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

In vivo and in vitro search of biologic effects of atrazine on Pacific oyster,
Crassostrea gigas, haemocytes

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

¹Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER La Tremblade, LGP, BP 133, 17390 La Tremblade

²Laboratoire de Biologie et d'Environnement Marin, La Rochelle, av Michel Crépeau, 17042 La Rochelle Cedex

Résumé : La conchyliculture et notamment l'ostréiculture se sont beaucoup développées en France dans les dernières décennies. Le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime) est le premier bassin français producteur d'huîtres. Mais cette zone est également soumise à de nombreuses pollutions récurrentes, apportées principalement par la Charente. La recrudescence de l'utilisation d'herbicides en agriculture implique le transfert vers le milieu aquatique de nouveaux polluants dans les zones d'estuaires. L'atrazine fait partie de ces herbicides récemment introduits. Il convient de s'interroger sur ses effets néfastes sur les animaux vivant dans ces zones, tout particulièrement les huîtres. De plus, le développement de techniques permettant d'analyser l'impact d'un tel composé sur la biologie d'un bivalve pourrait aboutir à la mise en place d'outils diagnostiques adaptés au suivi du transfert de produits phytosanitaires vers les zones estuariennes. Dans ce contexte, l'influence de l'atrazine sur les mécanismes de défense développés par l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, espèce essentiellement élevée dans le bassin de Marennes-Oléron, a été testée. Le polluant a été testé d'une part *in vitro* sur des hémocytes, cellules du système immunitaire, en utilisant plusieurs concentrations (2, 20 et 200 mg.L⁻¹) et différents temps de contact (4 et 24 heures). D'autre part, le même composé a également été utilisé dans des expériences *in vivo* : dans ce cas, des huîtres ont été mises en contact avec deux concentrations d'atrazine (0,01 et 0,1 mg.L⁻¹) pendant deux mois. Dans les deux types d'expériences, les hémocytes ont été analysés en cytométrie de flux ; la viabilité ainsi que différentes activités cellulaires (activité phagocytaire, recherche d'enzymes hydrolytiques, cycle cellulaire) ont été déterminées. Les résultats montrent que l'atrazine n'induit pas de mortalité chez les hémocytes dans les conditions testées *in vitro*. En revanche, les expériences menées *in vivo* ont permis de mettre en évidence un possible effet génotoxique de ce polluant (apparition de nombreuses cellules en division).

Abstract : In the last decades, shellfish farming and in particular ostreiculture have developed in a significant way in France. Marennes-Oleron (Charente-Maritime) basin is the first French producer of oysters. But this area is also subjected to many recurring pollution, brought mainly by the Charente river. The recrudescence using of herbicides in agriculture including atrazine implies the transfer towards the aquatic environment of new pollutants in estuarine areas. Moreover industrial rejections bring many heavy metals in these same estuarine areas. It is appropriate of wondering on harmful effects of all these pollutants on the animals living in these areas, particularly oysters. Bivalve molluscs have been postulated as ideal indicator organisms because of their way of life. They filter large volumes of seawater and may therefore concentrate contaminants within their tissues. Moreover, the development of techniques allowing the analysis of the impact of such compounds on bivalve biology could lead to the installation of diagnostic tools adapted to the follow-up of the transfer of pollutants towards the estuarine areas. In this context, the influence of atrazine on the mechanisms of defence developed by Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, species primarily high in the basin of Marennes-Oléron, was tested. Atrazine was tested in vitro on the defence cells of the organism, haemocytes, with several concentrations (2,20 and 200 mg.L⁻¹) and several times of contact (4 and 24 hours). Atrazine was also tested in in vivo experiments : oysters have been in contact with atrazine (0.01 and 0.1 mg.L⁻¹) for two months. In both experiments types, haemocytes were analyzed by flow cytometry; viability and cellular activities (phagocytosis activity, hydrolytic enzymes, cell cycle) were monitored. The results show that atrazine induce no mortality on the haemocytes under the conditions tested in vitro. But experiments carried out in vivo allowed us to shiw a possible genotoxic effect of this pollutant (increase of number of dividing cells).

Mots-clés : *Crassostrea gigas*, hémocytes, cytométrie de flux, atrazine.

Key-words : *Crassostrea gigas*, haemocytes, flow cytometry, atrazine

Introduction

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

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

Les données disponibles à l'heure actuelle montrent l'altération des capacités du système immunitaire chez des mollusques bivalves exposés à des contaminants. Depuis quelques années, l'étude de la modulation du système immunitaire ou immunomodulation chez les mollusques marins est devenue l'une des voies de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets physiologiques de facteurs environnementaux sur les capacités immunitaires (Oubella et Auffret, 1995).

Cette étude a consisté à tester l'effet d'un polluant environnemental, l'atrazine, sur le système immunitaire de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg), par des mises en contact d'hémocytes avec le polluant *in vitro* et *in vivo* avec des adultes. En effet, la zone d'élevage de Marenne-Oléron reçoit les apports de rivières transportant de nombreux polluants, notamment les produits issus de l'agriculture. L'atrazine, un désherbant introduit massivement durant ces dernières années, fait partie de ces produits. Elle est principalement utilisée sur les cultures de céréales. Absorbée par les racines, elle provoque une inhibition puissante du photosystème II, maillon central de la photosynthèse chez tous les organismes autotrophes et notamment le phytoplancton.

La réponse immunitaire des huîtres creuses a été évaluée par le suivi de différentes activités enzymatiques et la mortalité des hémocytes ; l'outil de mesure choisi a été la cytométrie de flux, pour ses nombreuses possibilités d'analyses au niveau cellulaire.

1. Matériels et Méthodes

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

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

Les données ont été testées en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour échantillons indépendants. A la suite de ce test, s'il aboutissait au rejet de H₀, le test *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (SNK) a été utilisé pour démontrer un effet dose.

2. Résultats/Discussion

2.1. Atrazine

L'ensemble des tests statistiques montre qu'il n'y a pas d'effet dose de l'atrazine sur les propriétés immunitaires suivies des huîtres ni à 4 heures, ni à 24 heures aux doses utilisées. Les résultats des test *in vitro* sont exprimés sous forme de courbe (Figures 1 et 2).

4 heures

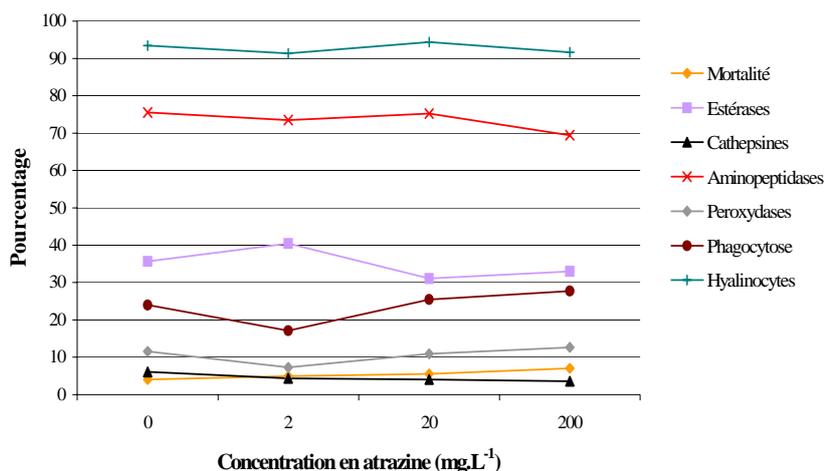


Figure 1 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations d'atrazine *in vitro* (0 ; 2 ; 20 ; 200 mg.L⁻¹) à l'issue de 4 heures d'incubation. Les essais de mise en contact des hémocytes avec les polluants ont été réalisés sur trois pools différents d'hémocytes.

24 heures

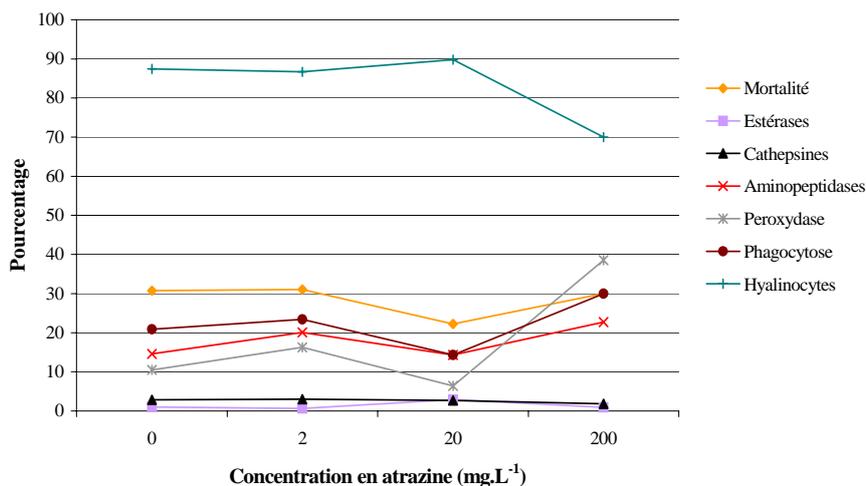


Figure 2 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations d'atrazine *in vitro* (0 ; 2 ; 20 ; 200 mg.L⁻¹) à l'issue de 24 heures d'incubation. Les essais de mise en contact des hémocytes avec les polluants ont été réalisés sur trois pools différents d'hémocytes.

Les analyses *in vivo* ont été réalisées sur des pools de 4 individus seulement. Les tests statistiques montrent que l'atrazine ne semble avoir aucun effet sur les paramètres hématocytaires testés après un contact durant 3 semaines, à l'exception du nombre de cellules en division, qui sont les seuls résultats présentés ici.

En temps normal, les cellules 2n sont majoritaires (Tableau A). Après avoir reçu de l'atrazine pendant 3 semaines au cours de la première expérience, le nombre de cellules 4n augmente de façon significative pour le lot ayant reçu 0,1 mg.L⁻¹ d'atrazine (Tableau B). En revanche, lors de la deuxième expérience, le nombre de cellules 4n est également important dans le témoin et dans les lots ayant reçu l'atrazine (Tableau C).

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

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

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

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

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

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

L'atrazine n'induit pas d'effet sur les hémocytes dans les conditions testées *in vitro*. En revanche, les expériences menées *in vivo* ont permis de détecter une variation concernant le nombre de cellules en division, ce qui permet d'envisager un possible effet génotoxique de ce phytosanitaire. Cependant ce résultat n'est pas constant, car dans l'expérience 2, un nombre élevé de cellules en division est également retrouvé en absence d'atrazine. Ceci pourrait éventuellement s'expliquer par les variations des conditions physico-chimiques du milieu liées aux fortes précipitations des derniers mois.

Les études concernant les effets de ce polluant chez les vertébrés ne sont pas nombreuses : elles ont été réalisées principalement sur des lignées de cellules de mammifères, en particulier humaines. Lioi *et al.* (1998b) utilisent des

concentrations comprises entre 1 et 11 mg.L⁻¹ sur des cultures de lymphocytes humains, avec un temps d'exposition de 72 heures. Des concentrations élevées ont été utilisées dans ce travail car une réponse rapide des cellules était recherchée. En effet, aucun système de culture ne permet de maintenir ces cellules *in vitro* et elles ne conservent pas longtemps leurs propriétés une fois prélevées. De plus il n'existe pas à l'heure actuelle de lignées cellulaires de mollusques bivalves sur lesquels il aurait été possible de réaliser les essais.

Les résultats rapportés ici se rapprochent de ceux rapportés dans la littérature. Les études de Robert *et al.* (1986) et His et Seaman (1993) sur la toxicité de l'atrazine sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* ne montrent pas d'effet de cette molécule à ce stade du développement. L'atrazine ne semble pas avoir non plus d'effet écotoxicologique détectable chez les mollusques d'eau douce (Roses *et al.*, 1999). Les études se sont réalisées sur la génotoxicité de l'atrazine chez l'Homme et les mammifères ont montré que cette substance n'est pas un inducteur d'aneuploïdie chez l'Homme. Elle n'est pas génotoxique ni mutagène chez les mammifères (Kligerman *et al.*, 2000). En comparaison, des études similaires portant sur d'autres herbicides (glyphosate, vincozolin) ont mis en évidence un potentiel mutagène de ces substances sur des cultures de lymphocytes de bovins (Lioi *et al.*, 1998a).

L'atrazine ne semble donc pas impliquer d'effets significatifs quelque soit le niveau considéré, ce qui est rassurant pour les populations qui y ont été confrontées. Il serait néanmoins intéressant de répliquer l'expérience retranscrite ici afin d'obtenir des résultats fiables concernant les possibles augmentations du nombre de cellules en division en présence d'atrazine.

2.2. Mercure

Les tests ont permis de suivre l'effet du mercure sur la mortalité et certains paramètres immunitaires. Les courbes et l'analyse statistique permettent de montrer l'effet dose-dépendant du mercure sur la mortalité des cellules après quatre heures d'incubation (Figure 3).

Ce polluant est connu pour sa forte toxicité et sa bioaccumulation. Les études sur ce composé sont nombreuses en écotoxicologie des mammifères marins, pour qui l'accumulation du mercure est une cause importante de mortalité (Cossa et Fichet, 1999). Les résultats montrent que le mercure provoque une mortalité croissante des hémocytes avec les concentrations utilisées (0,5-5-50 mg.L⁻¹) dès 4 heures de mise en contact. Cet effet rapide a été rapporté par Cheng et Sullivan (1984) sur les hémocytes de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*: la mortalité des hémocytes augmentait dès 2 heures de contact pour une concentration de 5 ppm. La toxicité de ce polluant est confirmée dans cette étude chez l'huître creuse avec les concentrations choisies.

Ce résultat permet de valider la méthode utilisée dans cette expérience.

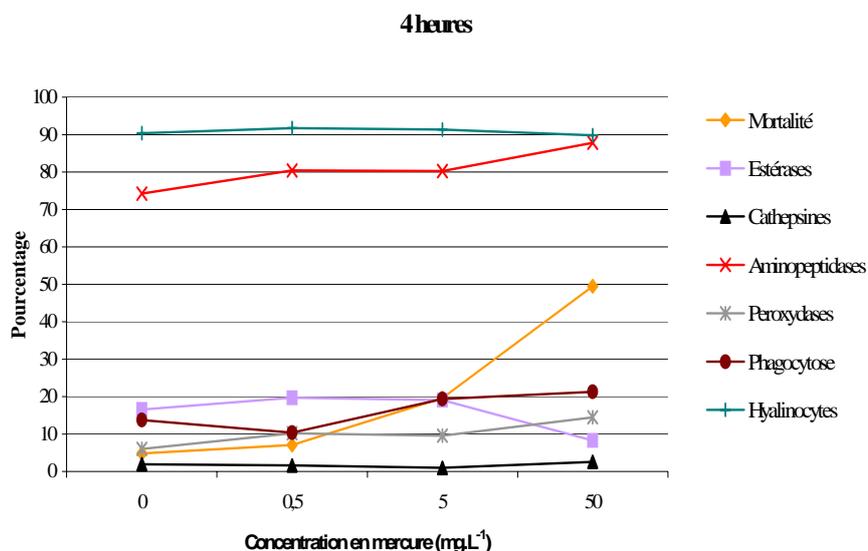


Figure 3 : évolution des différents paramètres testés en cytométrie de flux en fonction des différentes concentrations mercure *in vitro* (0 ;0.5 ;5 ;50 mg.L⁻¹) à l'issue de 4 heures d'incubation. Les essais de mise en contact des hémocytes avec les polluants ont été réalisés sur trois pools différents d'hémocytes.

Conclusion

Cette étude a permis de tester la sensibilité des huîtres creuses à divers micropolluants et leurs influences sur la réponse immunitaire de ces animaux. Les résultats permettent de conclure que l'atrazine ne semble pas présenter de toxicité aiguë, ni de toxicité chronique sur les hémocytes, à l'exception des cellules en division. *A contrario*, le mercure est un polluant très actif. Il serait donc intéressant de mener une expérience *in vivo* comme celle de l'atrazine avec du mercure pour étudier la toxicité chronique de ce composé.

Ce travail a permis de montrer que le développement de nouvelles techniques (cytométrie de flux) permettant l'analyse de l'impact d'un composé tel que l'atrazine sur la biologie d'un bivalve marin pourrait aboutir à la mise en place d'outils diagnostiques adaptés au suivi du transfert de produits phytosanitaires vers les zones estuariennes.

Bibliographie

- CHENG, T.C., et SULLIVAN, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, 14 : 305-315.
- COSSA, D., et FICHET, A. (1999). La dynamique du mercure. *Programme scientifique Seine-Aval*, n°11.

- HIS, E., et SEAMAN, M.N.L. (1993). Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES C.M., Marine Environmental Quality Committee*.
- KLIGERMAN, A.D., DOERR, C.L., TENNANT, A.H., et ZUCKER, R.M. (2000). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. *In vitro* studies. *Mutation Research*, 465 : 53-59.
- LIOI, M.B., SCARFI, M.R., SANTORO, A., BARBIERI, R., ZENI, O., DI BERARDINO, D., et URSINI, M.V. (1998a). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research*, 403 : 13-20.
- LIOI, M.B., SCARFI, M.R., SANTORO, A., BARBIERI, R., ZENI, O., SALVEMINI, F., DI BERARDINO, D., et URSINI, M.V. (1998b). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32 : 39-46.
- OUBELLA, R., et AUFFRET, M. (1995). Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Rade de Brest. *Acte de Rencontre Scientifique Internationale (Programme Rade de Brest)*, 1 : 307-319.
- ROBERT, R., HIS, E., et MAURER, D. (1986). Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis*, 15 : 319-325.
- ROSES, N., POQUET, M., et MUNOZ, I. (1999). Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. And *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). *Journal of Applied Toxicology*, 19 : 351-356.