 2 and 3, respectively ($P < 0.01$ between the control and the two diuron treatments). For ROS production, a similar result was observed (25.9 % for the control and 32.6 % for both diuron concentrations) ($P < 0.05$). For lysosome detection, values were 27.7 % for the control and 40.4 % and 41.9 % for diuron treatments 2 and 3, respectively. Although there was a significant difference between diuron-treated samples and the control ($P < 0.05$), the difference between the diuron treatments (2 and 3) was not significant.

Despite these clear effects after 4 weeks exposure, by 11 weeks diuron had no effects on hemocyte parameters (data not shown).

Discussion

An effect of an environmental contaminant on aneuploidy level in *Crassostrea gigas* was previously demonstrated with atrazine. A positive relationship was shown between atrazine concentration and aneuploidy level in *C. gigas* adults and juveniles, and effects persisted to the next generation (Bouilly *et al.* 2003; Bouilly *et al.* 2004).

In the present study, a significant increase in aneuploidy level of *C. gigas* adults was observed at both diuron concentrations tested, compared with the control. This is the first reported evidence of an effect of diuron, or its derived products, on aneuploidy in a bivalve. In mammalian cells, a diuron degradation product (3,4-dichloroaniline), may induce aneuploidy by interacting with the mitotic apparatus (Bauchinger *et al.* 1989). The concentration used in treatment 2 (300 ng L⁻¹) is

equivalent to that found in polluted environments. It is close to the peak value found in water from the river Vilaine (Férel, Morbihan, France) which was 440 ng L⁻¹ in August 2003. The highest environmental values that have been reported were found in estuary and harbor waters, 700 ng L⁻¹ and 6740 ng L⁻¹ respectively (Readman *et al.* 1993; Thomas *et al.* 2001). Open estuaries usually have lower environmental concentrations than harbors, due to higher water exchange (Thomas *et al.* 2001).

In our study, diuron did not have a significant effect on the mortality of *C. gigas*. Mortality rates were low for all three treatments. Although the mortality rate in one batch of treatment 3 was higher, this was probably due to zootechnical problems. Tanguy *et al.* (2005) observed no mortality when they treated oysters for 4 weeks with a mixture of three herbicides (2 g L⁻¹ atrazine, 0.5 g L⁻¹ diuron and 1 g L⁻¹ isoproturon), even though the pollutant concentrations were much higher than those used in the present study. This agrees with results from other experiments (see review in Giacomazzi and Cochet 2004) that showed that diuron only had lethal effects on fish and aquatic invertebrates in acute exposure episodes with higher concentrations (1 to 42 mg L⁻¹).

Although numerous studies have examined the effect of pesticides on hemocyte parameters, little work has been done on the effects of diuron in bivalves. Diuron induced no modification of the hsp70 promoter, a stress indicator, in human cells (Aït-Aïssa *et al.* 2000). However, hemocyte aggregation decreased in *C. gigas* when diuron (1 µg L⁻¹) was tested in a mixture with other herbicides (atrazine and isoproturon) (Auffret and Oubella 1997).

Most herbicides act on photosynthesis, and both atrazine and diuron have the same mode of action on plant metabolism. They inhibit photosynthesis by reversibly binding to the Q_B binding site on the D₁ protein (often called the 'herbicide-binding' protein), thus inhibiting electron flow (see review by Oettmeier 1992). However, this does not suggest that herbicides would act directly on hemocyte parameters, and a previous study reported that atrazine had no effect on them (Gagnaire *et al.* 2003). In the present study, diuron increased all the hemocyte parameters studied (cell mortality, granulocyte percentage, ROS production, lysosome positive cells and phagocytosis), though effects were only detectable after 4 weeks of contact. Oysters may be able to respond to diuron exposure by increasing values of hemocyte parameters. We may hypothesize therefore that if hemocyte parameters are modulated, defense capacities are also be altered. After eleven weeks, diuron seemed to have no effect on hemocyte activity, suggesting that the oysters had acclimated to diuron. This kind of response has already been reported for other pollutants (Larson *et al.* 1989). Hemocyte parameters may recover in the long term, suggesting that mechanisms of cell restoration may possibly be at work (Russo and Lagadic 2004).

The investigation of the persistence of diuron impact on aneuploidy in the Pacific oyster is of particular importance since diuron may cause irreversible damage to genetic material.

Considering the persistence of diuron in habitats adjacent to application areas, and the fact that diuron is applied preferentially in spring, pollution could negatively impact aquatic organisms during their breeding periods. It was therefore important to study the aneuploidy level of oyster offspring. We examined the offspring of the adult oysters exposed (or not) to diuron for 11 weeks, during which gametogenesis was taking place, and observed a significantly higher aneuploidy level in those bred from parents exposed to diuron compared with those bred from the control. Statistical analysis revealed no significant difference in aneuploidy level between parents and offspring in our study. The impact of diuron on Pacific oyster aneuploidy and the level of this damage therefore persist to the next generation. The same result has been observed with atrazine exposure (Bouilly *et al.* 2004). These herbicides may have a similar mode of action on the genome.

In our study, the presence of diuron in the environment of the parents did not have an effect on the hatching rate of offspring or on larval growth. In previous studies however, diuron did affect survival and growth in amphibian embryos and tadpoles (Schuytema and Nebeker 1998), cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms and snails (Nebeker and Schuytema 1998); although these effects were observed at concentrations higher than those used in field applications.

Our study showed that diuron worsened aneuploidy in *Crassostrea gigas* and that effects persisted to the next generation indicating that this herbicide may cause irreversible cytogenetic damage. Diuron also had an impact on hemocyte parameters after four weeks of exposure but this appeared to be reversible, as after eleven weeks of exposure these effects were no longer observed.

Acknowledgements

The authors are grateful to C Chevallier for supplying the diuron. Part of this research was realised with the IMOPHYS research group (Intégration de réponses MOléculaires et PHYSiologiques aux contaminants chimiques en milieu côtier) and supported by the Action Incitative IFREMER-INRA 2003 (C: No.03/1214839).

References

- Aït-Aïssa S, Porcher JM, Arrigo AP, Lambré C (2000) Activation of the *hsp70* promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145:147-157
- Auffret M, Oubella R (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol A* 118:705-712
- Bauchinger M, Kulka U, Schmid E (1989) Cytogenetic effects of 3,4-dichloroaniline in human lymphocytes and V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res Lett* 226:197-202

- Bond DJ, Chandley AC (1983) Aneuploidy. Oxford Monographs on Medical Genetics No. 11. Oxford University Press, Oxford, UK
- Bouilly K, Leitão A, McCombie H, Lapègue S (2003) Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environ Toxicol Chem 22:229-233
- Bouilly K, McCombie H, Leitão A, Lapègue S (2004) Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Mar Biol 145:699-705
- Bouilly K, Leitão A, Chaves R, Guedes-Pinto H, Boudry P, Lapègue S (2005) Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. Genome 48:177-180
- Brian RC (1964) The classification of herbicides and types of toxicity. In: Audus LJ (ed) The physiology and biochemistry of herbicides. London & New York: Academic Press, pp 1-37
- Chauhan LKS, Saxena PN, Sundararaman V, Gupta SK (1998) Diuron-induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*. Pestic Biochem Phys 62:152-163
- Cheng TC (1981) Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) Invertebrate blood cells. Academic Press, London, pp 233-299
- Cheng TC (1988a) In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential cell counts. J Invertebr Pathol 51:207-214
- Cheng TC (1988b) In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytotic indices. J Invertebr Pathol 51:215-220
- Cheng TC (1990) Effects of in vivo exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. Academic Press, San Diego, CA
- Cheng TC, Rodrick GE (1975) Lysosomal and other enzymes in the haemolymph of *Crassostrea virginica*, and *Mercenaria mercenaria*. Comp Biochem Physiol B 52:443-447
- Devilla RA, Brown MT, Donkin M, Tarran GA, Aiken J, Readman JW (2005) Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. Mar Ecol Prog Ser 286:1-12
- Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Griffith SM, Wigington PJ (2003) Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. J Environ Qual 32:171-179
- Gagnaire B, Renault T, Bouilly K, Lapègue S, Thomas-Guyon H (2003) Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. Curr Pharm Design 9:193-199
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immun 16:501-512

- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T Pollutants effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. Cell Biol Toxicol (in press)
- Giacomazzi S, Cochet N (2004) Environmental impact of diuron transformation: a review. Chemosphere 56:1021-1032
- Larson KG, Roberson BS, Hetrick FM (1989) Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. Dis Aquat Organ 6:131-136
- Leitão A, Boudry P, Thiriôt-Quévieux C (2001a) Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. Aquaculture 193:39-48
- Leitão A, Boudry P, McCombie H, Gérard A, Thiriôt-Quévieux C (2001b) Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquat Living Resour 14:233-237
- Leitão A, Boudry P, Thiriôt-Quévieux C (2001c) Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Genome 44:735-737
- Malato S, Blanco J, Cáceres J, Fernández-Alba AR, Agüera A, Rodríguez A (2002) Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. Catal Today 76:209-220
- Martin RH, Rademaker A (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. Cytogenet Cell Genet 53:103-107
- Nebeker AV, Schuytema GS (1998) Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. Arch Environ Contam Toxicol 35:441-446
- Oettmeier W (1992) Herbicides of photosystem II. In: Barber J (ed) The photosystems: structure, function and molecular biology, Vol II. Elsevier, Amsterdam, pp 349-408
- Okamura H (2002) Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint. Chemosphere 48:43-50
- Okamura H, Watanabe T, Aoyama I, Hasobe M (2002) Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. Chemosphere 46:945-951
- Okamura H, Aoyama I, Ono Y, Nishida T (2003) Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. Mar Pollut Bull 47:59-67
- Pipe RK (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol 16:111-122
- Radosevich SR, Elmore CL, McHenry WB (1975) Herbicide persistence in irrigated soils. In: Craft SA (ed) Modern weed control. Univ California Press, Berkeley, CA, p 427

- Readman JW, Albanis TA, Barcelo D, Galassi S, Tronczynski J, Gabrielides GP (1993) Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: results from a MED POL pilot survey. *Mar Pollut Bull* 26:613-619
- Russo J, Lagadic L (2004) Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ Pollut* 127:303-311
- Saglio P, Trijasse S (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol* 35:484-491
- Schuytema GS, Nebeker AV (1998) Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog and African clawed frog embryos and tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:370-376
- Squillace PJ, Thurman EM (1992) Herbicide transport in rivers: importance of hydrology and geochemistry in nonpoint source contamination. *Environ Sci Technol* 26:538-545
- Tanguy A, Boutet I, Moraga D (2005) Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochim Biophys Acta* 1681:116-125
- Thiriot-Quiévreux C (1986) Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70:225-231
- Thiriot-Quiévreux C, Ayraud N (1982) Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar Biol* 70:165-172
- Thomas KV, Fileman TW, Readman JW, Waldock MJ (2001) Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Mar Pollut Bull* 42:677-688
- Thurman EM, Goolsby DA, Meyer MT, Kolpin DW (1991) Herbicides in surface waters in the midwestern United States: the effect of spring flush. *Environ Sci Technol* 25:1794-1796
- Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PWM, Burt JP (1992) The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol* 123:1-155
- Wilkinson L (1990) SYSTAT: The System for Statistics. SYSTAT, Evanston, IL

Figure captions

Fig. 1. Mortality rate (%) of adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in controls (1A and 1B) and diuron treatments at two concentrations (2A and 2B, 300 ng L⁻¹; 3A and 3B, 3 µg L⁻¹).

Fig. 2. Hatching rate (%) of offspring of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to different diuron concentrations (0, 300 ng L⁻¹ and 3 µg L⁻¹). Bars indicate standard deviation of the mean.

Fig. 3. Size (µm) of larvae bred from parental Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to different diuron concentrations (0, 300 ng L⁻¹ and 3 µg L⁻¹).

Fig. 4. Mean aneuploidy percentage of adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in controls (1A and 1B) and diuron treatments at two concentrations (2A and 2B, 300 ng L⁻¹; 3A and 3B, 3 µg L⁻¹), and of their offspring. Bars indicate standard deviation of the mean.

Fig. 5. Hemocyte parameters of adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, for control (0 ng L⁻¹) and both diuron concentrations (300 ng L⁻¹ and 3 µg L⁻¹) after four weeks of contamination. Values are means of four replicate pools of five animals each. Bars indicate standard deviations of the mean.

Fig. 1

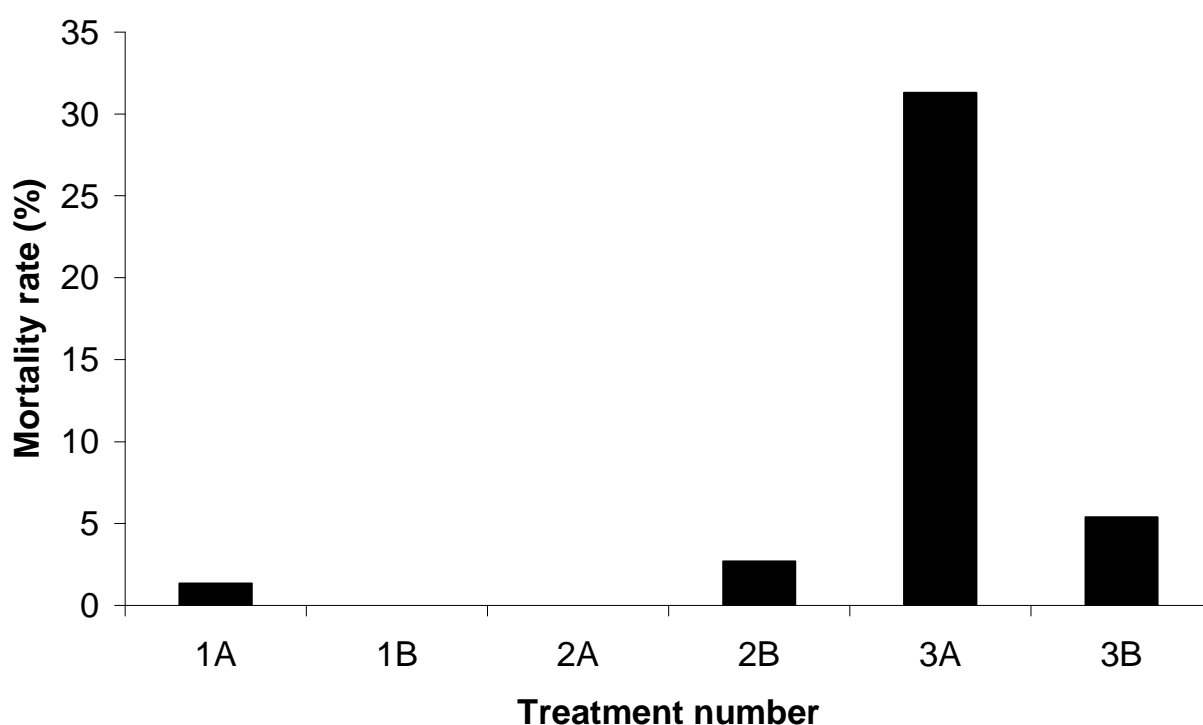


Fig. 2

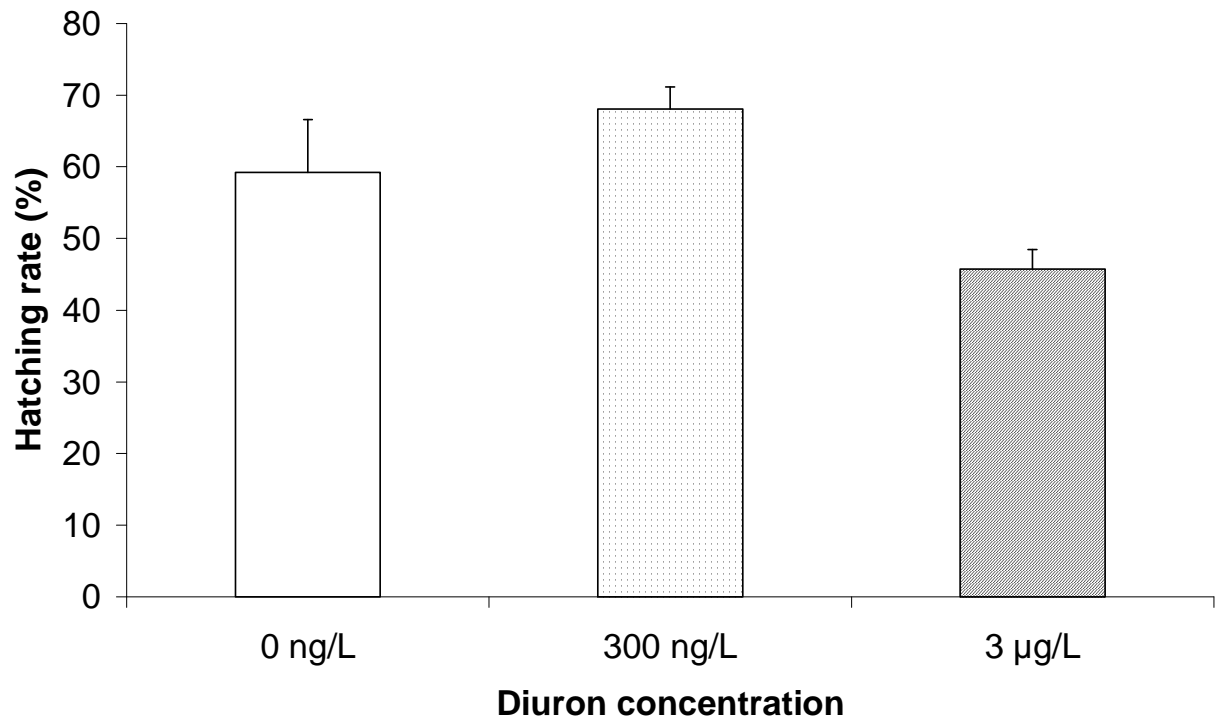


Fig. 3

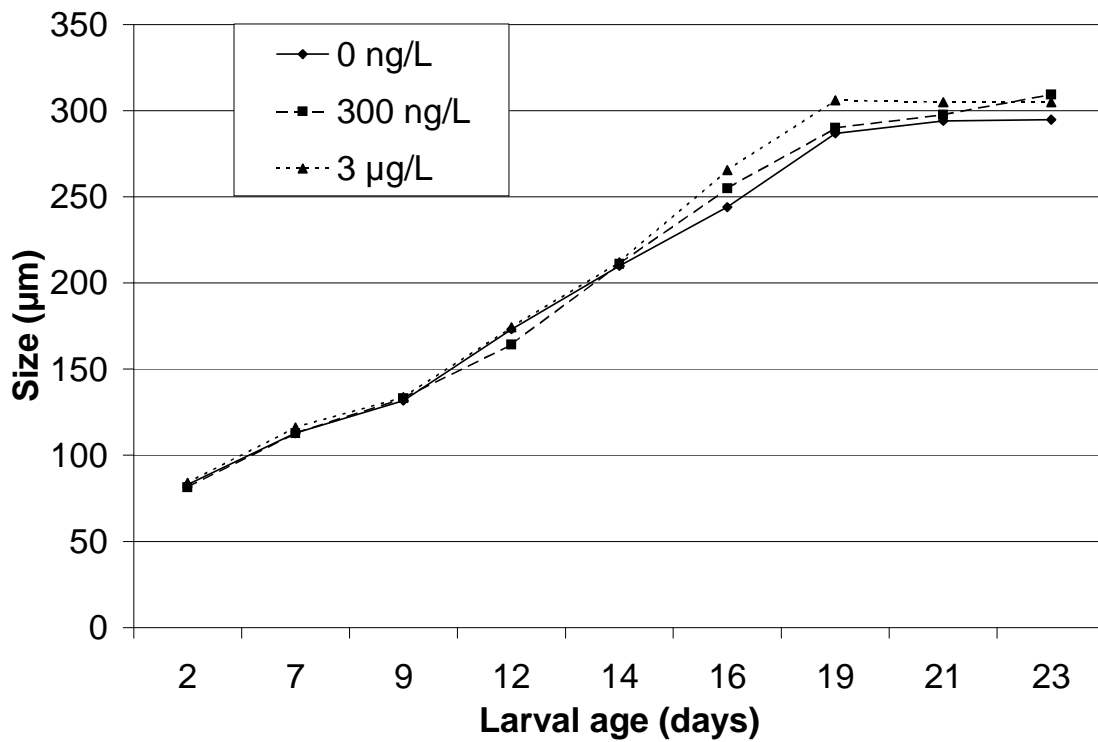


Fig. 4

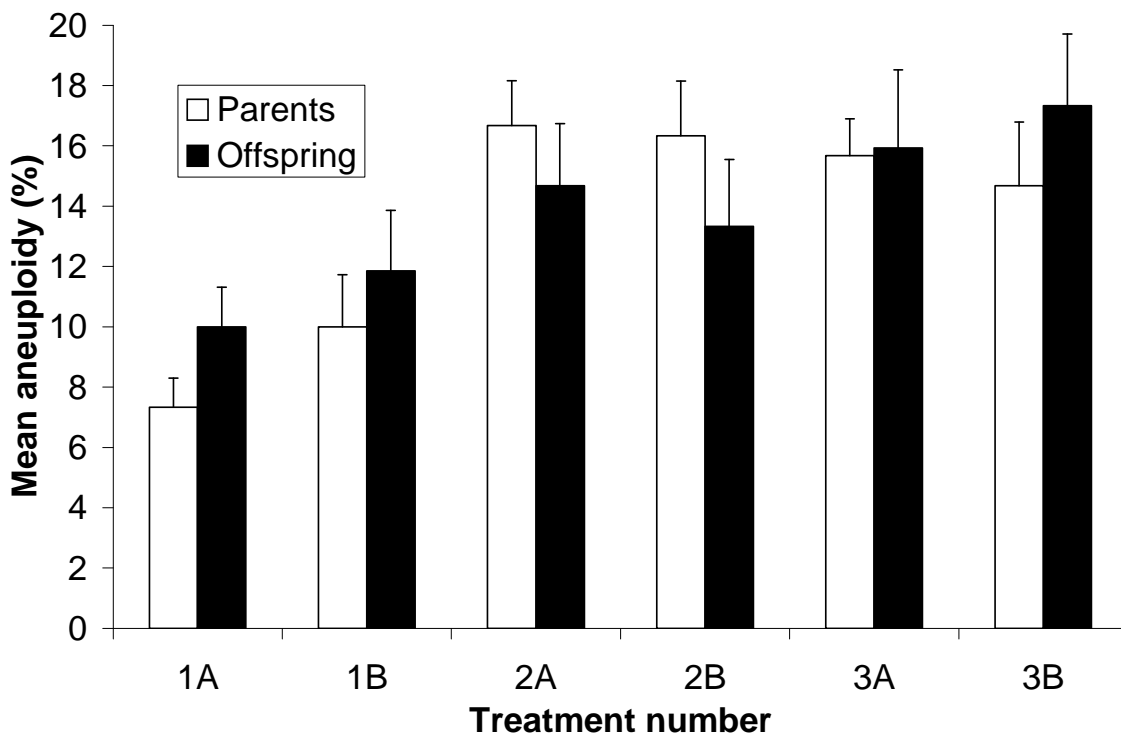
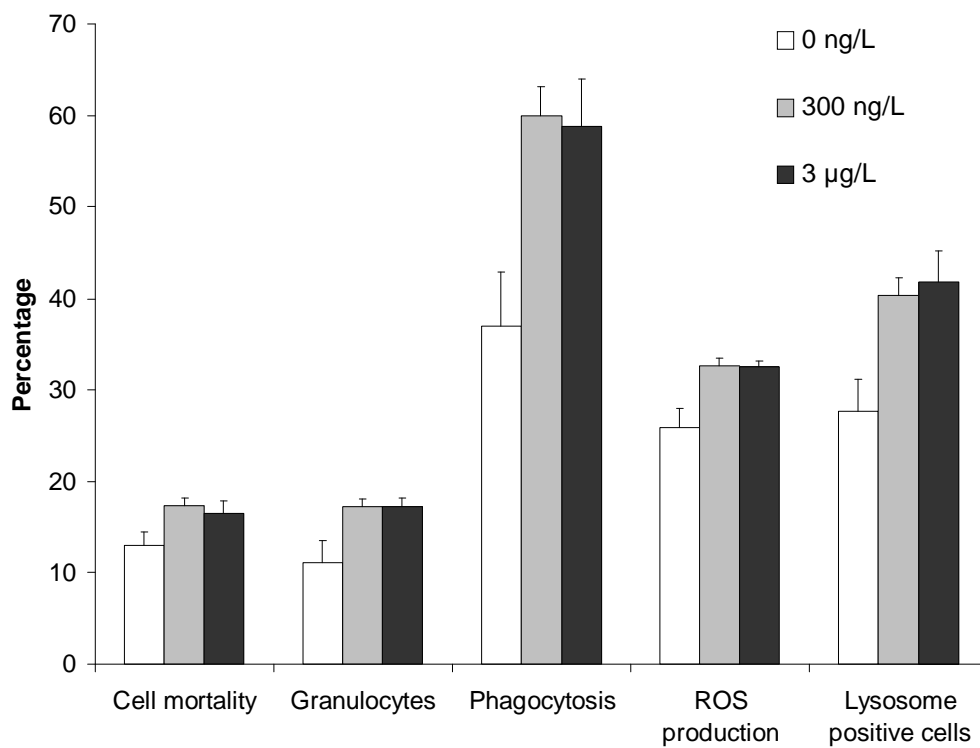


Fig. 5



TITRE : Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* – Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses

RÉSUMÉ : L'ostréiculture est principalement réalisée dans les estuaires, zones soumises à de nombreuses pollutions liées aux activités anthropiques. Parmi ces animaux, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, représente un modèle d'intérêt car elle est sédentaire et filtre de grandes quantités d'eau pour se nourrir. Parmi toutes les fonctions physiologiques pouvant être perturbées par les polluants, les mécanismes de défense sont peu étudiés chez les bivalves. Des animaux présentant des activités de défense altérées peuvent se montrer plus sensibles aux maladies infectieuses. Dans ce contexte, les effets de polluants sur les activités hématocytaires et la sensibilité aux maladies ont été testés chez *C. gigas*. Après mise au point de protocoles permettant de suivre des paramètres hématocytaires en cytométrie de flux, des expériences de contamination ont été conduites *in vitro* et *in vivo*. Les expériences *in vitro* ont démontré les effets de plusieurs polluants sur les paramètres hématocytaires. La contamination *in vivo* avec un mélange de pesticides a induit une diminution de l'activité de phagocytose et une sous-expression de gènes immunitaires mesurée par PCR en temps réel. Dans d'autres expériences impliquant la même contamination suivie d'une injection de bactéries, la mortalité était plus élevée et plusieurs gènes immunitaires étaient sur-exprimés chez les animaux contaminés infectés en comparaison aux animaux non contaminés infectés. Les expériences *in situ* ont permis de définir le statut de défense de différentes populations génétiques. Cette étude est la première à explorer une relation entre modulation des paramètres hématocytaires et dérèglement de la réponse aux bactéries chez *C. gigas*.

MOTS-CLÉS : immunotoxicologie ; pathologie ; huître creuse, *Crassostrea gigas* ; hémocytes ; phagocytose ; polluants ; pesticides ; cytométrie de flux ; PCR en temps réel.

TITLE: Study of pollutant effects on hemocyte parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* – Interactions between environment, defence mechanisms and infectious diseases

ABSTRACT: Shellfish industry is mostly realized in estuary zones, which are subjected to pollutions due to anthropic activities. The harmful effects of pollutants on animals inhabiting these estuarine zones are poorly known. Among these animals, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, may represent a model because they are sedentary and they filter water intensively. Among all physiological functions possibly disturbed by pollutants, defence mechanisms are poorly studied in bivalves. Moreover, animals presenting impaired defence mechanisms may be more sensitive to infectious diseases. In this context, effects of pollutants on hemocyte functions and on sensitiveness to diseases were tested in *C. gigas*. After adjusting the protocols for the monitoring of hemocyte parameters using flow cytometry, contamination experiments were conducted *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* experiments allowed to demonstrate the effects of several pollutants on selected hemocyte parameters. *In vivo* contamination with a pesticide mixture induced a decrease of phagocytosis activity and a down-regulation of immune genes monitored by real-time PCR. In other experiments involving the same pesticide contamination followed by an injection of bacteria (*Vibrio*), mortality was higher and several immune genes were up-regulated in infected contaminated animals compared to infected non contaminated animals. *In situ* experiments allowed to define the defence status of different oyster populations (triploids, diploids from sea bed and hatchery diploids). This study is the first to explore a relationship between a modulation of hemocyte parameters and a dysfunctioning of response to bacteria in Pacific oyster, *C. gigas*.

KEY WORDS: immunotoxicology; pathology; Pacific oyster, *Crassostrea gigas*; hemocytes; phagocytosis; pollutants; pesticides; flow cytometry; real-time PCR.

IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ronces-les-Bains, 17390 La Tremblade, France.