

Effets d'un mélange de pesticides sur les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Effect of pesticide exposure on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemocytes.

Béatrice GAGNAIRE¹, Florence GERET², Joël HAURE³, Jean-Louis MARTIN⁴, Thierry BURGEOT⁵,
Hélène THOMAS-GUYON⁶, Tristan RENAULT⁷

¹ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 LA TREMBLADE, France ;
bgagnair@ifremer.fr

² CNRS, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes, Centre de Formation et de Recherche J.F.
Champollion, Place de Verdun, 81012 ALBI cedex 9 ; florence.geret@univ-jfc.fr

³ Ifremer, Polder des champs, 85230 BOUIN, France ; jhaure@ifremer.fr

⁴ Ifremer, Polder des champs, 85230 BOUIN, France ; jean.louis.martin2@ifremer.fr

⁵ Ifremer, DEL-PC, Rue de l'île d'Yeu, B.P. 21105, 44311 NANTES Cedex 3, France ;
tburgeot@ifremer.fr

⁶ Laboratoire de Biologie et Environnement Marin, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau,
17042 LA ROCHELLE ; hthomas@univ-lr.fr

⁷ Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 LA TREMBLADE, France trenault@ifremer.fr

Abstract : Shellfish industry is often realised in estuarine areas, subjected to pollutions due to agricultural activities. The harmful effects of pesticides on animals inhabiting these estuarine zones are poorly documented. Bivalve molluscs represent an interesting model because they are sedentary and they filter water intensively. Effects of pesticides on haemocytes functions were tested in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and analysed by flow cytometry. A combination of pesticide at environmental concentrations was tested in vivo. Animals used corresponded to two genetically selected populations produced in hatchery.

Résumé : L'ostréiculture est souvent réalisée dans les zones d'estuaires, soumises à des pollutions en particulier liées à l'agriculture. Les effets de pesticides sur les animaux habitant les estuaires sont peu documentés. Les bivalves représentent un bon indicateur de pollution, du fait de leur sédentarité et de leur activité de filtration. Les effets de pesticides sur les fonctions hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été analysés par cytométrie en flux. Un mélange de pesticides a été testé in vivo à des concentrations environnementales. Les animaux utilisés correspondaient à deux populations génétiquement sélectionnées et produites en éclosérie.

Mots-clés : *Crassostrea gigas*, cytométrie en flux, hémocytes, pesticides, immunotoxicité

Introduction :

L'ostréiculture est une activité économiquement importante en France. Les élevages sont réalisés la plupart du temps dans des zones estuariennes, qui reçoivent continuellement des rejets notamment d'origine agricole. En zone d'estuaire, les animaux tels que les huîtres subissent ainsi une pression environnementale, et son effet sur leur système de défense apparaît important à déterminer. En effet, il a été montré chez les vertébrés et les invertébrés que certains polluants étaient capables d'induire une diminution des capacités de défense et de rendre ainsi les animaux plus vulnérables aux maladies infectieuses. Les bivalves possèdent un système de défense faisant intervenir des cellules particulières, les hémocytes. Ces cellules sont capables de produire et de libérer diverses molécules intervenant dans les défenses de l'organisme (enzymes hydrolytiques, phénoloxydase, peptides antimicrobiens). Elles sont également capables de phagocytose (1).

Le niveau de contamination du littoral français par les pesticides révèle la présence de nombreuses molécules telles que l'atrazine, le carbaryl et le diuron (2). Le but de ce travail était d'étudier l'effet d'un mélange de pesticides sur les hémocytes de l'huître creuse, *C. gigas*, afin de déterminer un possible effet immunotoxique de ces molécules. Il s'agissait également de définir des biomarqueurs de pollution par l'intermédiaire d'activités hémocytaires. Les cellules ont été étudiées en cytométrie de flux, qui a permis une analyse rapide de caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules (3). Les animaux utilisés dans cette étude provenaient de deux populations qui ont la particularité de présenter des taux de mortalité différents en période estivale sur estran.

Matériel et Méthodes :

Les animaux ont été produits en éclosérie (IFREMER La Tremblade) et sélectionnés par rapport à leur comportement durant la période de mortalité sur estran : la population A présente en moyenne une mortalité de 15% et la population B de 60%. Les pesticides sélectionnés sont les plus épandus dans la région de Marennes-Oléron, et le mélange final était composé comme détaillé sur le tableau 1. L'exposition a été de 7 jours dans de l'eau de mer à 19°C, avec un renouvellement quotidien de l'eau et des pesticides, et un apport de *Skeletonema costatum*. Des prélèvements d'huîtres ont été réalisés à J0, J1, J3 et J7. Deux expériences ont été réalisées : l'une en condition d'oxygène normale, l'autre en hypoxie (oxygène à 30% de la normale). L'hémolymphe a été prélevée dans la cavité péricardique et les hémocytes ont été analysés en cytométrie en flux (Coulter EPICS XL 4, Beckman Coulter). Les résultats ont été exprimés sous forme de cytogrammes indiquant la taille (FSC), la complexité (SSC) et le canal de fluorescence correspondant au marqueur utilisé. La mortalité cellulaire a été quantifiée après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium. Il pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est lésée. Les activités enzymatiques (estérases, aminopeptidases) ont été quantifiées par des kits du commerce (« Cell Probe™ Reagents », Beckman Coulter). La phagocytose a été quantifiée par l'absorption de sphères fluorescentes (fluorospheres® carboxylate-modified yellow-green fluorescent (505/515 nm), 2 % solid, 1µm diameter, Interchim). L'activité de type phénoloxydase (PO) a également été suivie en spectrophotométrie, par oxydation de son substrat L-Dopa, dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe. Les résultats ont été analysés grâce à une transformation des données ($\text{Arcsin}(\sqrt{x})$) et une ANOVA.

Tableau 1 : composition finale du mélange de pesticides.

Molécule	Concentration
carbaryl	0.2 µg L ⁻¹
métolachlore	2 µg L ⁻¹
fosétyl aluminium	2 µg L ⁻¹
glyphosate	2 µg L ⁻¹
alachlore	2 µg L ⁻¹
diuron	4 µg L ⁻¹
atrazine	6 µg L ⁻¹
terbuthylazine	6 µg L ⁻¹

Résultats :

Condition d'oxygène normale

Aucune variation significative n'a été observée pour la mortalité hémocytaire et pour les aminopeptidases (données non montrées). L'activité de type PO a montré une augmentation importante lors du prélèvement à J3, mais sans différence entre famille ou présence/absence de pesticides (données non montrées). Le pourcentage de cellules possédant une activité estérase non-spécifique a présenté une diminution à J7 pour les animaux A et B contaminés (Figure 1). Le suivi de l'activité de phagocytose a également mis en évidence un effet des pesticides à J7, mais pas d'effet famille (Figure 2).

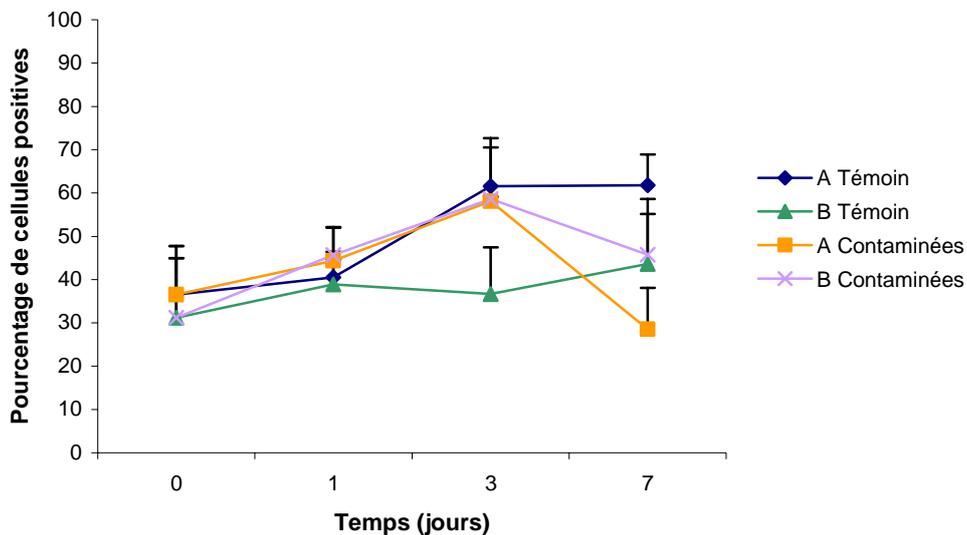


Figure 1 : évolution du pourcentage de cellules positives pour les estérases en fonction du temps pour les deux familles (A et B) et les deux conditions (contrôle et contaminé) en condition d'oxygène normal.

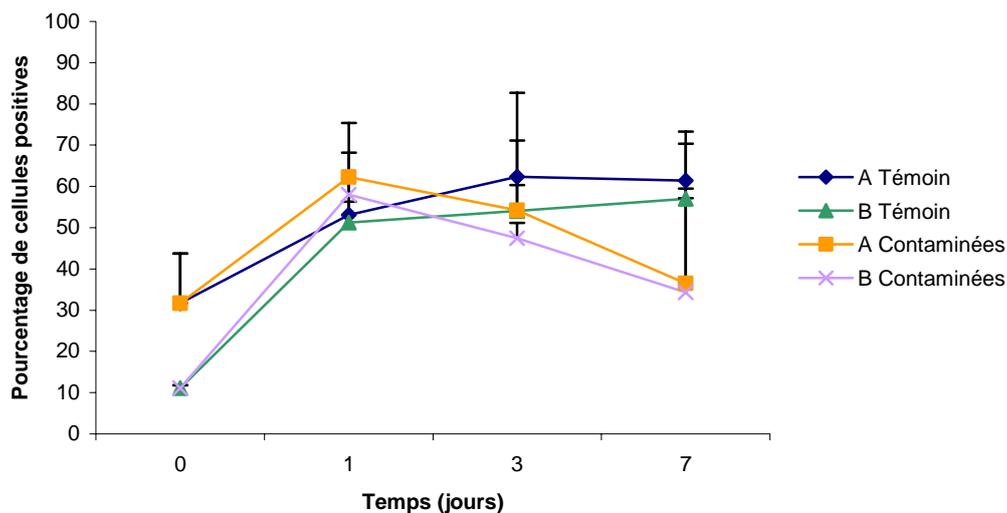


Figure 2 : évolution de l'activité de phagocytose en fonction du temps pour les deux familles (A et B) et les deux conditions (contrôle et contaminé) en condition d'oxygène normal.

Hypoxie

Aucune variation significative n'a été observée pour la mortalité hémocytaire et pour la détection des aminopeptidases (données non montrées). Les plus faibles pourcentages de cellules positives pour l'activité estérase ont été obtenus pour les animaux B contaminés (30% à J7, Figure 3). L'activité de phagocytose a évolué différemment pour les A et les B : à J7, les S présentaient la plus faible activité de phagocytose, qu'ils soient témoins ou contaminés (Figure 4).

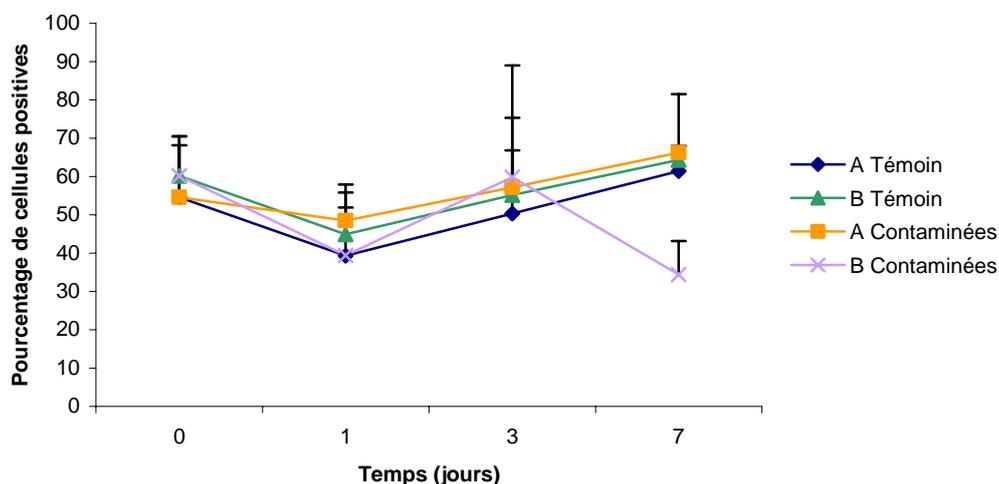


Figure 3 : évolution du pourcentage de cellules positives pour les estérases en fonction du temps pour les deux familles (A et B) et les deux conditions (contrôle et contaminé) en condition d'hypoxie.

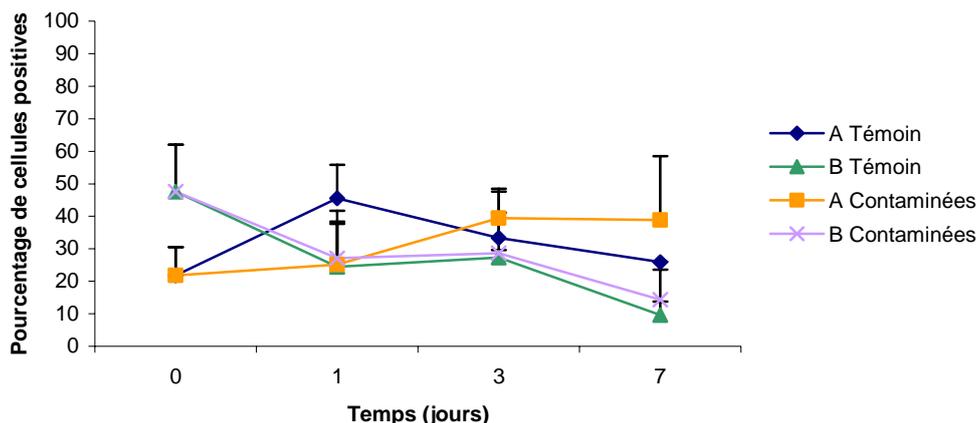


Figure 4 : évolution de l'activité de phagocytose en fonction du temps pour les deux familles (A et B) et les deux conditions (contrôle et contaminé) en condition d'hypoxie.

Discussion :

En condition d'oxygène normal, les animaux utilisés dans cette expérience semblent être sensibles à la présence de contaminants de type pesticides. Les activités estérase et de phagocytose sont modulées, avec des valeurs plus faibles en présence des pesticides. Aucune influence de l'origine génétique n'a été mise en évidence. En hypoxie, il semble que l'addition de facteurs défavorables (moins d'oxygène et présence de pesticides) ait un fort impact sur les S. Les différences connues entre A et B proviennent essentiellement d'un comportement différent pendant les épisodes de mortalité (4), où les conditions environnementales sont très loin de celles rencontrées au laboratoire. Cependant, une diminution de l'oxygène laisse apparaître des différences entre A et B, ce qui laisse penser que ces deux familles diffèrent également sur autre chose qu'une résistance à la mortalité.

Les pesticides semblent donc exercer un effet immunotoxique sur les cellules d'invertébré marin. Les concentrations utilisées dans ce travail étaient très proches de celles rencontrées dans l'environnement (2). Les pesticides sont capables de réduire les capacités de défense de ces animaux, et l'intervention d'autres molécules (HAP, PCB) pourrait éventuellement avoir un effet encore plus néfaste. Il est reconnu que certaines molécules ont *in vitro* un fort effet sur le système immunitaire (5,6).

Conclusion :

Ce travail a mis en évidence l'effet de pesticides sur le système immunitaire de *C. gigas* à des concentrations environnementales. Actuellement, la compréhension du phénomène de mortalité estivale des cheptels de *C. gigas* fait intervenir une explication multi-factorielle et l'influence des polluants tels que les pesticides est à prendre en compte. Cette diminution des capacités de défense pourrait augmenter la sensibilité de tels animaux à des maladies infectieuses. Ainsi, l'action conjuguée de différents facteurs serait capable d'induire une mortalité de ces animaux.

Bibliographie :

1. TORREILLES, J., GUERIN, M.C., and ROCH, P. (1997). Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 21 (3) : 267-275.

2. DDE, LBEM, IFREMER, DDASS (2000). Qualité des eaux littorales des pertuis charentais – Bilan et diagnostic .*IFREMER*, 130 p.
3. XUE, Q.G., RENAULT, T., and CHILMONCZYK, S. (2001). Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. - *Fish Shellfish Immunol.*, 11 (3) : 269-274.
4. DEGREMONT, 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 : 333p.
5. SAUVE, S., BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., SENEAL, L., GOUDREAU, P., and 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 (3-4) : 189-200.
6. GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H., and RENAULT, T. (2003). *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *In press in Fish and Shellfish Immunology*.