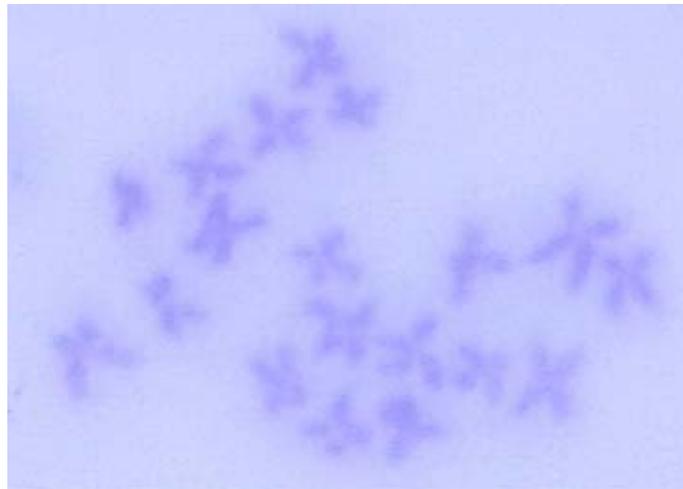




**Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006  
Convention 2003-RPC-A-114 "Génétique"  
Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les  
apports de la génétique  
Année 2003**

**Etude des anomalies chromosomiques chez  
*Crassostrea gigas***

**K. Bouilly , M. Bonnard, S. Grouhel, S. Lapègue**



**IFREMER  
Laboratoire de Génétique et Pathologie**

**Ronce-Les-Bains  
17390 La Tremblade  
Tél. 05 46 36 98 36  
Fax. 05 46 36 37 51**



## SOMMAIRE

<b>1. CONTEXTE DES ETUDES MENEES EN 2003 .....</b>	<b>4</b>
<b>2. IMPACT DE L'ATRAZINE SUR L'ANEUPLOÏDIE CHEZ LES HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....</b>	<b>5</b>
2.1 IMPACT DE L'ATRAZINE SUR L'ANEUPLOÏDIE CHEZ DES HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ADULTES EXPOSEES A L'ATRAZINE PENDANT DEUX MOIS PUIS REMISES DANS DES CONDITIONS NON POLLUEES PENDANT UN AN ET DEMI .....	5
2.2 IMPACT DE L'ATRAZINE SUR L'ANEUPLOÏDIE D'HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> JUVENILES AYANT SUBI UNE CONTAMINATION AU STADE LARVAIRE .....	7
<b>3. IMPACT DU CADMIUM SUR L'ANEUPLOÏDIE CHEZ LES HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>. 9</b>	<b>9</b>
3.1. IMPACT DU CADMIUM SUR UNE POPULATION D'HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ADULTES CONTAMINEES ..	10
3.2. IMPACT DU CADMIUM SUR UNE POPULATION D'HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> JUVENILES CONTAMINEES	12
3.3. IMPACT DU CADMIUM SUR LA DESCENDANCE D'HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> CONTAMINEES.....	14
<b>4. ETUDE DE L'ANEUPLOÏDIE CHEZ DES HUITRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> EN MILIEU NATUREL .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RELATION ENTRE MORTALITES ESTIVALES DIFFERENTIELLES ET ANEUPLOÏDIE (MOREST)?.....</b>	<b>18</b>
<b>6. PUBLICATIONS/COLLOQUES .....</b>	<b>20</b>
6.1. PUBLICATIONS .....	20
6.2. COMMUNICATIONS ORALES .....	21
<b>7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>22</b>

## 1. Contexte des études menées en 2003

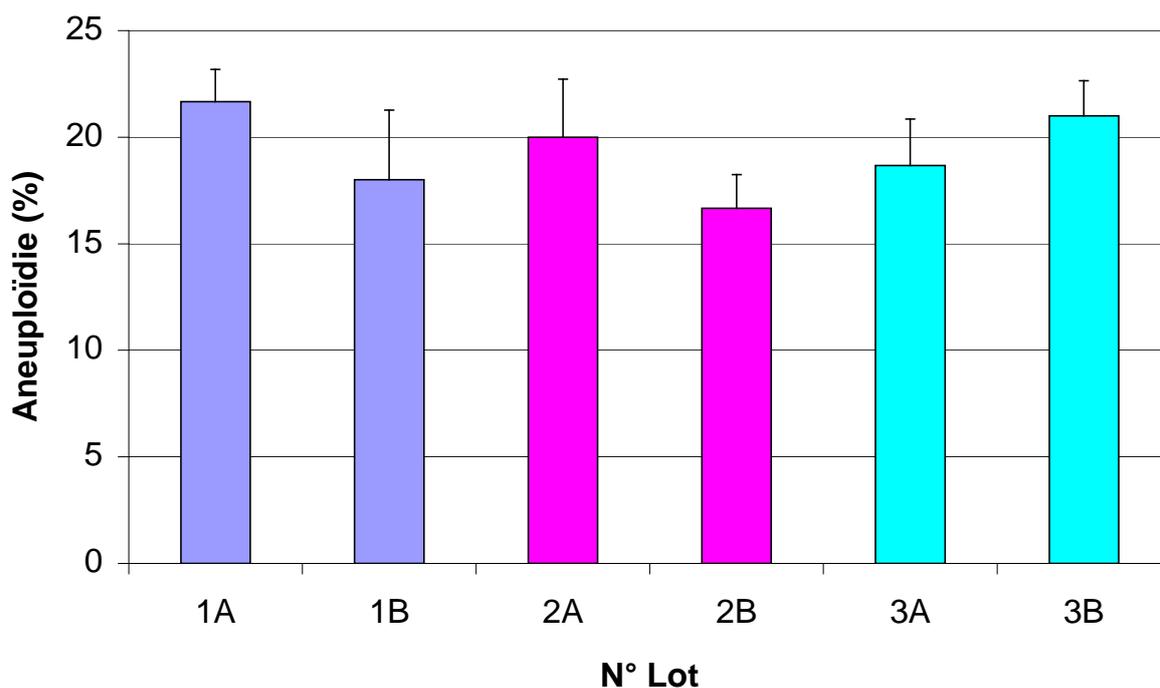
Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules présentant un nombre anormal de chromosomes ( $2n = 19, 18$  ou même  $17$  au lieu de  $2n = 20$ ). Or, une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite à de nombreuses reprises (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitão *et al.*, 2001a ; Zouros *et al.*, 1996). Bien que les causes environnementale et /ou génétique de l'aneuploïdie restent encore largement inconnues, des études récentes ont permis de poser l'hypothèse d'une base génétique large dans la détermination de ce caractère (Leitão *et al.*, 2001b). De plus, un effet toxique direct de l'atrazine (herbicide couramment utilisé dans la région) sur le génome d'une population d'huîtres creuses a été mis en évidence en milieu contrôlé (Bouilly *et al.*, 2003) et, plus inquiétant, une persistance de cet effet dans le temps (2 mois et demi) sur une même génération et chez des descendants d'animaux exposés a été observée (Bouilly *et al.*, soumis). L'étude de l'impact du cadmium a été démarrée en 2002 en exposant des animaux et en obtenant une descendance de ces animaux.

Cette année 2003 a été consacrée à la poursuite de l'étude sur l'atrazine en observant les animaux exposés il y a un an et demi. De plus, l'impact du cadmium, métal lourd pouvant être présent à des concentrations non négligeables dans la région, a été observé sur le taux d'aneuploïdie des animaux exposés et naissains produits en 2002. Enfin, la relation entre mortalité et taux d'aneuploïdie a été étudiée en comparant des échantillons d'animaux dont les familles produites dans le cadre du programme Morest ont subi un faible ou fort taux de mortalité.

## 2. Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez les huîtres *Crassostrea gigas*

### 2.1 Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine pendant deux mois puis remises dans des conditions non polluées pendant un an et demi

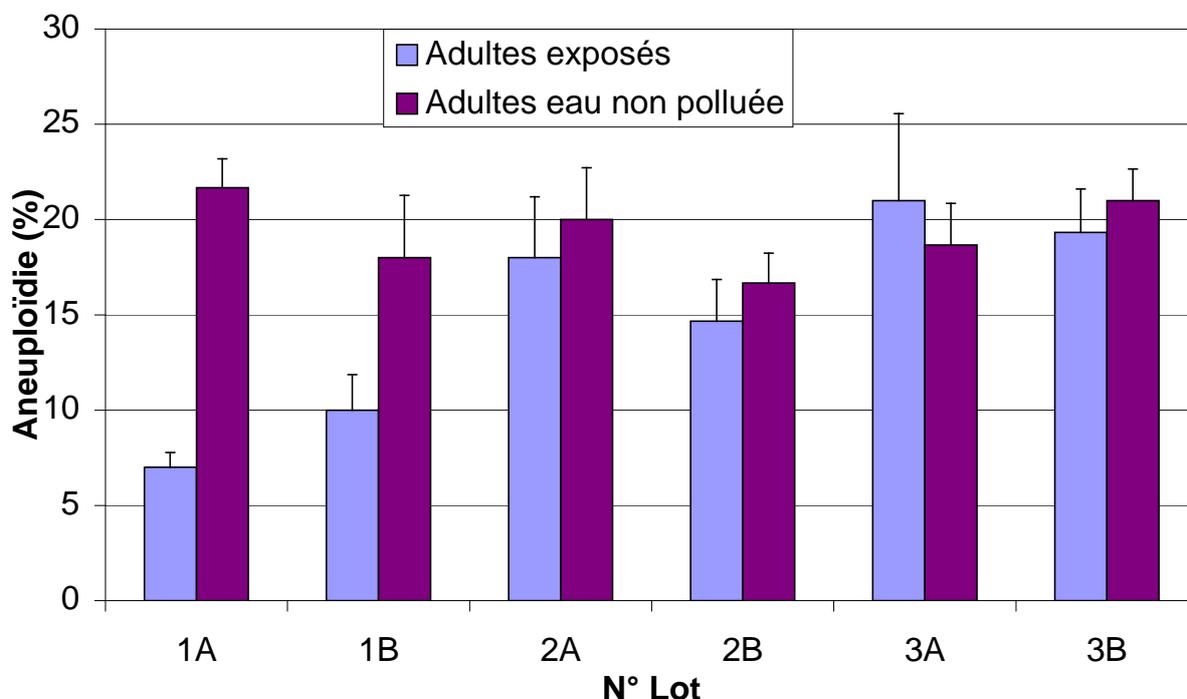
Nous avons déjà établi que l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez des huîtres juvéniles persistait dans le temps (Bouilly *et al.*, soumis). En effet, un échantillon de la population d'huîtres juvéniles exposées aux différentes concentrations d'atrazine (0 ; 0,01 et 0,1 mg/l) pendant trois mois et demi avait été replacé dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi et il s'était avéré qu'aucune différence significative entre les deux échantillons n'avait été observée. Nous avons donc souhaité savoir si une période plus longue dans une eau non polluée pouvait avoir un effet réversible sur le taux d'aneuploïdie des huîtres. Pour cela, un échantillon de la population d'adultes exposée aux différentes concentrations d'atrazine pendant deux mois a été replacé dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi. Les animaux ont été placés en mer puis en claire avant de revenir à l'écloserie. Nous les avons placés en salle de maturation en augmentant progressivement la température de l'eau jusqu'à 20°C et la quantité de nourriture pendant un mois et demi afin que les huîtres soient en pousse et qu'elles aient donc une meilleure activité mitotique. Les animaux ont ensuite été fixés mi-février 2003. Les lames ont été réalisées de mi-février à mi-mars. Nous avons étudié 10 huîtres par lot. Les lames ont été lues de février à septembre. La Figure 1 présente les pourcentages d'aneuploïdie de chaque lot. Les taux d'aneuploïdie dans les lots 1(A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3(A et B, 0,1 mg/l) ont varié de 18 à 21,67%, 16,67 à 20% et 18,67 à 21% respectivement. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,719$  ;  $p=0,400$ ) ni entre les traitements ( $F=0,297$  ;  $p=0,744$ ). De plus, si nous comparons deux à deux chaque lot, nous n'observons aucune différence significative ni entre les réplicats ni entre les traitements.



**Figure 1 : Pourcentage d’aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l’atrazine pendant deux mois puis remises dans des conditions non polluées pendant un an et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l)**

Nous avons souhaité comparer les résultats obtenus avec les adultes exposés pendant deux mois avec ceux obtenus après avoir replacé la quantité restante d’adultes dans des conditions non polluées pendant un an et demi (Figure 2). Les taux d’aneuploïdie des adultes exposés à l’atrazine avaient varié de 7 à 10%, 14,67 à 18% et 19,33 à 21% pour les lots 1, 2 et 3 respectivement. L’analyse statistique nous montre qu’il n’y a pas de différence significative entre les réplicats ( $F=0,591$  ;  $p=0,444$ ) et qu’il existe une différence significative à la fois entre les traitements ( $F=5,446$  ;  $p=0,006$ ) et entre les deux groupes d’adultes ( $F=8,994$  ;  $p=0,003$ ). Au vu de ces résultats, nous pourrions penser que l’impact observé au bout de deux mois d’exposition à l’atrazine n’a pas persisté dans le temps (après retour dans des conditions non polluées pendant un an et demi) et qu’il existerait donc des mécanismes de détoxification. Or, les taux d’aneuploïdie observés après retour dans des conditions non polluées sont aussi élevés que ceux observés dans le lot ayant reçu la plus forte concentration d’atrazine donc nous ne pouvons pas conclure sur une persistance de l’effet observé ou non. Ce fort taux d’aneuploïdie retrouvé même chez les témoins est-il dû à des conditions environnementales particulières? Il est difficile de statuer sur les conditions d’un environnement naturel car de nombreux polluants peuvent y être présents en quantité plus ou moins faible. Le groupe

d'adultes qui avait été remis normalement dans des conditions supposées non polluées avait aussi un index mitotique plus faible que lors de la première expérience. En effet, pour certains individus, plusieurs lames ont été requises pour trouver 30 métaphases comptables. Cette faible activité mitotique a-t-elle pu avoir une influence sur la fragilité chromosomique (aneuploïdie) observée?



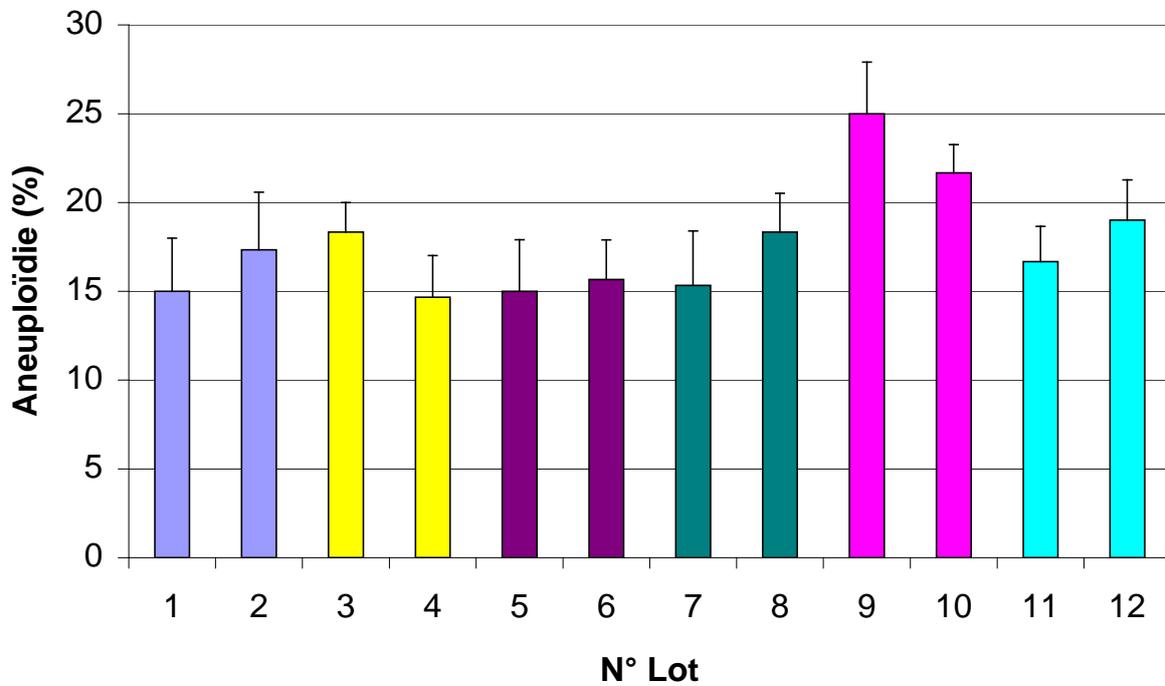
**Figure 2 : Comparaison entre le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine pendant deux mois et un échantillon de la même population remplacé dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l)**

## **2.2 Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles ayant subi une contamination au stade larvaire**

Nous avons aussi souhaité évaluer l'impact de l'atrazine après une exposition à ce produit plus précoce c'est-à-dire pendant l'élevage larvaire. Pour cela, des croisements ont eu lieu avec un pool de 6 femelles et 6 mâles à la fin du mois de juin 2002. Nous avons exposé les larves aux mêmes concentrations et à des concentrations plus faibles pouvant se retrouver dans le bassin de Marennes-Oléron: 0,1 µg/l, 0,4 µg/l et 1µg/l. Nous avons évalué les taux d'éclosion et réalisé un suivi de la croissance larvaire (Bouilly, 2002). Ensuite, les larves pédivéligères ont été placées en micronurserie. Lorsque les huîtres juvéniles ont eu une taille suffisante (1 cm) pour les sortir de cette salle, nous les avons placées en salle de maturation

jusqu'en septembre 2002. Puis, elles ont été conservées en claire jusqu'à la mi janvier 2003. Elles sont revenues en écloserie à cette date et nous les avons conditionnées en serre. Les tissus ont été fixés au début du mois de février 2003. Les lames ont toutes été réalisées à la suite jusqu'à la mi-mars 2003. Les lames ont été lues de mai à juillet 2003. Cette étude a été réalisée afin de savoir si une exposition à l'atrazine pendant le développement larvaire avait une plus grande incidence sur le taux d'aneuploïdie. Les taux d'aneuploïdie dans les lots témoins 1 et 2, lots 3 et 4 (0,1 µg/l), lots 5 et 6 (0,4 µg/l), lots 7 et 8 (1µg/l), lots 9 et 10 (10µg/l) et lots 11 et 12 (100µg/l) ont varié de 15 à 17,33%, 14,67 à 18,33%, 15 à 15,67%, 15,33 à 18,33%, 21,67 à 25% et 16,67 à 19% respectivement (Figure 3). Des analyses statistiques ont révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F=0,024$  ;  $p=0,878$ ) mais qu'il était significativement différent selon les traitements ( $F=2,663$  ;  $p=0,026$ ). De plus, nous avons aussi pu mettre en évidence que le pourcentage d'aneuploïdie pour les témoins n'était pas statistiquement différent de celui des lots 3 et 4 ( $F=0,016$  ;  $p=0,900$ ), des lots 5 et 6 ( $F=0,084$  ;  $p=0,773$ ), des lots 7 et 8 ( $F=0,053$  ;  $p=0,820$ ) et des lots 11 et 12 de plus forte concentration ( $F=0,388$  ;  $p=0,537$ ). En revanche, une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les lots 9 et 10 et tous les autres lots, c'est à dire avec les témoins ( $F=6,735$  ;  $p=0,014$ ), les lots 3 et 4 ( $F=9,704$  ;  $p=0,004$ ), les lots 5 et 6 ( $F=10,494$  ;  $p=0,003$ ), les lots 7 et 8 ( $F=6,714$  ;  $p=0,014$ ) et les lots 11 et 12 ( $F=6,009$  ;  $p=0,019$ ) a été observée. Les taux d'aneuploïdie des lots 11 et 12 de plus forte concentration, quant à eux, n'étaient pas statistiquement différents de ceux des lots témoins ( $F=0,388$  ;  $p=0,537$ ), des lots 3 et 4 ( $F=0,409$  ;  $p=0,527$ ), des lots 5 et 6 ( $F=1,108$  ;  $p=0,299$ ) et des lots 7 et 8 ( $F=0,171$  ;  $p=0,681$ ). Ces résultats nous montrent qu'il n'existe pas de corrélation positive entre le taux d'aneuploïdie observé chez des huîtres juvéniles exposées à l'atrazine pendant leur développement larvaire et les concentrations d'atrazine étudiées. L'exposition à l'atrazine pendant 3 semaines a été suivie d'une période en milieu non pollué pendant 6 mois. Les huîtres n'ont peut-être pas été assez longtemps exposées à l'atrazine pour qu'un effet soit observable ou bien, des mécanismes de détoxification existeraient. Il aurait été intéressant d'étudier l'aneuploïdie au stade larvaire mais le protocole n'est toujours pas au point à ce stade de développement et une taille minimale est nécessaire pour faire les analyses au stade naissain. De plus forts taux d'aneuploïdie ont été observés pour les lots 9 et 10 (10 µg/l). Nous aurions pu penser que cette concentration était une dose seuil au delà de laquelle un impact pouvait être observé. Or, nous n'observons pas cette hausse du taux d'aneuploïdie pour les lots 11 et 12 de plus forte concentration (100 µg/l). Nous pouvons suggérer que les larves exposées à la plus forte concentration d'atrazine aient été plus aneuploïdes, les plus

aneuploïdes étant mortes. Ceci est une supposition étant donné qu'à l'heure actuelle, aucune relation entre mortalité et aneuploïdie n'a été établie. Il serait très intéressant de savoir si au-delà d'un certain seuil d'aneuploïdie, les animaux meurent. Il est difficile de répondre à cette question vu que nous ne pouvons analyser que du matériel vivant, en activité mitotique.



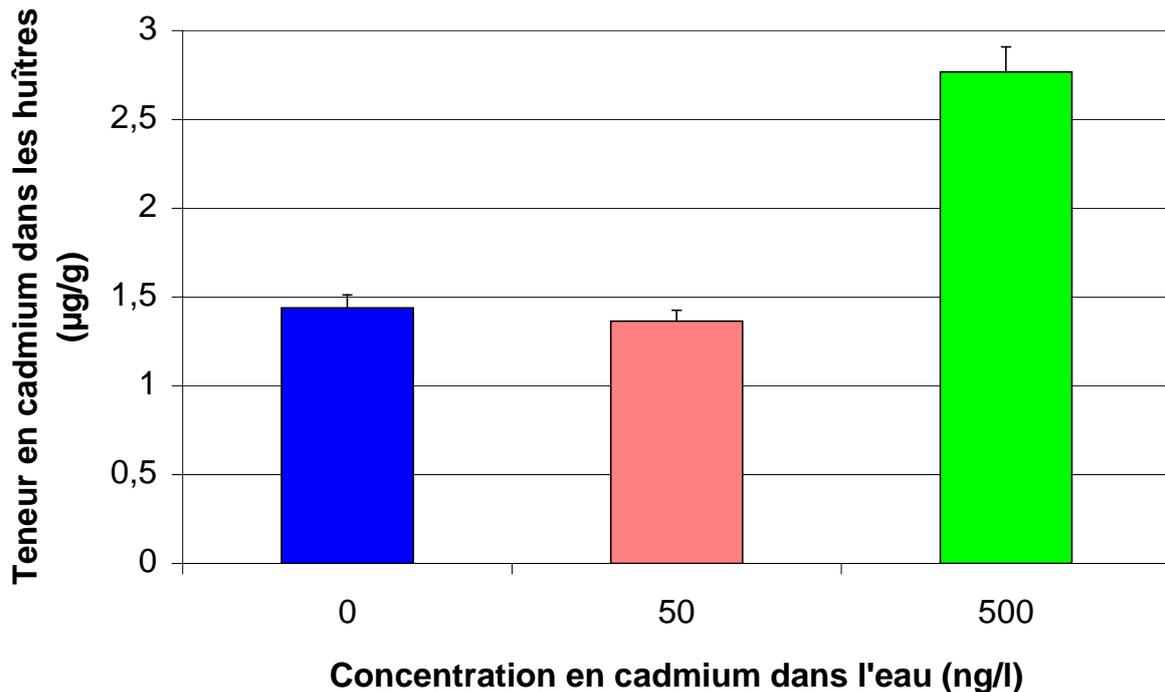
**Figure 3 : Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine pendant le stade larvaire (3 semaines) puis replacées dans des conditions non polluées (6 mois) en fonction du lot : lots 1, 2 (0 µg/l), lots 3, 4 (0,1 µg/l), lots 5, 6 (0,4 µg/l), lots 7, 8 (1 µg/l) lots 9, 10 (10 µg/l) et lots 11, 12 (100 µg/l)**

### **3. Impact du cadmium sur l'aneuploïdie chez les huîtres *Crassostrea gigas***

Le cadmium est un des métaux lourds le plus fortement retrouvé dans le bassin de Marennes-Oléron. Nous savons que les huîtres bioaccumulent ce polluant dans leurs tissus donc nous aimerions savoir si ce facteur environnemental pourrait aussi avoir un impact sur le génome des huîtres *Crassostrea gigas*. Pour cela, nous suivons le même protocole établi pour l'atrazine. Six lots ont été établis: 3 lots (un lot témoin (lot 1), un lot représentant la valeur pic retrouvée dans le bassin de Marennes-Oléron: 50 ng/l (lot 2) et un lot représentant une valeur dix fois supérieure: 500 ng/l (lot 3)) et leurs répliqués (A et B).

### **3.1. Impact du cadmium sur une population d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes contaminées**

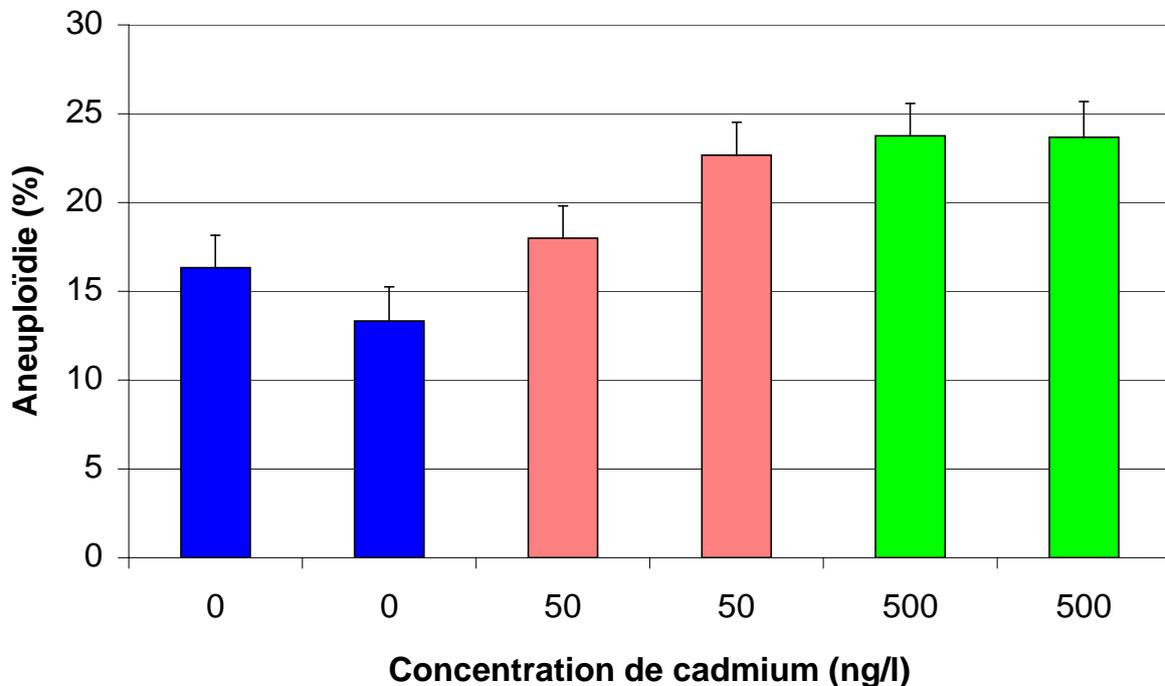
Une population d'huîtres adultes a été exposée au cadmium pendant deux mois (de fin mars 2002 à fin mai 2002). Cette durée correspond au temps de maturation des huîtres. Les huîtres ont subi une période d'acclimatation pendant deux semaines en circuit ouvert. Ensuite, les animaux évoluaient dans un circuit fermé avec renouvellement d'eau, de cadmium et de nourriture chaque jour. Le cadmium (aux concentrations testées) n'avait pas montré d'effet significatif sur la mortalité des huîtres adultes (Bouilly, 2002). La quantification du cadmium au sein des huîtres a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) de l'Université de La Rochelle. Les échantillons ont été préparés en juillet 2002 puis analysés en mars 2003 au LBEM. Les résultats sont présentés sur la Figure 4. Avec une exposition au cadmium de 500 ng/l pendant deux mois, les huîtres ont une teneur en cadmium qui a doublé par rapport au lot témoin. Par contre, le lot témoin et le lot ayant été exposé à une concentration de cadmium de 50 ng/l ont montré la même teneur de cadmium au sein des huîtres. L'eau utilisée pour alimenter tous les bacs provenait du bassin de Marennes-Oléron. Les huîtres, avant leur utilisation pour la réalisation de cette expérience, provenaient aussi du milieu naturel donc il est normal de retrouver une teneur de 1,44 µg/g de poids sec dans les lots témoins. Vu que la teneur en cadmium de 50 ng/l est une valeur pic retrouvée dans le bassin et que nous avons utilisée l'eau du bassin pour la réalisation de cette expérience au sein de l'écloserie, il est normal de retrouver une teneur en cadmium au sein des huîtres exposée à 50 ng/l significativement non différente de celle du lot témoin.



**Figure 4 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au cadmium pendant deux mois (en µg/g de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en ng/l)**

Les animaux (12 par lot) ont été fixés au mois de mai 2002 et les lames ont été réalisées à la suite, jusqu'au début du mois de juillet 2002. Les lames ont pu être lues de décembre 2002 à février 2003. La Figure 5 présente les pourcentages d'aneuploïdie de chaque lot. Malheureusement, certaines huîtres avaient un faible index mitotique et il a été impossible de compter 30 métaphases dans certains individus. Donc, tous les lots ont un effectif de 10 huîtres analysées sauf les lots 1B (6 huîtres analysées car un problème d'huîtres triploïdes s'est ajouté) et 3A (8 huîtres analysées). Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les réplicats ( $F=0,111$  ;  $p=0,740$ ) mais que des différences significatives existaient selon les traitements ( $F=9,929$  ;  $p=0,000$ ). Si nous comparons les lots témoins avec ceux ayant reçu un traitement au cadmium de 50 ng/l nous observons une différence significative entre les lots ( $F=8,215$  ;  $p=0,007$ ), de même si nous comparons les lots témoins avec ceux ayant reçu un traitement au cadmium de 500 ng/l ( $F=19,962$  ;  $p=0,000$ ). Par contre, il n'a pas été observé de différence significative entre les lots ayant reçu des traitements au cadmium ( $F=3,161$  ;  $p=0,084$ ). Il semblerait donc au vu de ces résultats que le cadmium ait un impact sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses adultes. L'impact du cadmium sur l'aneuploïdie peut apparaître dès la concentration de 50 ng/l. Vu

que les huîtres exposées à cette dose de cadmium ont la même teneur en cadmium que les huîtres témoins le cadmium jouerait un rôle plus au niveau qualitatif que quantitatif. Ces résultats restent à être confirmés grâce aux expériences suivantes.

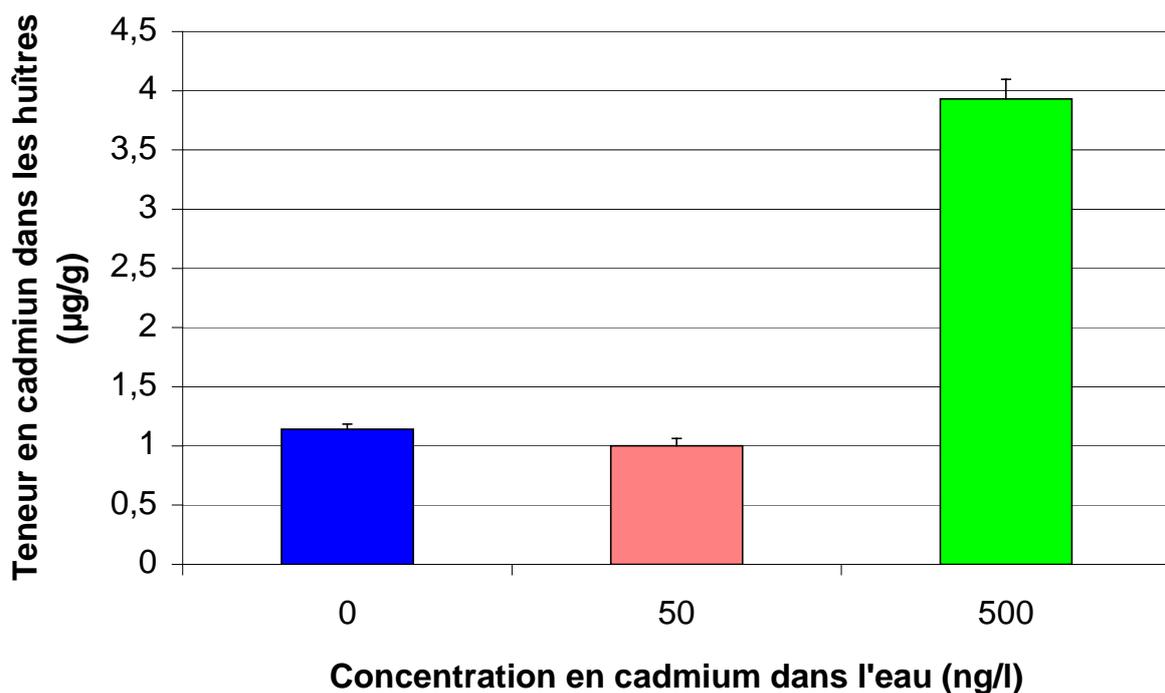


**Figure 5 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à différentes concentrations de cadmium pendant deux mois**

### **3.2. Impact du cadmium sur une population d'huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles contaminées**

Des juvéniles ont été exposés au cadmium pendant trois mois et demi (fin mai à début septembre 2002). Ils ont évolué dans un circuit fermé avec renouvellement d'eau, de cadmium et de nourriture chaque jour. Le cadmium (aux concentrations testées) n'avait pas montré d'effet significatif sur la mortalité des huîtres juvéniles (Bouilly, 2002). La quantification du cadmium au sein des huîtres a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) de l'Université de La Rochelle. Les échantillons ont été préparés et analysés en juin 2003 au LBEM. Les résultats sont présentés sur la Figure 6. Avec une exposition au cadmium de 500 ng/l pendant trois mois et demi, les huîtres ont une teneur en cadmium qui a triplé par rapport au lot témoin. Par contre, le lot témoin et le lot ayant été exposé à une concentration de cadmium de 50 ng/l ont montré la même teneur en cadmium au sein des

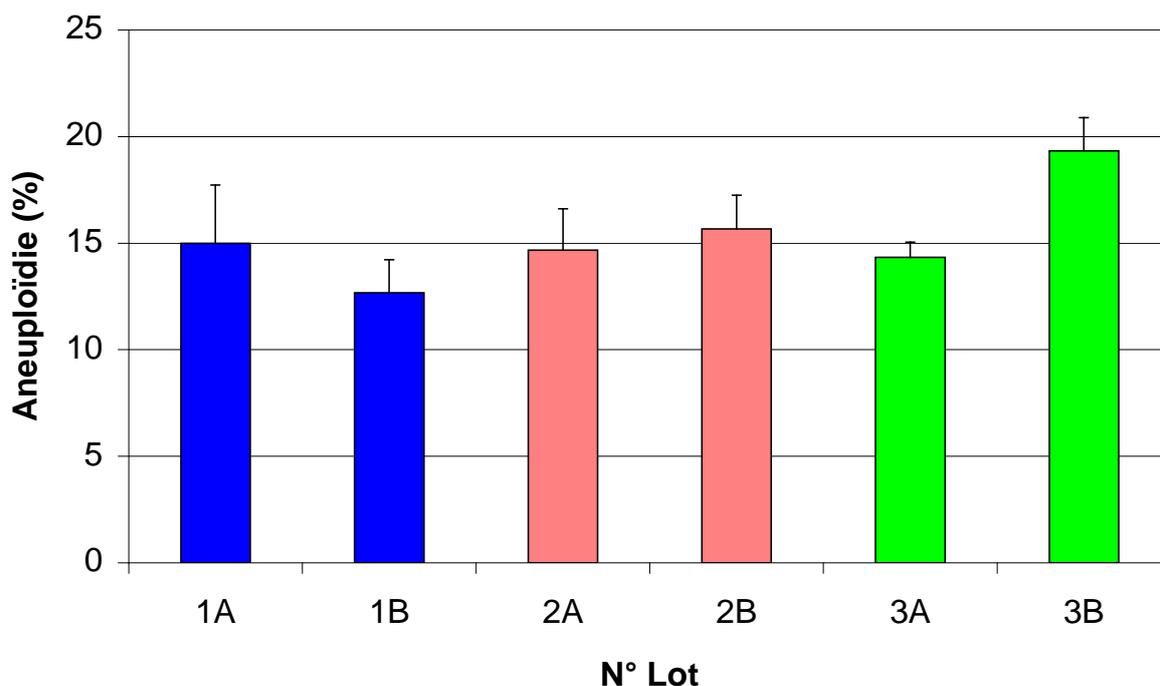
huîtres. L'eau utilisée pour alimenter tous les bacs provenait du bassin de Marennes-Oléron. Les huîtres, avant leur utilisation pour la réalisation de cette expérience, provenaient aussi du milieu naturel donc il est normal de retrouver une teneur de 1,14 µg/g de poids sec dans les lots témoins. Vu que la teneur en cadmium de 50 ng/l est une valeur pic retrouvée dans le bassin et que nous avons utilisée l'eau du bassin pour la réalisation de cette expérience au sein de l'écloserie, il est normal de retrouver une teneur en cadmium au sein des huîtres exposée à 50 ng/l significativement non différente de celle du lot témoin. Une analyse statistique a effectivement permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les réplicats (F=1,213 ; p=0,282) mais que des différences significatives existaient selon les traitements (F=271,393 ; p=0,000). Les teneurs en cadmium des huîtres témoins et de celles exposées à 50 ng/l ne sont pas statistiquement différentes (F=3,494 ; p=0,080). Par contre, les teneurs en cadmium des huîtres exposées à la plus forte concentration sont statistiquement différentes de celles des lots témoins (F=300,320 ; p=0,000) et de celles de concentration intermédiaire (F=298,220 ; p=0,000).



**Figure 6 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi (en µg/g de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en ng/l)**

La fixation de 30 huîtres juvéniles par lot a été réalisée au mois de septembre 2002. Les lames ont ensuite été réalisées d'octobre à novembre 2003. Seulement 10 individus par lot ont été étudiés pour une question de temps. Les lames ont été lues du mois de juillet au mois

d'août 2003. La Figure 7 présente les pourcentages d'aneuploïdie de chaque lot. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,706$  ;  $p=0,405$ ) ni entre les traitements ( $F=1,423$  ;  $p=0,250$ ). Il semblerait donc au vu de ces résultats que le cadmium n'ait pas d'impact sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses juvéniles. Ce résultat diffère de celui trouvé pour les adultes.

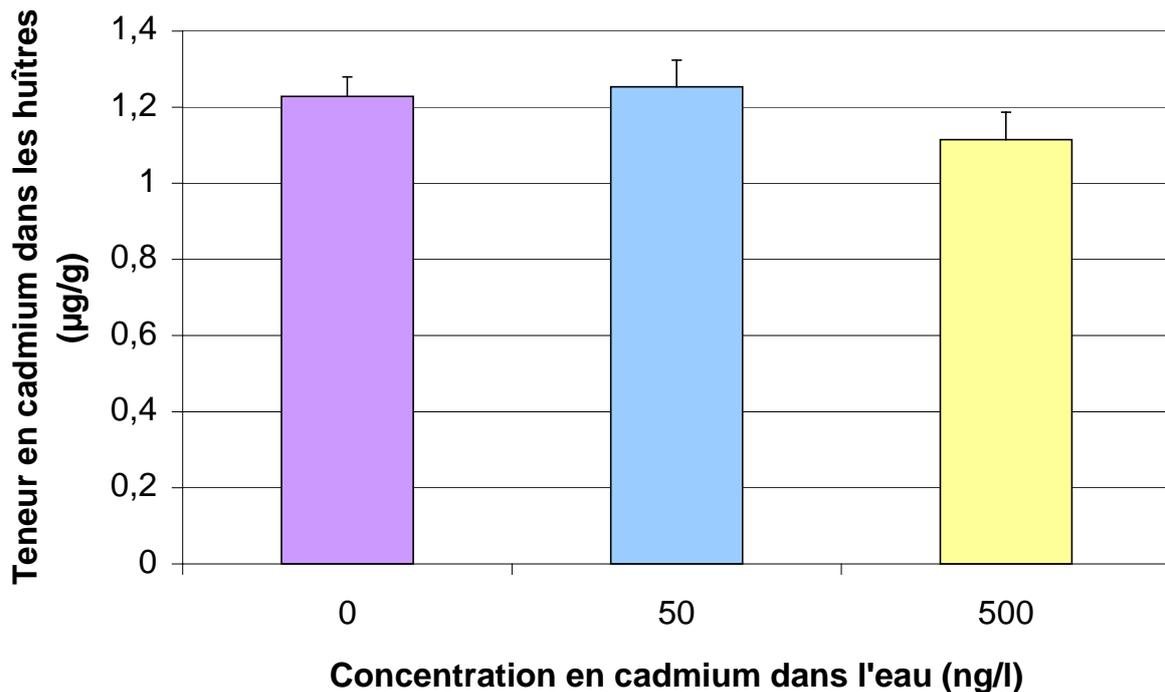


**Figure 7 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (0 ng/l), lots 2A, 2B (50 ng/l) et lots 3A, 3B (500 ng/l)**

### **3.3. Impact du cadmium sur la descendance d'huîtres *Crassostrea gigas* contaminées**

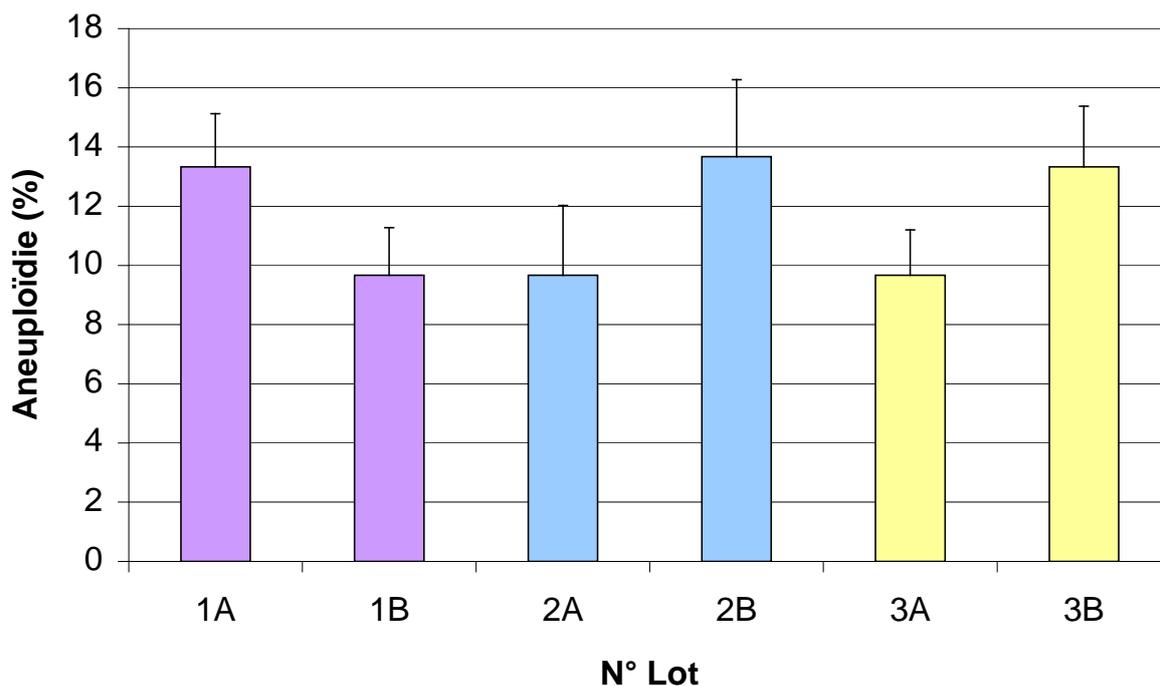
Des croisements ont été établis fin mai 2002 afin d'étudier l'impact sur la descendance. Un effet du cadmium sur le taux d'éclosion de larves dont les parents ont été contaminés au cadmium a été observé. Par contre, il n'y a pas eu d'impact de la contamination au cadmium des parents sur la croissance des larves (Bouilly, 2002). Ensuite, les larves pédivéligères ont été placées en micronurserie. Lorsque les huîtres juvéniles ont eu une taille suffisante (1 cm) pour les sortir de cette salle, nous les avons placées en salle de maturation jusqu'en septembre 2002. Puis, elles ont été conservées en claire jusqu'à la mi janvier 2003. Elles sont revenues en écloserie à cette date et nous les avons conditionnées en serre. La quantification du

cadmium au sein des huîtres a aussi été réalisée au LBEM de l'Université de La Rochelle. Les échantillons ont été préparés et analysés en juin 2003. Les résultats sont présentés sur la Figure 8. Une analyse statistique a révélé qu'il existait une différence significative entre les réplicats ( $F=4,482$  ;  $p=0,048$ ) mais pas entre les traitements ( $F=2,153$  ;  $p=0,145$ ). Ce résultat est cohérent étant donné que le cadmium n'est pas bioaccumulé principalement dans la gonade mais plutôt dans la glande digestive.



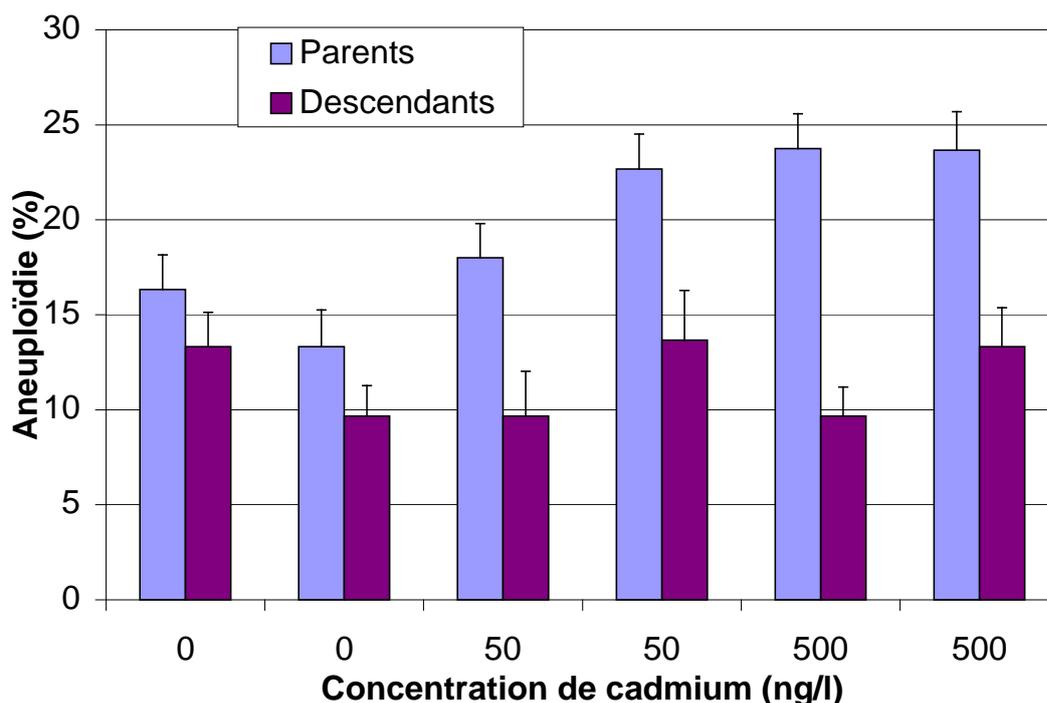
**Figure 8 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* descendantes d'huîtres exposées au cadmium pendant deux mois (en µg/g de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau des parents**

Les huîtres ont été fixées au début du mois de février 2003. Les lames ont toutes été réalisées à la suite jusqu'au début du mois de mars 2003. Les lames ont été lues de mai à juin 2003. Le taux d'aneuploïdie de ces descendants au stade naissain a été évalué afin de savoir si l'impact peut se transmettre à la génération suivante. La Figure 9 présente les pourcentages d'aneuploïdie de chaque lot. Les taux d'aneuploïdie dans les lots 1(A et B, témoins), 2 (A et B, 50 ng/l) et 3(A et B, 500 ng/l) ont varié de 9,67 à 13,33%, 9,67 à 13,67% et 9,67 à 13,33% respectivement. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,984$  ;  $p=0,326$ ) ni entre les traitements ( $F=0,031$  ;  $p=0,970$ ). Les trois lots ne sont donc pas statistiquement différents que ce soit au niveau de la teneur en cadmium ou bien du taux d'aneuploïdie.



**Figure 9 : Pourcentage d’aneuploïdie d’huîtres *Crassostrea gigas* descendantes d’huîtres exposées au cadmium pendant deux mois en fonction du lot : lots 1A, 1B (0 ng/l), lots 2A, 2B (50 ng/l) et lots 3A, 3B (500 ng/l)**

Si nous comparons les taux d’aneuploïdie des parents à celui des descendants (Figure 10) nous n’observons aucune différence significative entre les répliqués ( $F=0,889$  ;  $p=0,348$ ), des différences significatives entre les traitements ( $F=4,647$  ;  $p=0,012$ ) et entre les parents et leurs descendants ( $F=50,106$  ;  $p=0,000$ ). Il semblerait donc que l’impact du cadmium sur l’aneuploïdie d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* observé chez des adultes n’ait pas persisté à la génération suivante. Le cadmium, aux concentrations testées, n’induirait donc pas un dommage génétique transmissible d’une génération à l’autre, au contraire de l’atrazine (Bouilly *et al.*, soumis).



**Figure 10 : Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées pendant trois mois et demi au cadmium et leurs descendance en fonction de la concentration de cadmium reçue par les parents**

#### **4. Etude de l'aneuploïdie chez des huîtres *Crassostrea gigas* en milieu naturel**

Nous devons choisir différents sites afin d'étudier l'aneuploïdie en milieu naturel. Nos études en milieu contrôlé pourront ainsi être comparées à des expériences réalisées dans le milieu d'élevage. Des huîtres devaient être prélevées sur l'estran à différents endroits et dans des claires ostréicoles. Le cadmium sera quantifié au sein des animaux étudiés (LBEM). Les teneurs des polluants dans l'eau devaient être évaluées auprès du RNO. Pour l'instant, seul un site a déjà été choisi, il s'agit de la vasière de Brouage car c'est un site expérimental pour le programme PEVS. Un grand nombre d'analyses sera donc effectué sur ce site et cela nous permettra d'avoir des informations sur la teneur en différents pesticides au moment du prélèvement. Un premier prélèvement a eu lieu au début du mois de mars 2003. Les huîtres, provenant d'un captage naturel, ont dû être détachées. Une centaine d'huîtres juvéniles de taille approximativement équivalente a été gardée. Elles ont été placées en salle de quarantaine afin de les conditionner (augmentation de température jusqu'à 15°C et addition de nourriture). Au bout de 3 semaines, 35 huîtres ont été fixées. Les lames ont été réalisées au début du mois d'avril et ont été lues. Un deuxième prélèvement sur ce site a eu lieu au début

du mois de juin. En général, les valeurs pics en atrazine dans le milieu aquatique sont retrouvées au mois de juin. Les huîtres ont été placées en maturation afin de les conditionner pendant un mois. Nous avons fixé à nouveau 35 huîtres au mois de juillet. Les lames ont été réalisées à la suite et lues. Un troisième prélèvement a eu lieu fin septembre. Les huîtres ont été placées dans des dégorgeoirs extérieurs pendant trois semaines afin de les conditionner. Nous avons également fixé 35 huîtres au mois d'octobre et les lames ont été réalisées à la suite. Un quatrième prélèvement devrait être effectué fin décembre. Cette analyse dans le milieu naturel, sur un même site, à des périodes différentes sera intéressante afin de voir si le taux d'aneuploïdie des huîtres a évolué dans le temps.

## **5. Relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie (MOREST)?**

Des croisements ont été réalisés au sein du laboratoire au cours du premier trimestre 2001 afin de produire des familles d'huîtres qui ont ensuite été placées dans le milieu naturel sur différents sites afin d'étudier leur comportement. Au cours de l'été 2001, il s'est avéré que les mortalités estivales ont touché de façon différentielle ces familles en cours d'étude. Il est alors apparu intéressant de caractériser le génome de ces familles, d'une part grâce à des marqueurs moléculaires et d'autre part, en ce qui nous concerne plus particulièrement, en observant le taux d'aneuploïdie chez ces animaux. En effet, des études génétiques précédentes ont pu mettre en évidence que certaines familles avaient des taux d'aneuploïdie significativement différents. Nous souhaitons donc déterminer si certaines familles ayant subi des mortalités différentielles en 2001 peuvent être caractérisées par des taux d'aneuploïdie différents. Pour cela, 6 familles différenciées ont été choisies et 30 animaux de chaque famille ont été fixés en février 2002 afin de déterminer leur taux d'aneuploïdie et par la suite le taux d'aneuploïdie moyen de chaque famille. Le site sélectionné est celui de Perquis (Ronce les bains). Les mêmes familles étant restées à la nurserie de Bouin (Vendée) et n'ayant pas subi de mortalité ont aussi été analysées. Les lames microscopiques ont été réalisées de février à avril 2002. Nous n'avons étudié que 10 animaux par famille pour un gain de temps et aussi car certains animaux étaient pauvres en métaphases. Les lames des lots en provenance de Perquis ont été lues de septembre à octobre 2003 et celles de Bouin en octobre 2003. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'aneuploïdie ont été mis en parallèle avec les taux de survie observés afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ces deux paramètres. Nous

avons choisi d'étudier des huîtres dont le croisement avait eu lieu le 18 avril 2001. Ces huîtres avaient été mises sur site le 7 août 2001. Les taux de mortalité de chaque famille sont répertoriés sur le Tableau 1. Ils ont été établis le 2 octobre 2001. Les huîtres de Bouin ont été acheminées au marais expérimental d'Artouan le 30 novembre 2001 puis placées en maturation à l'écloserie de La Tremblade le 14 décembre 2001. Les huîtres de Perquis ont été rentrées à l'écloserie début janvier 2002 afin de les conditionner.

Familles	Taux de mortalité (%) Bouin	Taux de mortalité (%) Perquis
F 14-54	0	73,1 ± 11
F 14-55	0	64,8 ± 9
F 16-62	0	20,4 ± 13
F 15-57	0	4,8 ± 4
F 15-58	0	4,3 ± 2
F 15-59	0	10,3 ± 7

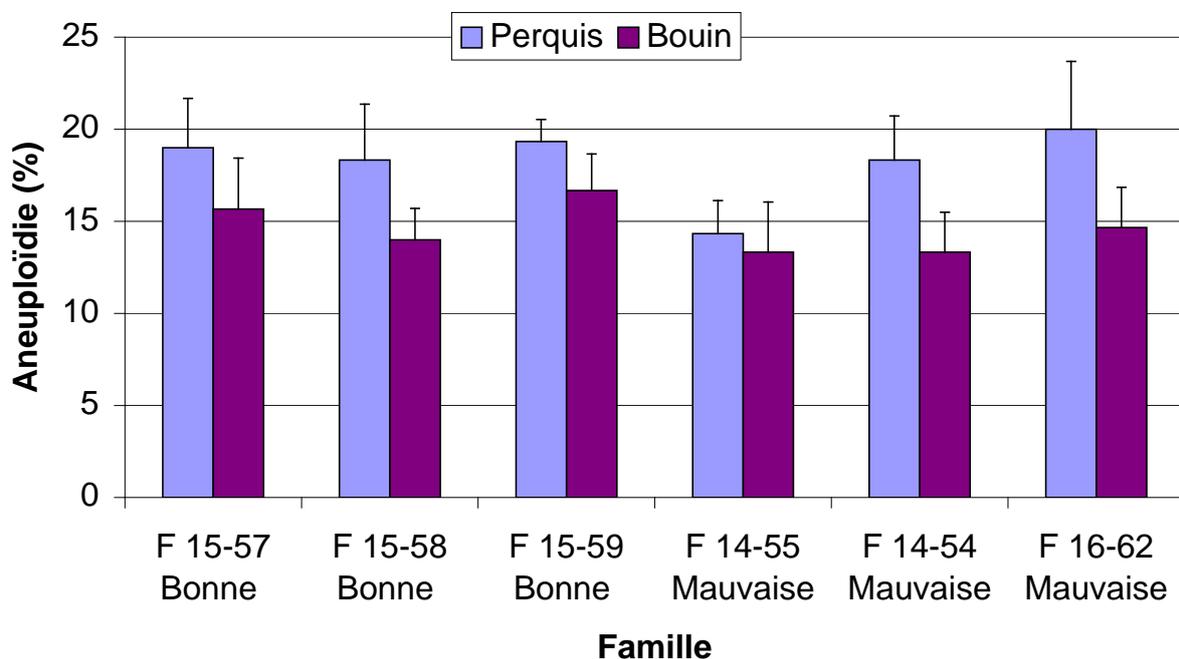
**Tableau 1 : Taux de mortalité (en %) des différentes familles à la nurserie de Bouin et sur le site de Perquis**

Sur le site de Perquis, les taux d'aneuploïdie observés des familles F 14-54, F 14-55, F 16-62, F 15-57, F 15-58 et F 15-59 étaient de 18,33%, 14,33%, 20%, 19%, 18,33% et 19,33% respectivement (Figure 11). Les familles F 14-54, F 14-55 et F 16-62 sont qualifiées de « mauvaises » familles car elles ont un plus fort taux de mortalité sur le milieu que les familles F 15-57, F 15-58 et F 15-59, qui sont, elles, qualifiées de « bonnes » familles car elles ont un plus faible taux de mortalité. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,672$  ;  $p=0,515$ ) ni entre les bonnes et les mauvaises familles ( $F=0,397$  ;  $p=0,532$ ).

Au niveau des huîtres provenant de la nurserie de Bouin, les taux d'aneuploïdie observés des familles F 14-54, F 14-55, F 16-62, F 15-57, F 15-58 et F 15-59 étaient de 13,33%, 13,33%, 14,67%, 15,67%, 14% et 16,67% (Figure 11). Une analyse statistique a permis de montrer également qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,386$  ;  $p=0,682$ ) ni entre les bonnes et les mauvaises familles ( $F=0,797$  ;  $p=0,376$ ).

De plus, si nous comparons les huîtres des mêmes familles placées sur deux sites différents (Perquis et Bouin) (Figure 11), nous observons aucune différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,813$  ;  $p=0,446$ ), ni entre les bonnes et les mauvaises familles ( $F=1,129$  ;  $p=0,290$ ). Par contre, une différence significative entre les huîtres de Perquis et celles de Bouin a été observée ( $F=6,546$  ;  $p=0,012$ ). Il semblerait donc

qu'il n'y ait pas de relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie étant donné qu'aucune différence significative n'a été observée entre des familles ayant un fort taux de mortalité et des familles ayant un faible taux de mortalité sur le milieu. De plus, ces mêmes familles, sans mortalité, n'ont pas montré de différence significative. Nous travaillons toutefois uniquement sur du matériel vivant donc il est difficile de connaître le taux d'aneuploïdie d'huîtres mortes. Par contre, nous avons observé une augmentation du taux d'aneuploïdie des huîtres présentes sur Perquis par rapport à celles qui sont restées à la nurserie de Bouin. Il semblerait donc que les conditions environnementales aient un rôle au niveau des taux d'aneuploïdie observés.



**Figure 11 : Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres issues de « bonne » ou de « mauvaise » famille selon le site**

## 6. Publications/Colloques

### 6.1. Publications

Bouilly K, Leitão A, McCombie H and Lapègue S. 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology and Chemistry 22 : 219-223.

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

Bouilly K, McCombie H, Leitão A and Lapègue S. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Soumis à Mutation Research.

## **6.2. Communications orales**

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand, S. Lapègue, 2002. Impact of atrazine on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 5<sup>ème</sup> Congrès international de Limnologie-Océanographie, septembre 2002, Paris.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, S. Lapègue, 2002. Impact d'un facteur environnemental, l'atrazine, sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Journées conchyloles, IFREMER, mars 2003, Nantes.

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, S. Lapègue, 2003. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 95<sup>ème</sup> colloque annuel de la National Shellfisheries Association, avril 2003, New Orleans, Louisiana, Etats-Unis.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand, S. Lapègue, 2003. Impact de polluants sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. 3<sup>ème</sup> Congrès international des Sociétés Européennes de Malacologie, juin 2003, La Rochelle.

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, S. Lapègue. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 133<sup>ème</sup> colloque annuel de l'American Fisheries Association, août 2003, Québec, Canada.

## 7. Références bibliographiques

- Bouilly, K.**, 2002. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron : aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport n°2 d'état d'avancement des travaux de thèse (septembre 2002). 29 pages + annexes.
- Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H. & Lapègue, S.**, 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 219-223.
- Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A. & Lapègue, S.** Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Mutation Research*, soumis.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriôt-Quiévreux, 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-Quiévreux, C.**, 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources* 14: 1-5.
- Thiriôt-Quiévreux, C., Noël, T., Bougrier, S. & Dallot, S.**, 1988. Relationships Between Aneuploidy and Growth Rate in Pair Matings of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75: 89-96.
- Zouros, E., Thiriôt-Quiévreux, C. & Kotoulas, G.**, 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genet. Res., Camb.* 68: 109-116.