

Département : Ressources Biologiques et Environnement
Unité : Amélioration Génétique, Santé Animale et Environnement
Projet : Observations, Analyse et Prévision des performances conchylicoles
Laboratoire de Génétique et de Pathologie, IFREMER la Tremblade

**Abdellah BENABDELMOUNA,
Simon Ollier,
Elise Maurouard,
Florence D'Amico,
Jean Luc Seugnet,
James Grizon**

**Niveau de ploïdie des naissains d'huître creuse captés
dans les bassins de Marennes Oléron, Baie de Bourgneuf
et Arcachon.**

Réseau Biovigilance, campagne 2011



Niveau de ploïdie des naissains d'huître creuse captés dans les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon. Réseau Biovigilance, campagne 2011

Résumé :

Comme pour les années précédentes, le réseau **biovigilance** a réalisé en 2011 la caractérisation du niveau de ploïdie des naissains captés en 2010. Pour la première fois, en plus des deux principaux bassins de captage que sont Marennes Oléron et Arcachon, un bassin additionnel (Vendée) a été prospecté via l'analyse de naissains sauvages captés en 2010 au niveau de la baie de Bourgneuf. Les échantillons des naissains sauvages issus du captage naturel ont été prélevés sur les sites de chaque bassin pour un total analysé de plus de 1800 animaux. En tenant compte de notre échantillonnage, nos résultats de suivi de ploïdie concluent à l'**absence d'animaux polyplœïdes**, triploïdes ou tétraploïdes, captés dans les trois bassins prospectés.

Cependant, les bassins de captage prospectés restent comme les autres années précédentes caractérisés par la présence de naissains affectés de divers taux d'anomalies génomiques : cassures d'ADN et Aneuploïdie ADN (hypodiploïdie), c.à.d. une diminution de la taille du génome suite à la perte de matériel génétique par rapport au niveau diploïde. Il est important de noter que, comme pour toutes les années précédentes, aucun naissain hypo ou hypertriploïde, marqueur d'une hypothétique reproduction des huîtres triploïdes, n'a été détecté pendant cette campagne.

Dans le contexte des mortalités qui impactent lourdement les naissains de *C. gigas*, et compte tenu du fait que les deux bassins naisseurs étudiés sont à la base de la fourniture de pratiquement les trois quarts des naissains annuellement utilisés en France, l'occurrence de ces anomalies génomiques mises en évidence dans le cadre du réseau biovigilance devrait susciter un intérêt particulier sur leur causes ainsi que les moyens concertés à mettre en œuvre pour diminuer leur prévalence et cela notamment en relation avec la qualité du milieu marin au niveau de ces deux bassins.

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	5
A.	Cadre de l'étude	5
B.	La ploïdie des huîtres	6
II.	MATERIEL ET METHODES	9
A.	Echantillonnage	9
B.	Analyse de ploïdie en cytométrie en flux	9
1)	Préparation des échantillons	9
2)	Analyses cytométriques	9
3)	Analyse statistique	10
III.	RESULTATS	12
1)	Bassin d'Arcachon	12
2)	Bassin de Marennes Oléron	
3)	Baie de Bourgneuf	
4)	Comparaison des trois bassins	16
IV.	CONCLUSION	17
IV.	BIBLIOGRAPHIE	16
	ANNEXE : RESULTATS DE L'ANALYSE DE PLOÏDIE DES NAISSAINS CAPTES EN 2010	20
	Marennes Oléron	18
	Arcachon	24
	Baie de Bourgneuf	36
	Localisation des sites de captage analysés	38

I. Introduction

A. Cadre de l'étude

La mise en place du réseau « biovigilance » résulte des recommandations formulées dans le cadre de l'expertise indépendante demandée par le Comité Scientifique du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche concernant « l'effet d'un flux éventuel d'huîtres tétraploïdes dans les zones conchylicoles » (Chevassus au Louis, 1998). Au terme de ce travail de modélisation qui a constitué une pondération *à priori* du risque posé par l'échappement d'huîtres tétraploïdes, il avait alors été préconisé de réaliser une vérification *à posteriori* et cela au travers d'« une biovigilance légère, avec mesure régulière (tous les deux ans) du taux d'huîtres tétraploïdes dans les bassins conchylicoles ».

Actuellement, le « Réseau biovigilance » s'inscrit dans le cadre de l'action « Observatoire conchylicole » du projet Ifremer « Typologie et surveillance des systèmes de productions aquacoles » du programme « Aquaculture Durable ». Ce réseau a pour objectif la surveillance de l'apparition et de l'évolution de naissains polyplôïdes dans les zones de production d'huîtres creuses. En effet, dans le contexte du développement de la production de naissain d'écloserie de type triploïde à partir de géniteurs tétraploïdes, ce réseau va fournir des informations sur l'apparition anormale d'huîtres polyplôïdes « triploïdes ou tétraploïdes » dans les zones où un recrutement naturel des naissains sauvages se produit. Il s'agit ainsi de rester vigilant au risque potentiel d'apparition d'huîtres tétraploïdes et de leur reproduction non contrôlée dans le milieu.

La première étape de la construction de ce réseau a été mise en place par une convention passée entre les différents acteurs concernés par ce suivi de biovigilance (l'IFREMER, le Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires rurales (DPMA, Direction des Pêches, sous direction de l'Aquaculture), et le Syndicat Professionnel des Ecloseries et Nurseries de Coquillages, avec le soutien financier de l'IFOP), et ceci suite à un accord tripartite (Conseil National de la Conchyliculture, Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires rurales, et Ifremer) visant à :

- Rendre obligatoire la déclaration de tout échappement accidentel d'huîtres tétraploïdes.
- Maintenir en circuit contrôlé le stock français d'huîtres tétraploïdes au niveau des installations sécurisées gérées par Ifremer qui est seul habilité à détenir ce genre de cheptel polyplôïde.

La convention stipulait que deux campagnes de prélèvements seront réalisées à deux années d'intervalle dans un premier temps. Ces travaux ont ainsi été réalisés sur du naissain capté respectivement en 2001 et 2003 et détroqués puis analysés respectivement en 2003 et 2004. La remise d'un rapport aux différentes parties a clôturé cette convention (Cornette *et al.* 2004).

Suite à la demande du ministère de l'agriculture et de la pêche et selon les recommandations du Comité d'éthique et de précaution pour les applications de la recherche agronomique (COMEPR, octobre 2004), l'IFREMER a mis en place une surveillance annuelle des deux principales zones naturelles de captage d'huîtres en France (Arcachon et Marennes Oléron). Ainsi, depuis 2005, le suivi de la ploïdie du naissain dans les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon a été poursuivi (Benabdelmouna *et al.* 2005 ; Grouhel *et al.* 2006 ; Benabdelmouna *et al.* 2007 ; Benabdelmouna *et al.* 2008 ; Benabdelmouna *et al.* 2009) donnant lieu à des rapports annuels largement diffusés (DPMA, CNC, SRCs, SENC, centres IFREMER).

Enfin, dans le cadre du rapport sur « L'utilisation de naissain d'écloserie, en particulier triploïde, en ostréiculture : analyse des conséquences sanitaires, environnementales, génétiques et zootechniques », Chevassus au Louis et ses collaborateurs (2009) ont confirmé et même renforcé les conclusions du rapport de 1998, selon lesquelles l'hypothèse de prolifération incontrôlable de triploïdes et tétraploïdes dans les bassins conchylicoles était peu plausible. Les mêmes auteurs ont aussi conclu que, compte tenu des incertitudes inhérentes à tout phénomène biologique, il convenait toujours de maintenir le principe d'un suivi à pas de temps large (tous les deux ou trois ans) de la ploïdie des naissains. Toutefois, devant les attentes des diverses parties concernées, la surveillance réalisée dans le cadre du réseau biovigilance continue à se faire sur une base annuelle.

B. La ploïdie des huîtres

Chez l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas*, le nombre chromosomique de base constitutif du matériel génétique se compose de 10 paires de chromosomes ($x = 10$). A l'état **diploïde**, l'huître a donc 20 chromosomes ($2n = 2x = 20$ chromosomes). A côté de cet état diploïde, *C. gigas* peut être polyploïde : triploïde (spontanée ou induite) ou tétraploïde (induite). A l'état triploïde, *C. gigas* a donc 30 chromosomes ($2n = 3x = 30$) et enfin, à l'état tétraploïde, *C. gigas* en a 40 ($2n = 4x = 40$ chromosomes). Ces trois niveaux de ploïdie sont dits **euploïdes** car la multiplication touche l'ensemble des chromosomes constituant le set chromosomique de base. Quant seuls quelques chromosomes voient leur nombre varier (en gain comme en perte), l'état de ploïdie obtenu est appelé **aneuploïdie**. L'aneuploïdie peut apparaître de façon naturelle (vieillesse des géniteurs, instabilité génétique de la méiose) ou plus fréquemment suite à des stress chimiques qui s'opèrent lors des divisions cellulaires somatiques ou germinales (Krepinsky et Heddle 1983 ; Galloway 1994). Ainsi, à partir d'un individu **diploïde**, la perte d'un chromosome dans une cellule somatique est appelée **monosomie (nullisomie au niveau des gamètes)**, alors que le gain d'un chromosome est appelé **trisomie (disomie au niveau des gamètes)**. D'une façon générale, et chez tous les eucaryotes, les aneuploïdies touchant le compartiment somatique (cellules qui se divisent par des mitoses) sont très souvent à l'origine de dérèglements cellulaires et induisent le développement de divers cancers. Enfin, les aneuploïdies touchant le compartiment germinale (gamètes obtenus suite à des méioses) ont un impact plus important et sont à l'origine de morbidités précoces (avortements) ou de production d'une descendance peu viable et/ou lourdement handicapée (diverses trisomies et monosomies, bien connues mêmes chez l'Homme).

Le milieu aquatique et notamment le milieu marin est bien souvent le point d'arrivée et de stockage de la plupart des déchets issus de l'activité humaine, industrielle, urbaine et agricole. Du fait de leurs caractéristiques propres (organismes filtreurs, mode de vie sessile et capacité de bioaccumulation), les mollusques marins, surtout les bivalves et les gastéropodes, sont très sensibles à ces stress chimiques et sont par conséquent très sujets à des anomalies génomiques qui se traduisent par une perte de matériel génétique (aberrations chromosomiques du type aneuploïdies) et/ou des dégâts structurels à l'ADN (cassures d'ADN). Ainsi, ces organismes ont été, et continuent à être, utilisés comme organismes sentinelles indicateurs d'une génotoxicité aquatique. Par conséquent, chez les bivalves, ces anomalies génomiques et notamment l'aneuploïdie sont observées notamment chez les moules et les huîtres vivants dans les milieux pollués qui subissent de forts et fréquents apports anthropiques notamment en substances chimiques (Alsabti et Kurelec. 1985 ; Elston *et al.* 1992 ; Lowcock *et al.* 1997 ; Bihari *et al.* 1999, 2003). De plus, chez l'huître creuse *C. gigas*, les animaux tolèrent un niveau assez élevé de variation de leur taille du génome (5 à 15 %) et peuvent posséder un certain pourcentage (en moyenne 10%) de cellules à $2n = 19, 18$ ou 17 chromosomes.

En cytogénétique quantitative, différentes méthodes ont été utilisées afin de quantifier les variations de taille des génomes. Historiquement, ces méthodes ont été basées sur des approches de caryologie classique tels le test micronoyaux et surtout les comptages chromosomiques après étalement de préparations métaphasiques. Ces méthodes classiques ont néanmoins comme principal désavantage d'être non seulement lourdes à mettre en œuvre en terme de technicité et de temps, mais surtout produisent des résultats assez peu fiables du fait des erreurs techniques artefactuelles qu'elles induisent. En effet, les diverses méthodes d'étalement chromosomique sont bien connues pour être peu fiables afin de vérifier, à haut débit, la ploïdie (et surtout l'aneuploïdie) du fait des mélanges des métaphases et des cassures et échanges de bras chromosomiques qu'elles induisent de façon non négligeable. C'est d'ailleurs pour cette même raison, à titre d'exemple en cytogénétique clinique humaine, la caryologie est considérée comme suffisante pour confirmer un état euploïde mais tout diagnostic d'aneuploïdie (trisomie 21 par exemple) doit être systématiquement vérifié par une autre méthode comme par exemple l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) sur noyaux interphasiques utilisant une sonde spécifique du chromosome mis en cause (chromosome 21 dans ce cas). A partir de la fin des années 1980, d'autres méthodes de cytogénétique quantitatives plus rapides et surtout plus fiables ont été mises au point.

- La première méthode est une technique utilisant la densitométrie après analyse d'image de noyaux colorés (par exemple Feulgen). Cette technique est basée sur une détermination stœchiométrique de la taille d'ADN après étalement des noyaux fixés sur une lame de microscopie, coloration et détermination de la densité optique de chaque noyau. Cette technique de mesure de la ploïdie et de la taille des génomes reste, malgré sa lourdeur de mise en route, particulièrement la mieux adaptée à l'étude des matériels archivés et/ou disponibles à très petite quantité.
- La deuxième technique est la cytométrie en flux basée sur la mesure de fluorescence émise (DAPI ou IP) et l'utilisation de témoins internes biologiques. Cette technique est actuellement la méthode de référence en cytogénétique quantitative et elle reste particulièrement adaptée aux matériels vivants et

facilement disponibles. Ainsi, de part sa rapidité et sa fiabilité, la cytométrie en flux a été très tôt utilisée afin de déterminer les tailles et niveaux de ploïdie de la plupart des organismes vivants (<http://www.genomesize.com/>; <http://data.kew.org/cvalues/>) mais aussi afin de démontrer et de mesurer les effets aneugènes (induisant des aneuploïdies) et clastogènes (induisant des cassures chromosomiques) causés par les contaminants environnementaux, chimiques comme radioactifs (Deaven 1982 ; McBee et Bickham 1988 ; Bickham *et al.* 1988 ; Bickham 1990 ; Lamb *et al.* 1991, Fernandez *et al.* 1993). Chez les invertébrés marins, la cytométrie en flux est largement utilisée afin de mettre en évidence les anomalies de ploïdie (aneuploïdie, polyploïdie, et cassure d'ADN) notamment chez les moules élevées dans des sites plus ou moins pollués (Dixon 1982 ; Alsabti et Kurelec. 1985 ; Elston *et al.* 1992 ; Bihari *et al.* 2003 ; Baršien *et al.* 2005).

La cytométrie en flux repose sur le principe de la mesure de la fluorescence émise par les noyaux, préalablement individualisés et marqués, défilant un par un grâce à un système fluïdique devant un système optique chargé d'exciter le marquage et de récolter la fluorescence émise. Un logiciel informatique est placé en aval pour contrôler l'ensemble, convertir les signaux récoltés et les présenter sous forme d'histogrammes, ou cytogrammes, dont les pics sont des courbes Gaussiennes qui correspondent aux noyaux qui se trouvent dans les différentes phases du cycle cellulaire. Classiquement un histogramme comprend 2000 à 20000 noyaux analysés et, pour un échantillon diploïde, présente deux pics séparés par une ligne de base plus au moins haute. Le premier pic, caractérisé par une valeur donnée du canal de sortie, correspond aux noyaux se trouvant en phase G1 du cycle cellulaire et ayant une quantité 2C d'ADN. C'est ce pic de référence utilisé pour déterminer la taille du génome, et de façon indirecte le niveau de ploïdie, de l'échantillon. Le deuxième pic, beaucoup plus discret et dont la valeur du canal de sortie est le double de celle correspondant au pic G1, correspond aux noyaux se trouvant en phases G2/M et ayant une quantité double d'ADN (4C). Ces deux pics sont séparés par une ligne de base qui correspond aux noyaux se trouvant en phase de synthèse (S) et ayant une quantité d'ADN variable intermédiaire entre 2C et 4C. Cette ligne de base s'étale entre les deux canaux de sortie respectifs aux pics G1 et G2/M. Les fluorochromes les plus utilisés en cytométrie en flux sont :

* Le Bis-benzimide Hoechst (excitation : 365 nm, émission : 455 nm). Le Hoechst 33342 et le Hoechst 33258 sont excitables dans l'ultraviolet. Ils sont spécifiques des liaisons A-T, peu coûteux et le marquage est très rapide (30 secondes).

* Le **DAPI** (4', 6-diamino-2-phenylindole). Ce fluorochrome possède les mêmes qualités que le Hoechst mais il résiste mieux au photoquenching. C'est donc ce fluorochrome qui sera utilisé dans notre étude.

* La mithramycine et la chromomycine A3 (excitation: 450 nm, émission: 560 nm). Ce sont deux fluorochromes spécifiques aux liaisons G-C qui requièrent un marquage de 30 minutes et qui sont en plus hautement toxiques.

* L'iodure de propidium (excitation : 493 nm, émission : 639 nm) et le bromure d'éthidium (excitation : 482 nm, émission : 616 nm). Ce sont deux fluorochromes intercalants qui sont donc non spécifiques au type de liaison et dont l'emploi est plutôt réservé aux appareils de cytométrie équipés en excitation laser.

La cytométrie en flux impose des précautions méthodologiques qui doivent être **impérativement** respectées afin que les résultats obtenus ne soient pas artéfactuels en reflétant des variations propres à l'appareil utilisé et/ou aux erreurs inter journalières de préparation des échantillons. La première de ces précautions est l'utilisation systématique d'un **témoin interne biologique** dont la taille du génome permet de bien identifier celle de l'échantillon à analyser. La deuxième des précautions est de ne considérer comme valables pour une interprétation ultérieure que les données qui ont été obtenues lors des analyses durant lesquelles le coefficient de variation (largeur à mi hauteur (finesse) du pic, ou **CV %**) du témoin interne ne dépasse pas 3%. La valeur du CV % du témoin interne est très importante car, selon le standard international, au delà de la valeur fixée à 3, l'analyse se fait dans des conditions inacceptables et le pic du témoin interne n'est plus à considérer comme une référence acceptable pour l'échantillon. Une fois ces précautions prises, les résultats classiques d'une analyse cytométrique peuvent être exploités en analysant deux données particulièrement intéressantes :

- le **CV%** du pic échantillon : Cette valeur, examinée en premier, est caractéristique de l'intégrité de l'ADN et de la bonne préparation de l'échantillon. Ainsi, plus la valeur de ce CV% est basse, plus fin est le pic et donc moins l'ADN de l'échantillon est dégradé lors de sa préparation.
- Le **ratio** obtenu en divisant la valeur du canal de sortie du pic échantillon par celle du pic témoin interne : Ce ratio ($\pm 5\%$) est caractéristique de la quantité d'ADN nucléaire, et par voie indirecte d'un niveau de ploïdie donné. Théoriquement, chez *C. gigas* et en utilisant comme témoin interne les érythrocytes de truite (TRBC, Trout Red Blood Cells), ce ratio est de $0.4 \pm 5\%$ pour les huîtres diploïdes, de $0.6 \pm 5\%$ pour les triploïdes, et de $0.8 \pm 5\%$ pour les tétraploïdes. A partir d'un état

diploïde (ratio = $0.4 \pm 5\%$), les valeurs de ratio inférieure à 0.38 indiquent des quantités d'ADN en lien avec une hypodiploïdie (perte d'ADN génomique). A l'opposée, les valeurs de ratio supérieure à 0.42 indiquent des quantités d'ADN en lien avec une hyperdiploïdie (gain d'ADN génomique).

II. Matériel et méthodes

A. Echantillonnage

En 2011, 10 sites ont été analysés au lieu des six les années précédentes. Les échantillons de naissain naturel ont ainsi été prélevés sur les 10 sites, à raison de 5 sites dans le bassin de Marennes Oléron, 3 sites dans le bassin d’Arcachon et un seul site en baie de Bourgneuf en Vendée (Tableau 1). A raison d’au moins 200 naissains analysés par sites, 1814 naissains ont été analysés durant cette campagne 2011. L’échantillonnage total annuel analysé est donc largement supérieur aux recommandations initialement préconisées (600 animaux à analyser). Il est important de noter que, dans le contexte des crises de surmortalité des naissains, les différents lots de naissains analysés durant cette campagne ont eux aussi subi des épisodes de mortalité soit avant les analyses soit pendant la période de stockage dans les structures du LGP et donc durant la période des analyses.

Lot	Nombre	Bassin
Comprian	200	Arcachon
Gorp	200	Arcachon
Les Jalles	200	Arcachon
Seudre	200	Marennes Oléron
Marsilly	200	Marennes Oléron
Mouclières	200	Marennes Oléron
Bonne anse	200	Marennes Oléron
Estrée	214	Marennes Oléron
Bernerie en Retz	200	Baie de Bourgneuf

Tableau 1. Effectifs analysés et distribution géographique de l’échantillonnage

B. Analyse de ploïdie en cytométrie en flux

1) Préparation des échantillons

Les analyses des niveaux de ploïdie sont réalisées par cytométrie en flux à partir de fragments de tissus somatiques sous forme de biopsies branchiales. Les échantillons sont préparés et repris dans le tampon d’extraction (5mM MgCl₂, 85 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1 % Triton X100, pH7). La biopsie branchiale (1mm² de tissu branchial prélevé) est reprise dans 1 ml de tampon et l’extraction des noyaux est accélérée en effectuant des pipetages refoulements à l’aide d’une micropipette. Après filtration de la suspension obtenue, au travers d’un filtre de 30µm de diamètre de maille, est additionné 1 ml de tampon d’extraction contenant le fluorochrome DAPI (2µl/ml) et le témoin interne (2µl/ml de TRBC, DNA reference calibrator, Coulter). Après une incubation de 30 minutes à 4°C et à l’abri de la lumière, les échantillons sont analysés en utilisant le cytomètre en flux Partec PA II.

2) Analyses cytométriques

L’étalonnage du cytomètre est réalisé en utilisant un témoin interne constitué par des érythrocytes de truite TRBC (Trout Red Blood Cells, DNA reference calibrator, Coulter). L’alignement de la lampe est régulièrement vérifié afin d’obtenir des valeurs de CV% les plus basses possibles (inférieures à 3%) garantissant ainsi la fiabilité de nos analyses. Pour chaque échantillon, au minimum 2000 noyaux sont analysés. L’analyse des échantillons et la représentation graphique des résultats sous forme de cytogrammes sont réalisées par le logiciel FloMax®. Ce logiciel pour Windows™ permet la prise en compte de plusieurs paramètres tels le temps de l’analyse, la concentration des événements par ml (ou de noyaux), la position relative des différents pics...etc. Les résultats obtenus sont représentés sous forme d’histogrammes mono paramétriques. Il s’agit d’histogrammes de fréquence où l’axe des abscisses correspond aux valeurs du paramètre analysé (quantité de fluorescence émise par événement et distribuée le long des 1024 canaux de sortie) et l’axe des ordonnées correspond au nombre d’événements comptés. Le logiciel permet d’obtenir une distribution gaussienne de chaque pic.

Chaque échantillon est analysé individuellement et comparé au témoin interne TRBC. Un ratio est par la suite déterminé à partir de la position moyenne du ou des pic(s) de fluorescence émise par les cellules somatiques des échantillons divisé(s) par la position moyenne du pic de fluorescence du témoin interne TRBC. Durant ce travail de biovigilance, nous avons mis en évidence que les ratios moyens de fluorescence standardisés étaient de 0,4 chez les huîtres diploïdes (**Figure 1**), de 0,6 pour les huîtres triploïdes et de 0,8 pour les huîtres tétraploïdes.

3) Analyse statistique des données

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel XLSTAT pour les traitements statistiques. Les représentations graphiques des données après traitement statistique sous forme de « Box plot » donnent des indications sur la tendance centrale des valeurs, leur variabilité, la symétrie de la distribution et la présence des valeurs atypiques. Il existe plusieurs possibilités de représentation du « box plot ». Le logiciel XLSTAT utilise la forme suivante :

- Le premier quartile Q1 correspond au bord inférieur de la boîte,
- La médiane Q2 correspond à un trait noir,
- La moyenne correspond à une croix rouge,
- Le troisième quartile Q3 correspond au bord supérieur de la boîte.
- Deux intervalles sont définis de part et d'autre des premier et troisième quartiles :
- $IQ1 = [Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1), Q1]$
- $IQ3 = [Q3, Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)]$
- La moustache inférieure du box plot s'étend de Q1 jusqu'à la valeur la plus proche de la borne inférieure de IQ1, en restant à l'intérieur de IQ1,
- La moustache supérieure du box plot s'étend de Q3 jusqu'à la valeur la plus proche de la borne supérieure de IQ3, en restant à l'intérieur de IQ3,
- Les valeurs en deçà de la moustache inférieure et au delà de la moustache supérieure sont représentées individuellement par des cercles. Ces cercles sont pleins lorsque les valeurs sont au delà de 3 fois l'écart interquartile ($Q3 - Q1$), et vides s'ils sont situés à l'intérieure de cet intervalle,
- Les valeurs minimale et maximale sont indiquées sur le box plot.

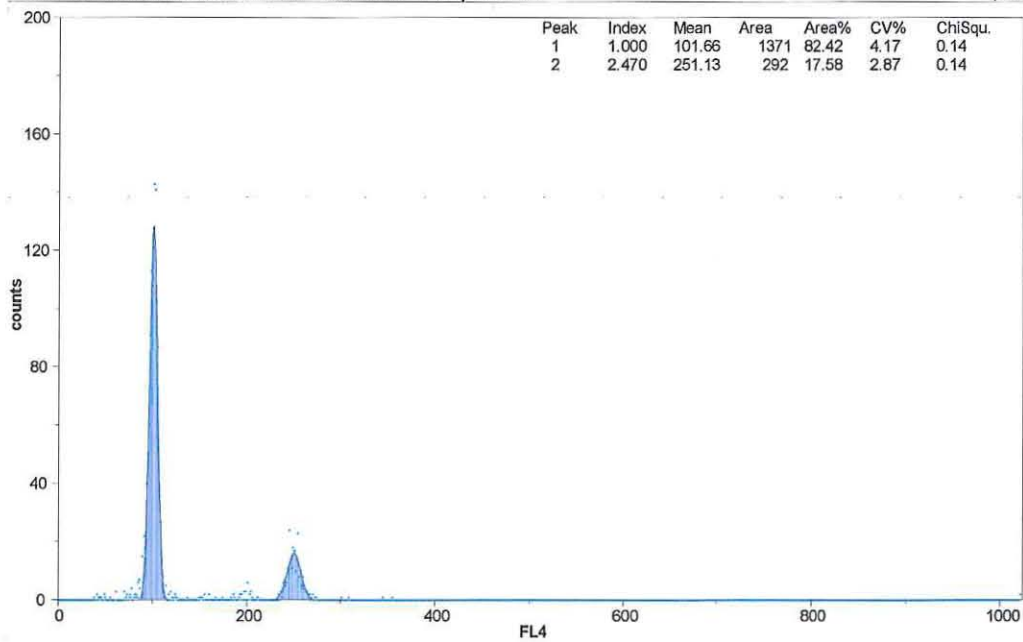


Figure 1 : Histogramme caractéristique d'un animal diploïde (ratio de 0.40)

Peak : Numéro du pic (de gauche à droite ? 1 : échantillon, 2 : témoin interne TRBC).

Index : Position relative du pic en relation avec le premier pic.

Mean : Position moyenne des événements du pic.

Area : Aire du pic, correspondant au nombre de particules appartenant au pic.

Area% : Pourcentage de l'aire du pic relatif de la somme de toutes les aires des pics.

CV% : Coefficient de variation relatif du pic (largeur à mi hauteur du pic).

ChiSqu : Mesure de la variation entre les données expérimentales et le modèle mathématique du pic. Plus le ChiSqu est petit et plus le modèle mathématique se rapproche des données expérimentales.

III. Résultats

En 2011, un total de 1814 individus issus du captage naturel réalisé en 2010 dans les différents bassins de captage ont été individuellement analysés. Un premier tri a été réalisé afin d'éliminer les individus dont le CV% du témoin interne ne permettait pas une interprétation fiable des résultats. 1503 échantillons ont donc été finalement retenus, à raison de 456 naissains issus d'Arcachon, 884 naissains captés à Marennes Oléron et 163 naissains captés en baie de Bourgneuf.

1) Bassin d'Arcachon

Au total, 456 naissains analysés ont été retenus pour ce bassin. Les ratios observés sont compris entre 0,307 et 0,444 (tableau 2 et figure 2).

Statistique	Camprian	Gorp	Les Jalles
Nb. d'observations	157	160	139
Minimum	0,319	0,368	0,307
Maximum	0,419	0,444	0,438
Moyenne	0,392	0,422	0,397
Ecart-type (n)	0,021	0,012	0,025

Tableau 2 : Données obtenues au sein du bassin d'Arcachon

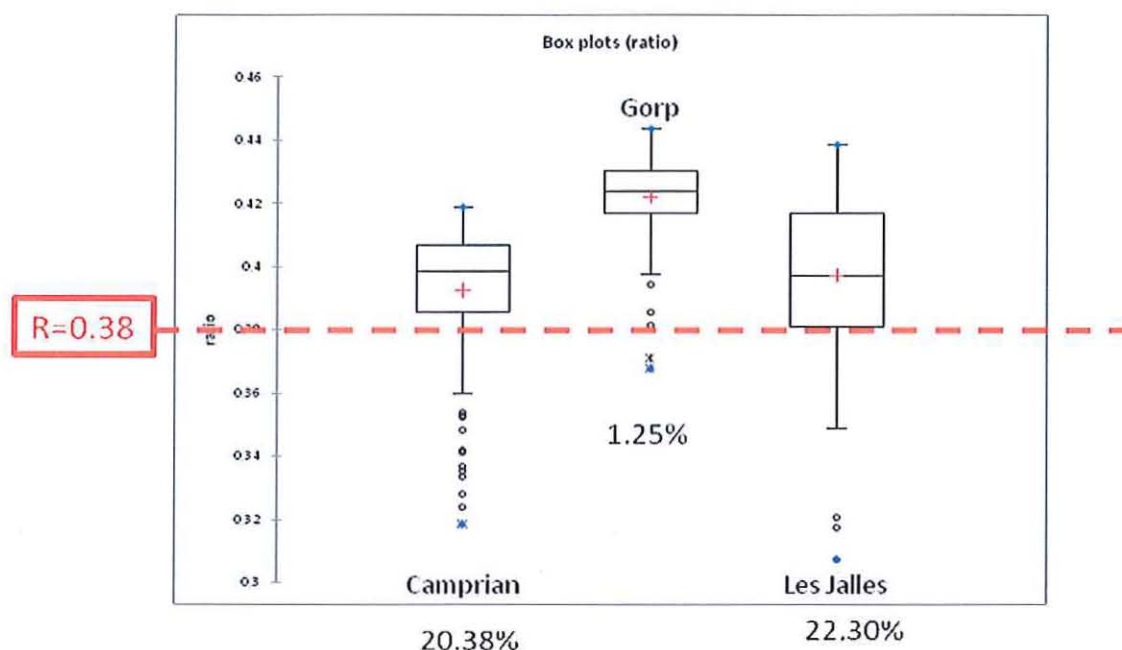


Figure 2 : Distribution intersites des ratios de fluorescence au sein des trois sites prospectés du bassin d'Arcachon. Les pourcentages de naissains ayant un ratio inférieur à 0,38 sont indiqués sous chaque site correspondant.

En se basant sur les ratios moyens de fluorescence standardisés caractéristiques des huîtres triploïdes (0,60) ou tétraploïdes (0,80), nos données ne mettent pas en évidence la présence d'aucun naissain polyploïde au sein de ces trois sites analysés (figures 2).

Pour le bassin d'Arcachon, des taux variables de naissains ayant une réduction de leur taille du génome (ratio inférieur à 0,38), considérés ici comme hypodiploïdes, ont été détectés dans tous les sites analysés. Toutefois, les sites de Camprian et les Jalles apparaissent comme étant particulièrement touchés par cette hypodiploïdie vu que plus de 20% des naissains analysés de ces sites ont une taille du génome inférieure à la taille d'un génome

diploïde. Dans le troisième site (Gorp), ce pourcentage de naissains hypodiploïdes est beaucoup plus bas et correspond à 1.25 %. Toutefois, il est important de noter que des mortalités notables ont été détectées sur les naissains issus de ce site ce qui pourrait expliquer le faible taux de naissains ayant une plus petite taille de génome au niveau de ce site.

Le test de normalité montre que les données ne sont pas normales, (p-value unilatérale < 0,0001). Un test non paramétrique de comparaison de k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis a donc été appliqué. Pour le bassin d'Arcachon, ce test a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les sites (p-value < 0,0001 donc $\alpha = 0,05$). Ainsi, les sites Les Jalles et Camprian, qui sont les plus touchés par l'hypodiploïdie ADN, sont significativement différents du troisième site qui (Gorp) qui est lui plus fortement touché par l'hypodiploïdie ADN.

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes
ratio Camprian	157	23751,000	151,280	A
ratio Les Jalles	139	25852,000	185,986	A
ratio Gorp	160	54593,000	341,206	B

2) Bassin de Marennes Oléron

Au total, 884 naissains analysés ont été retenus pour ce bassin. Les ratios observés sont compris entre 0,338 et 0,427 pour le Bassin de Marennes Oléron (tableau 3 et figure 3).

Statistique	Bonne anse	Estrée	Marcilly	Moulières	Seudre
Nb. d'observations	161	214	187	159	163
Minimum	0,307	0,302	0,334	0,339	0,314
Maximum	0,430	0,430	0,445	0,432	0,436
Moyenne	0,402	0,406	0,417	0,408	0,400
Ecart-type (n)	0,016	0,018	0,018	0,014	0,024

Tableau 3 : Données obtenues au sein du bassin de Marennes Oléron.

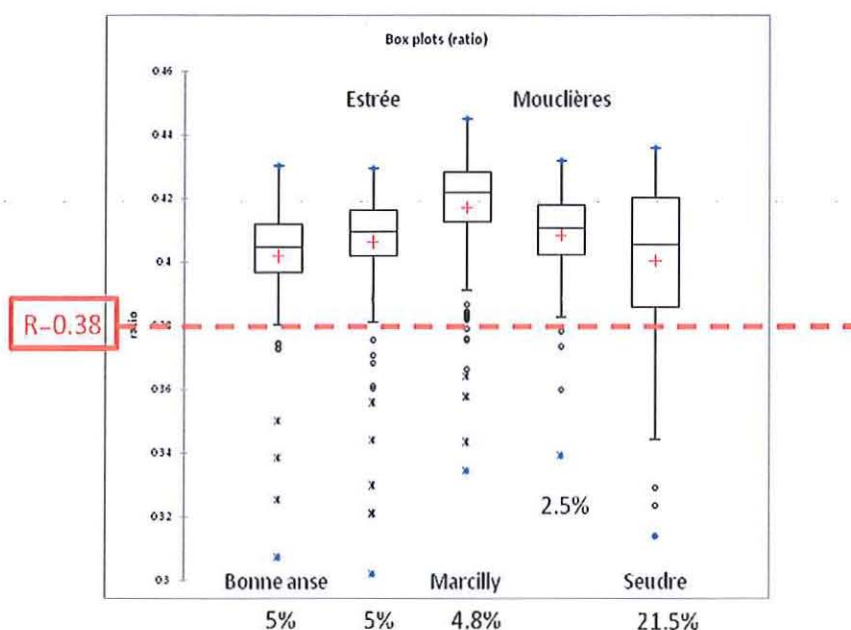


Figure 4 : Distribution intersites des ratios de fluorescence au sein des trois sites prospectés du bassin d’Arcachon. Les pourcentages de naissains ayant un ratio inférieur à 0.38 sont indiqués sous chaque site correspondant.

En se basant sur les ratios moyens de fluorescence standardisés caractéristiques des huîtres triploïdes (0,60) ou tétraploïdes (0,80), nos données ne mettent pas en évidence la présence d’animaux polyploïdes au sein de ces trois sites analysés (figures 4).

Pour ce bassin de Marennes Oléron, et comme pour les autres années, des taux variables de naissains ayant une réduction de leur taille du génome (ratio inférieur à 0.38), considérés ici comme hypodiploïdes, ont été détectés dans certains sites analysés de ce bassin de Marennes Oléron. Toutefois, contrairement aux années précédentes, la majorité des sites (Bonne anse, Estrée, Moulières et Marcilly) présente un taux faible ne dépassant pas 5% de naissains aneuploïdes. Seul le site de la Seudre se révèle affecté par un taux élevé d’aneuploïdie dépassant les 21%. Il est toutefois utile de rappeler que les naissains échantillonnés et analysés durant cette étude provenaient de sites affectés par des taux significatifs de mortalité, soit sur capteurs soit juste avant les analyses cytométriques.

De même que pour le bassin d’Arcachon, les données cytométriques du ratio obtenues dans le bassin de Marennes Oléron ont été traitées par un test non paramétrique de comparaison de k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis. Pour ce bassin de Marennes Oléron, les seules différences significatives sont :

- celles entre le site de Bonne Anse, d’une part, et les sites de Marcilly, Estrée et Moulières, d’autre part.
- celles entre Marcilly et tous les autres sites analysés

De ces analyses, il ressort que le site de Marcilly est celui qui est garni de naissains ayant la taille du génome la moins affecté par la perte de matériel génétique. Les sites de Seudre et de Bonne Anse semblent être les sites où les naissains captés sont le plus touchés par la perte de matériel génétique. Enfin, les autres sites (Moulières et Estrée) présentent des naissains avec des valeurs normales de tailles des génomes.

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes
ratio Bonne anse	161	53067,000	329,609	A
ratio Seudre	163	61574,000	377,755	A B
ratio Estrée	214	89628,000	418,822	B
ratio Mouclières	159	70410,000	442,830	B
ratio Marcilly	187	116491,000	622,947	C

3) Baie de Bourgneuf

Au total, 163 naissains analysés ont été retenus pour ce bassin. Les ratios observés sont compris entre 0,374 et 0,445 pour l'unique site de captage de cette baie de Bourgneuf (Bernerie en Retz) ; (tableau 4 et figure 4).

Statistique	Bourgneuf
Nb. d'observations	163
Minimum	0,374
Maximum	0,445
Moyenne	0,424
Ecart-type (n)	0,010

Tableau 4 : Données obtenues au sein du bassin de Marennes Oléron.

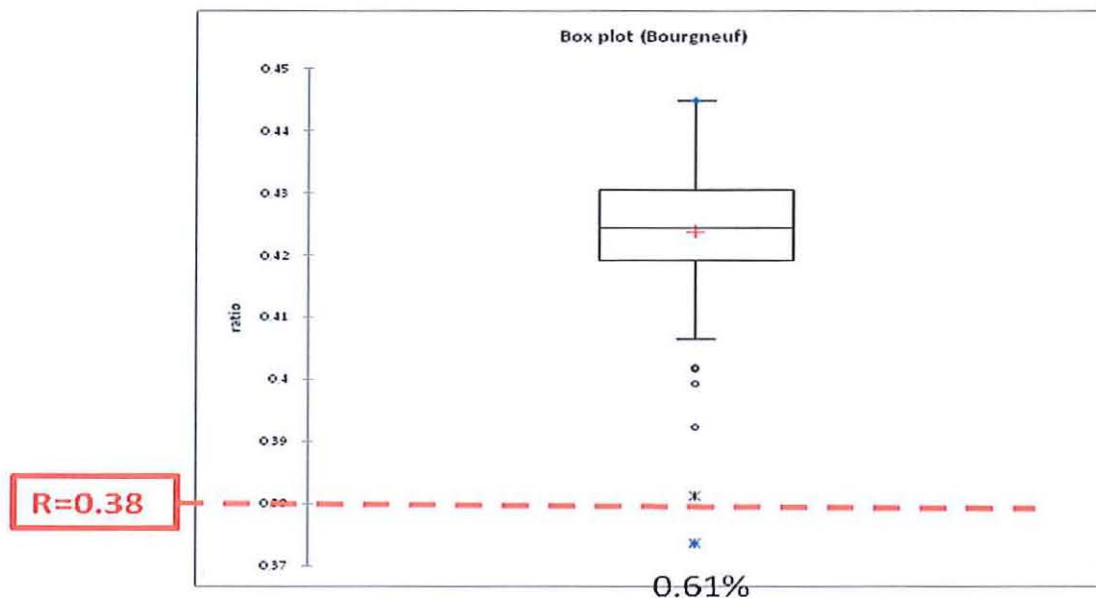


Figure 5 : Distribution des ratios de fluorescence au sein du site prospecté de la baie de Bourgneuf (bassin de Vendée). Le pourcentage de naissains ayant un ratio inférieur à 0.38 est indiqué.

En se basant sur les ratios moyens de fluorescence standardisés caractéristiques des huîtres triploïdes (0,60) ou tétraploïdes (0,80), nos données ne mettent pas en évidence la présence d'animaux polyploïdes, ni triploïdes ni tétraploïdes, au sein de ce site analysé de la baie de Bourgneuf en Vendée (figures 5).

4) Comparaison des trois bassins

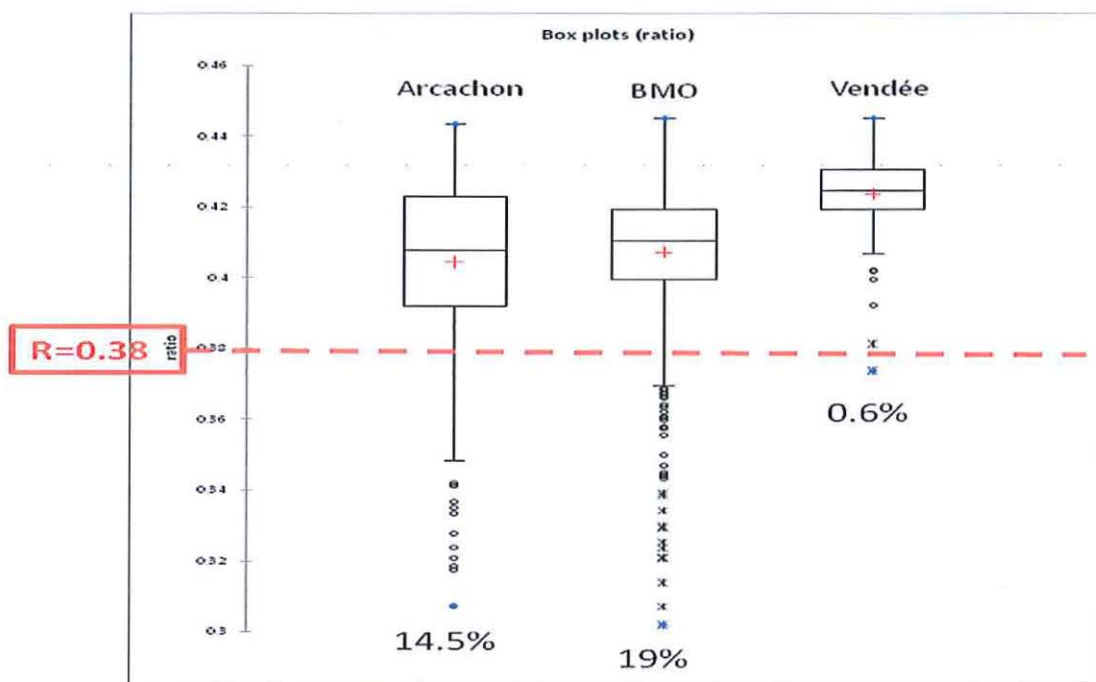


Figure 6 : Distribution interbassins des ratios de fluorescence obtenus pour les naissains captés en 2010 et analysés en 2011. Les pourcentages de naissains ayant un ratio inférieur à 0.38 sont indiqués sous chaque bassin correspondant.

Concernant les données à l'échelle d'un bassin en entier, en se basant sur les ratios typiques d'animaux polyploïdes, nos analyses n'ont pas montré la présence d'animaux polyploïdes, ni triploïdes ni tétraploïdes, au sein des trois bassins de captage étudiés durant cette campagne 2011.

Les données cytométriques du ratio obtenues à l'échelle de bassins entier ont été comparées par un test non paramétrique de comparaison de k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis. Pour ces trois bassins, l'analyse montre une différence significative entre d'une part les bassins d'Arcachon et de Marennes Oléron, caractérisés par une forte prévalence en naissains aneuploïdes ADN, et d'autre part, le bassin de baie de Bourgneuf en Vendée qui lui apparaît comme pratiquement indemne de naissains aneuploïdes ADN.

Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes
ratio Arcachon	456	313694,000	687,925	A
ratio BMO	884	629192,000	711,756	A
ratio Vendée	163	187370,000	1149,509	B

IV. Conclusion et perspectives

En se basant sur les ratios moyens de fluorescence standardisés caractéristiques des huîtres triploïdes (0,60) ou tétraploïdes (0,80), il apparaît clairement que, comme pour les autres années, nos analyses **ne mettent pas en évidence la présence d'animaux polyploïdes, triploïdes et à fortiori tétraploïdes, dans les naissains issus du captage naturel, dans les trois bassins qui fournissent l'essentiel de ce naissain de captage, Marennes Oléron, Arcachon et, dorénavant, la baie de Bourgneuf**. Il n'est pas mis en évidence la présence de polyploïdes dans les naissains recrutés malgré un effort d'échantillonnage important et supérieur au minimum initialement défini (9 sites au lieu de 6, 1800 naissains au lieu des 500 et 3 bassins au lieu de deux initialement préconisés). Ces résultats sont conformes aux prévisions en la matière et n'apportent aucune raison de modification des pratiques ostréicoles en cours dans les 3 bassins.

Au sein des trois bassins de captage examinés en 2011 et en fonction du site de captage, les naissains issus de captage naturel 2010 montrent une tendance variable à la réduction de la taille de leur génome interprétée comme une aneuploïdie ADN. Il est important de signaler que depuis le début du réseau biovigilance, l'aneuploïdie ADN détectée dans tous les bassins prospectés a toujours été du type hypodiploïde, c à d obtenue suite à la perte, à partir d'un état initial diploïde, d'une quantité d'ADN équivalente à un ou plusieurs chromosomes. En effet, depuis le début des campagnes de suivi réalisées dans le cadre du réseau biovigilance, aucun naissain aneuploïde du type hypo ou hyper-triploïde (perte ou gain de chromosomes à un état triploïde) n'a été détecté, ni à Arcachon, ni à Marennes Oléron, ni comme c'est le cas en 2011 en baie de Bourgneuf. Ceci implique que l'aneuploïdie hypodiploïde ADN observée jusqu'à nos jours dans les deux bassins de captage suivis dans notre réseau n'est pas liée à une reproduction des triploïdes, qui est pour rappel la seule capable de produire dans les essais de laboratoire des naissains hyper et hypotriploïdes. L'hypodiploïdie ADN détectée dans les deux bassins de captage étudiés pourrait être le résultat de l'impact direct de facteurs environnementaux particuliers notamment via les précipitations qui entraînent un lessivage des sols, en particulier agricoles, et par conséquent un apport de produits toxiques tels les herbicides, fongicides et métaux lourds dont l'action génotoxique (aneugène et clastogène) est bien établie chez les invertébrés marins, en particulier les huîtres et les moules (Dixon 1982 ; Stiles et al. 1991 ; Wersto et al. 1991 ; Parry. 1998 ; Bihari et al. 1999, 2003 ; Barsienne et Lovejoy 2000 ; Thiriot-Quiévreux et Wolowicz 2001 ; Bihari et al. 2003 ; Bouilly et al. 2003).

Hormis les sites Seudre (Marennes Oléron), les Jalles et Camprian (Arcachon) qui sont caractérisés par des forts taux de naissains aneuploïdes ADN (plus de 20%), tous les autres sites analysés en 2011, montrent des niveaux faibles d'aneuploïdie ADN (entre 0.6 à 5%). Ces faibles taux d'aneuploïdie ADN sont à relativiser car tous ces lots ont subi de fortes mortalités précoces et ensuite, soit en cours d'envoi, soit en cours d'analyse. L'aneuploïdie ADN des naissains a été montrée comme significativement corrélée avec des performances de survie plus basses (Benabdelmouna et al. 2010). Nous savons que la majorité des lots analysés durant cette campagne biovigilance 2011 ont déjà subi une mortalité précoce sur capteurs et cela durant l'été/automne 2010. Il est donc justifié de considérer que cette mortalité s'est accompagnée d'une baisse du taux d'anomalies génomiques observée sur certains des lots analysés en 2011. Lors de ces analyses au printemps 2011, les taux d'anomalies génomiques sont plus faibles pour les lots qui ont subi une mortalité précoce plus forte en 2010, que pour les lots peu touchés par cette mortalité précoce sur capteurs. Ceci est particulièrement net pour le lot issu de la baie de Bourgneuf : il apparaît particulièrement indemne d'anomalies génomiques alors qu'il a subi une très forte mortalité sur capteur et juste avant analyse. Il est donc envisageable d'utiliser le taux d'anomalie génomique comme un des indicateurs d'une mortalité précoce et il est fondé de se questionner sur la capacité des animaux hypodiploïdes à survivre face aux perturbations, biotiques et abiotiques, qu'ils vont rencontrer durant leur élevage.

Les campagnes successives de Biovigilance permettent de conclure à une occurrence très significative de l'aneuploïdie ADN dans les principaux bassins de captage en France. Par conséquent, il est fortement recommandé d'accorder un soin particulier à la caractérisation la plus fine et la plus précoce possible du taux d'aneuploïdie ADN au sein des différents bassins de captage qui fournissent les trois quarts des naissains de la conchyliculture française.

Bibliographie :

- AlSabti, K., Kurelec, B., 1985. Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 660–665.
- Baršien, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Šyvokien, J., Kopecka, J., and Förlin, L. (2005). Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. From different zones of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 53, Issues 8-9, 2006, Pages 469-478.
- Barsienne, J. and Lovejoy, D.B. (2000) Environmental genotoxicity in Klaipeda port area. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 85, 663–672.
- Benabdelmouna, A., Cornette, F., Grouhel, S., Lapegue, S., Boudry, P., et Gouilletquer, P. (2005). Suivi du niveau de ploïdie des huîtres dans les deux bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon. Rapport biovigilance 2005.
- Benabdelmouna, A., Grouhel, S., D'Amico, F., Cantin, C., Grizon, J., Seugnet, J.L. (2007). Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon. Campagne biovigilance 2007.
- Benabdelmouna, A., Huber, M., Cantin, C., D'Amico, F., Grizon, J., Seugnet, J.L. (2008). Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon. Campagne biovigilance 2008.
- Benabdelmouna, A., Tourbiez, D., D'Amico, F., Cantin, C., Grizon, J., Seugnet, J.L. (2009). Niveau de ploïdie des naissains d'huître creuse captés dans les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon. Réseau Biovigilance, campagne 2009.
- Benabdelmouna, A., Hemissi, I., Robert, S., Bodin, S., Ledu, C., et Laporte, P. Etude comparative des caractéristiques cytogénétiques et des performances de survie de naissains sauvages issus du CAPtage PREcoce ou TARdif. Bilan du projet « surmortalité des huîtres creuses 2010 ». 1 et 2 décembre 2010. IFREMER, Centre Atlantique, Nantes
- Bickham, J.W., 1990. Flow cytometry as a technique to monitor the effects of environmental genotoxins on wildlife populations. In: Sandhu, S., Lower, W.R., De Serres, F.J., Suk, W.A., Tice, R.R. (Eds.), *In Situ Evaluation of Biological Hazards of Environmental Pollutants*. Environmental Research Series, vol. 38. Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 97–108.
- Bickham, J.W., Hanks, B.G., Smolen, M.J., Lamb, T. and Gibbons, J.W. (1988). Flow cytometric analysis of low-level radiation exposure on natural populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17 : 837-841.
- Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K., 1999. Flow cytometry in marine environmental research. *Periodicum Biologorum* 101, 151–155.
- Bihari, N., Mic'ic, M., Batel, R. and Zahn, R.K. (2003). Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. *Aquatic Toxicology* 64 (2003) 121–129.
- 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 (1): 229-233.
- Chevassus au Louis, B. (1998). Effet d'un flux éventuel de tétraploïdes dans les zones conchylicoles : évaluation de l'impact environnemental. Rapport d'expertise pour le Comité Scientifique du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (COSMAP), séance du 24/11/1998.
- Chevassus au Louis, B., Bœuf, G., Bonhomme, F., Mathieu, M. (2009). L'utilisation de naissain d'écloserie, en particulier triploïde, en ostréiculture : analyse des conséquences sanitaires, environnementales, génétiques et zootechniques. Rapport au Directeur de Cabinet du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche.
<http://agriculture.gouv.fr/sections/publications/rapports/utilisation-naissain-d>
- COMEPR (octobre 2004). Premier avis du comité Ostréiculture et biotechnologies.
<http://www.inra.fr/content/download/2364/23401/file/Comepra-ifremer.pdf>
- Cornette, F., Grouhel, S., Sharbel, T., Boudry, P., Gouilletquer, P. et Lapegue, S. (2004). Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon. Rapport biovigilance 2004.
- Deaven, L.L. (1982). Application of flow cytometry to cytogenetic testing of environmental mutagens. In: T.C. Hsu (Editor), *Cytogenetic Assays of Environmental Mutagens*. Allanheld, Montclair, NJ, pp. 325-351.
- Dixon, D.R. (1982) Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.*, 3, 155–161.
- Elston, R.A., Moore, J.D., Brooks, K., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve mollusks. *Rev. Aquat. Sci.* 6, 405–466.

- Fernandez, M., L'Haridon, J., Gauthier, L. and Zoll-Moreux, C. (1993). Amphibian micronucleus test(s) : a simple and reliable method for evaluating *in vivo* genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutat. Res.*, 292: 83-89.
- Galloway, S.M. (1994). Chromosome aberrations induced *in vitro* : mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ. Mol. Mutagens.*, 23(suppl)24 : 44-53.
- Grouhel, S., D'Amico, F., Cantin, C., Grizon, J., Benabdelmouna, A. (2006). Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes Oléron et Arcachon. Rapport biovigilance 2006.
- Krepinsky, A.B. and Heddle, J.A. (1983). Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-induced chromosomal aberrations; In: T. Ishihara and M.S. Sasaki (Editors), *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*; Alan R.L. Liss, NY, pp 93-109.
- Lamb, T., Bickham, J.W., Gibbons, J.W., Smolen, M.J. and McDowells, S. (1991). Genetic damage in a population of slider turtles (*Trachemys scripta*) in a radioactive reservoir. *Arc. Environ. Contam. Toxicol.*, 20 :138-142.
- Leitao, A., Boudry, P., and Thiriot-Quievreux, C. (2001). Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome* 44 (4) : 735-737.
- Lowcock, L.A., Sharbel, T.F., Bonin, J., Ouallet, M., Rodrigue, J., DesGranges, J.-L., 1997. Flow cytometry assay for *in vivo* genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamintas*). *Aquat. Toxicol.* 30, 241_255.
- McBee, K. and Bickham, J.W. (1988). Petrochemical-related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry. *Bull; Environ. Contam. Chem.*, 13 :259-265.
- Parry, J.M. (1998) Detecting chemical aneuploids: a commentary to Aneuploidy: a report of an ECETOC task force'. *Mutat. Res.*, 410, 117-120.
- Stiles, S., Chromanski, J., Nelson, D., Miller, J., Creig, R. and Sennenfelder, G. (1991) Early reproductive success of the hard clam (*Mercuraria mercenaria*) from five sites in Long Island Sound. *Estuaries*, 14, 332-342.
- Thiriot-Quievreux, C. and Wolowicz, M. (2001) Chromosomal study of spatial variation of the prevalence of a gill neoplasia in *Macoma balthica* (L.) from the Gulf of Gdansk (Baltic sea). *Ophelia*, 54, 75-81.
- Wersto, R.P., Liblit, R.L., Koss, L.G., 1991. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Progr. Pathol.* 22, 1085-1098.

Camprian	Arcachon	0,35
Camprian	Arcachon	0,35
Camprian	Arcachon	0,34
Camprian	Arcachon	0,34
Camprian	Arcachon	0,34
Camprian	Arcachon	0,34

Camprian	Arcachon	0,34
Camprian	Arcachon	0,33
Camprian	Arcachon	0,33
Camprian	Arcachon	0,32
Camprian	Arcachon	0,32



Bassin de Marennes Oléron



Bassin d'Arcachon



Baie de Bourgneuf