



**Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006**

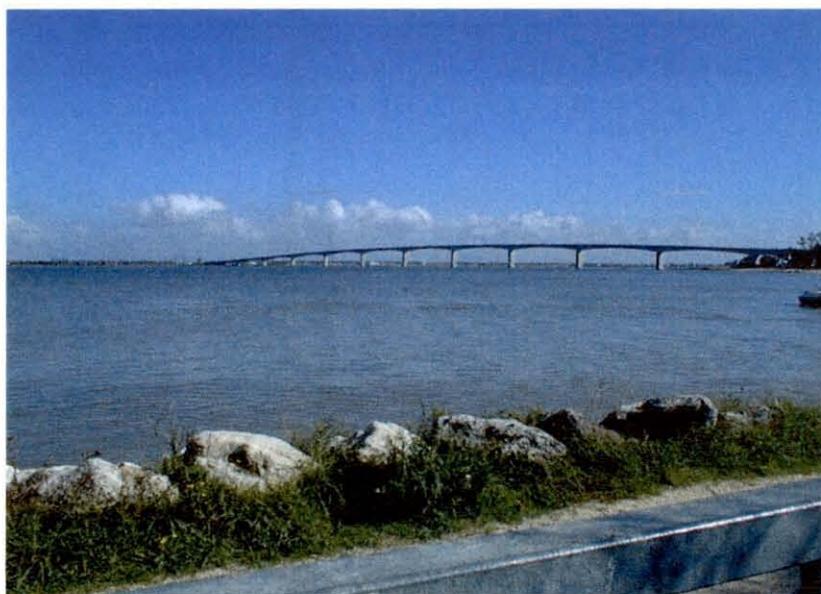
**Convention N°2001-RPC-A-212**

**"Génétique"**

**Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique**

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

**S. Lapègue<sup>1</sup>, H. McCombie<sup>2</sup>, A. Leitão<sup>1</sup>, K. Bouilly<sup>1</sup>, S. Sabatier<sup>1</sup>,  
S. Heurtebise<sup>1</sup>, P. Boudry<sup>1</sup>, C. Thiriot<sup>2</sup>, et A. Gérard<sup>1</sup>**



<b>(1) IFREMER</b> <b>Laboratoire de Génétique et Pathologie</b>	<b>(2) CNRS</b> <b>Observatoire Océanologique de</b> <b>Villefranche sur Mer</b>
<b>BP 133, 17390 La Tremblade</b> <b>Tél. 05 46 36 98 36</b> <b>Fax. 05 46 36 37 51</b>	<b>06230 Villefranche sur Mer</b> <b>Tél. 04 93 76 38 25</b> <b>Fax. 04 93 76 38 93</b>

## SOMMAIRE

<b>1. CONTEXTE DES ÉTUDES MENÉES EN 2001</b> .....	<b>3</b>
<b>2. LE CAPTAGE 2000 : COHORTES DE CAPTAGE</b> .....	<b>4</b>
2.1. ECHANTILLONNAGE.....	4
2.2. MÉTHODE D'ÉTUDE .....	6
2.3 . RÉSULTATS-COHORTES DE CAPTAGE.....	9
<b>3. SUIVI TEMPOREL D'UNE POPULATION D'ÉCLOSERIE</b> .....	<b>10</b>
3.1. MATÉRIEL.....	10
3.2. MÉTHODE DE CHOIX DES CLASSES DE TAILLE ET SUIVI DE LA MORTALITÉ .....	11
3.3. RESULTATS -SUIVI DANS LE TEMPS.....	12
<b>4. INFLUENCE DE L'ATRAZINE SUR LE TAUX D'ANEUPLOÏDIE</b> .....	<b>16</b>
4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	16
4.1.1. <i>Origine des huîtres étudiées</i> .....	16
4.1.2. <i>Protocole expérimental</i> .....	16
4.1.3. <i>Fécondations</i> .....	16
4.1.4. <i>Elevage larvaire</i> .....	17
4.1.5. <i>Etude de l'aneuploïdie</i> .....	17
4.2. RÉSULTATS.....	17
4.2.1. <i>Action de l'atrazine sur les mortalités des huîtres Crassostrea gigas adultes</i> .....	17
4.2.2. <i>Action de l'atrazine sur le matériel génétique des huîtres Crassostrea gigas adultes</i> .....	18
4.2.3. <i>Action de l'atrazine sur le matériel génétique du naissain de Crassostrea gigas</i> .....	19
4.2.4. <i>Comparaison des données obtenues chez Crassostrea gigas aux stades adulte et naissain</i> .....	19
4.2.5. <i>Action de l'atrazine sur la descendance d'une population d'huîtres Crassostrea gigas</i> .....	20
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>22</b>
<b>6. ANNEXES</b> .....	<b>23</b>
6.1. PROTOCOLES .....	23
6.2. RÉSULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVÉS.....	31
6.3. RÉSULTATS DES ANALYSES EFFECTUÉES PAR LE CEMAGREF DE BORDEAUX-CESTAS.....	38
6.4. TEMPÉRATURE DES BACS ET MORTALITÉ DES HUÎTRES <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> ADULTES AU COURS DE L'EXPÉRIENCE. ....	39
6.5. RÉSULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVÉS CHEZ LES HUÎTRES ADULTES. ....	40
6.6. RÉSULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVÉS CHEZ LES HUÎTRES AU STADE NAISSAIN.....	42
6.7. TAUX D'ÉCLOSION DES LARVES ISSUES DE CROISEMENTS D'HUÎTRES EXPOSÉES À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'ATRAZINE.....	44
6.8. TAILLES DES LARVES (µM) EN FONCTION DES DIFFÉRENTS LOTS ET DES JOURNÉES D'ÉLEVAGE (J).....	45

## 1. Contexte des études menées en 2001

Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ( $2n = 19$ , 18 ou même 17 au lieu de  $2n = 20$ ). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial. Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les "lots de queue", c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre plus de 30 %. Récemment, une étude réalisée au sein du programme européen « GenephyS » a démontré que plus de 50 % de la variance pour la vitesse de croissance était liée au taux d'aneuploïdie.

Cependant, de nombreux points concernant ce phénomène restent inconnus en particulier à cause des difficultés méthodologiques rencontrées lors de son étude. En 1999 et 2000, des expérimentations ont été menées afin de faire un état des lieux du niveau d'aneuploïdie des populations du bassin de Marennes-Oléron, et plus particulièrement des sites de captage, afin de déterminer si certains sites pouvaient être davantage touchés que d'autres. Le travail de 2000, en contraste avec celui de 1999, a démontré un taux d'aneuploïdie plus élevé dans une des zones de captage du bassin. Le site le plus touché semble également le plus pollué. Il nous est donc apparu intéressant d'étudier cette année la relation entre aneuploïdie et facteurs environnementaux.

La relation 'classique' entre taille et aneuploïdie a été mise en évidence dans la population de ce site. Cependant, dans les autres sites, cette relation n'était pas si claire. En 1999, les tests statistiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les cinq populations étudiées. Cependant, il est apparu que les animaux appartenant à la classe des « moyens » étaient globalement moins aneuploïdes que ceux classés « petits » ou « grands », et ce, dans toutes les populations. Ce dernier résultat est plutôt étonnant et reflète très certainement les difficultés de comparer des classes de taille de populations naturelles. En effet, les collecteurs peuvent avoir recueilli différentes cohortes de pontes et donc des animaux d'âge différent, biaisant ainsi le classement effectué sur le poids. C'est toute la difficulté d'étudier ce caractère sur des populations naturelles. Afin de mieux comprendre l'influence de la 'cohorte' dans nos résultats, on a mené les expériences sur deux axes.

Les collecteurs placés pendant l'été 2000, pour l'étude actuelle, ont été mis à l'eau sur un site de captage de façon séquentielle pendant trois périodes de deux semaines, afin d'obtenir des animaux, si possible d'une même cohorte ou tout au moins provenant d'un nombre réduit de cohortes, dont les émissions auront été proches dans le temps.

Les travaux de cette année ont également abordé la question de la relation aneuploïdie-taille d'une autre façon. Des échantillonnages successifs sur une même cohorte provenant d'un croisement contrôlé en éclosérie ont été réalisés. Avec cette population artificielle, on est sûr que l'âge des huîtres est uniforme et consécutivement que leurs différences de taille sont le résultat d'autres facteurs. Cette approche a également permis d'étudier l'aneuploïdie à différents stades et de travailler sur les protocoles et préparations des stades précoces (embryons, larves).

Les travaux sur les facteurs environnementaux se sont focalisés pour la première fois cette année sur l'effet d'un herbicide, utilisé en grande quantité dans la région et constituant un polluant non négligeable dans le Bassin de Marennes-Oléron. Des expérimentations aux stades adulte et naissain ont ainsi été mises en place afin de déterminer si cet herbicide, l'atrazine, pouvait avoir des effets sur le taux d'aneuploïdie des huîtres du bassin.

## 2. Le Captage 2000 : Cohortes de Captage

### 2.1. Echantillonnage

Une approche précise de l'étude du taux d'aneuploïdie chez le naissain a été réalisée en 2000. Il s'agissait d'étudier des groupes d'huîtres captées sur une période assez courte afin de réduire l'hétérogénéité des animaux en terme d'âge, facteur qui peut influencer indépendamment la taille des animaux et ainsi masquer une éventuelle relation aneuploïdie-croissance.

Pour réaliser cette étude, des collecteurs ont été positionnés pendant trois périodes consécutives de 2 semaines chacune (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques de l'échantillonnage.

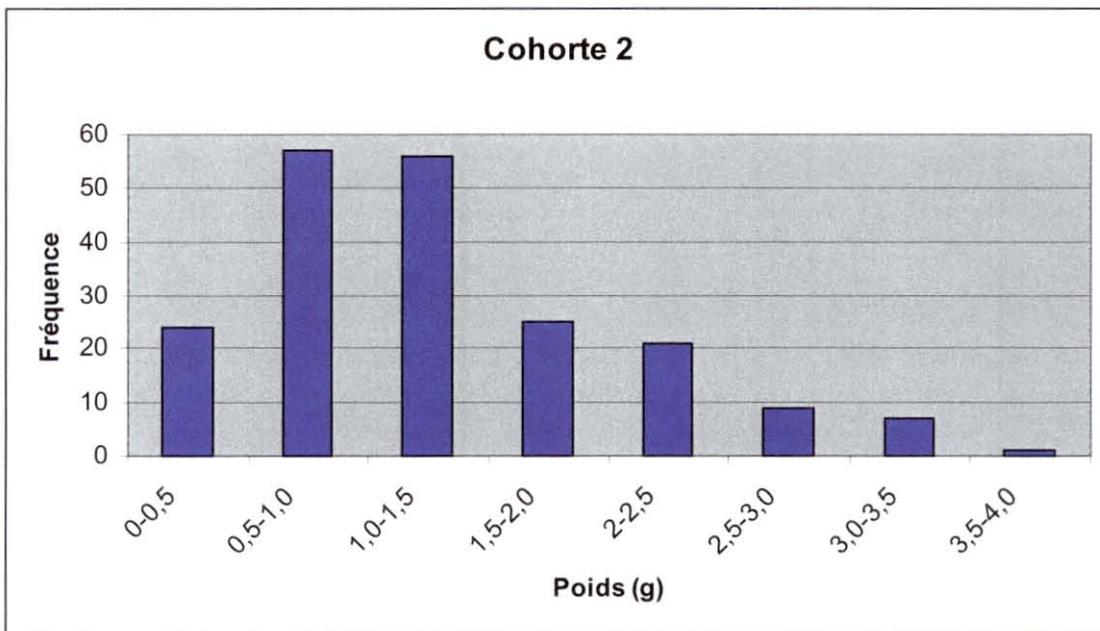
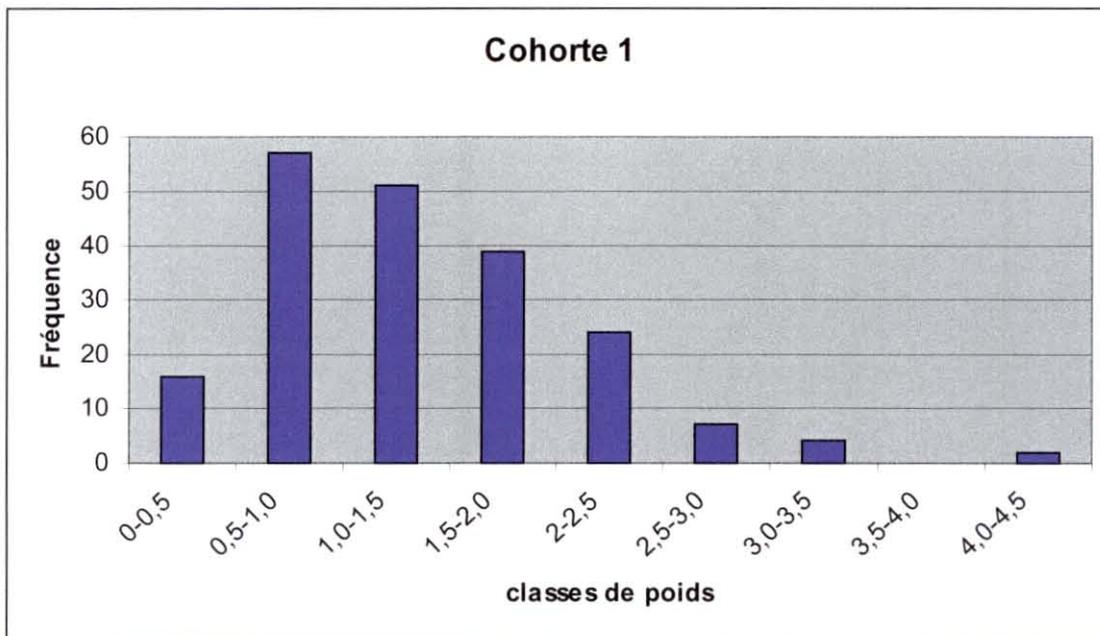
Site	Nature du matériel	Date de mise à l'eau des collecteurs	Date de prélèvement du matériel	Date de manipulation « aneuploïdie »
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/7/2000	16/8/2000	7/11/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	16/8/2000	29/8/2000	28/11/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/8/2000	18/9/2000	Animaux trop petits pour la manipulation

Malgré un captage assez moyen cette année-là, les collecteurs se sont avérés suffisamment fournis pour constituer trois lots d'étude. Après leur retrait du milieu marin, les collecteurs ont été placés dans des bassins de la station IFREMER de La Tremblade pendant dix semaines. Le détroquage a ensuite été réalisé et a été grandement facilité par l'utilisation de coupelles souples comme support de captage. Cette manipulation n'a ainsi entraîné qu'une perte très faible d'animaux alors que l'utilisation du système de capteurs en tuyaux PVC durs avait induit l'année précédente un nombre important d'animaux très abîmés (coquilles cassées), et donc rapidement morts ou d'animaux stressés.

Les animaux ont ensuite été placés dans des raceways dans l'écloserie avec une alimentation plus importante en phytoplancton afin de favoriser les divisions cellulaires.

Pour chaque cohorte, deux cents animaux, choisis aléatoirement, ont été pesés. Ceci a été fait la veille des manipulations après 10 semaines en raceway extérieur et 2 semaines à l'intérieur avec une augmentation de la température et de la quantité de nourriture. La figure 1 présente les histogrammes de distribution des poids de ces huîtres. Deux classes d'animaux ont été constituées : « petites » et « grosses ». Les extrêmes de chaque groupe ont été choisis mais en excluant les animaux de poids inférieur à 0,5 grammes, qui représentent une taille difficilement utilisable.

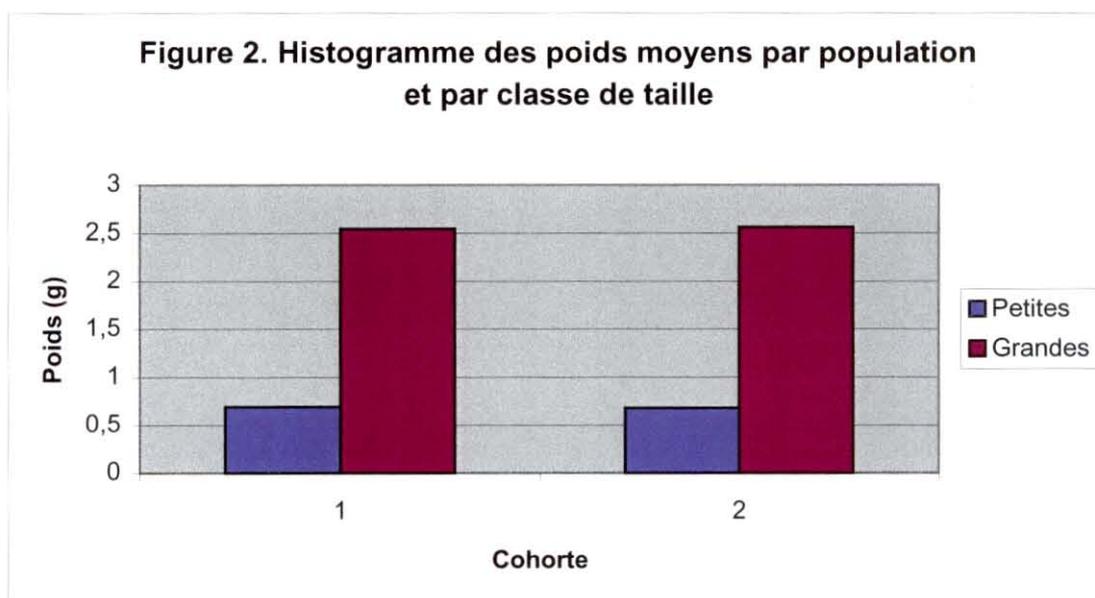
**Figure 1. Histogrammes de distribution des poids en grammes (Cohortes de Captage)**



Les moyennes et écart-types des poids pour chaque classe et chaque cohorte sont donnés dans le tableau 2. Les poids des animaux par population et par classe sont également représentés graphiquement sur la figure 2.

**Tableau 2 : Moyennes et écart-types des poids (g) des animaux étudiés pour chaque classe et chaque cohorte.**

Cohorte	Classe	Moyenne	Ecart-type
1	Petites	<b>0,69</b>	0,10
	Grandes	<b>2,55</b>	0,51
	Total	<b>1,56</b>	0,99
2	Petites	<b>0,68</b>	0,10
	Grandes	<b>2,56</b>	0,50
	Total	<b>1,62</b>	1,01



Il est notable que les deux cohortes ont globalement la même taille et que leur sous classes sont également comparables. Ces groupes représentent des huîtres de même âge mais de période de captage différente dans la saison (Tableau 1). Il est aussi remarquable que ces échantillons représentent une amplitude de variation de taille réduite par rapport à ceux de nos études des années précédentes dans la même zone géographique (Lapègue *et al.*, 1999, 2000) où les capteurs ont été laissés tout l'hiver.

## 2.2. Méthode d'étude

Deux grandes étapes peuvent être distinguées, l'une consistant en la préparation du matériel biologique et la seconde en la préparation des lames microscopiques sur lesquelles seront observés les chromosomes. La préparation des huîtres pour la visualisation des métaphases somatiques correspond à la fixation de matériel biologique dans lequel se trouve des cellules permettant l'observation des chromosomes. La préparation des lames

microscopiques consiste en l'étalement des cellules afin de réaliser la visualisation des chromosomes. Le détail de ces opérations a été exposé dans les rapports précédents. Les protocoles sont rappelés en annexe 1. Les fixations des fragments de branchies traités à la colchicine se sont déroulées les 7 et 28 novembre 2000. Les préparations de lames et les comptages de chromosomes se sont ensuite fait dans l'année qui a suivi. Une lame au minimum est nécessaire par échantillon. Si 30 mitoses n'ont pas pu être observées sur une première lame, une seconde voire une troisième est réalisée pour l'échantillon en question.

Le travail de comptage des chromosomes proprement dit peut alors commencer. Il se déroule sous microscope optique. Il s'agit tout d'abord de repérer les mitoses, ce qui constitue l'étape la plus fastidieuse. Cette étape dépend en grande partie de la qualité des étalements. Lorsqu'une mitose est repérée, la position sur la lame est notée (afin de ne pas compter plusieurs fois la même mitose) et elle est observée à plus fort grossissement ( $1,25 \times 10 \times 40$ ). Une caméra reliée à un écran permet de mieux visualiser la mitose et de compter les chromosomes. De façon générale, les métaphases sont a priori choisies au hasard tout en privilégiant une dispersion la plus homogène des chromosomes.

Depuis cette année, cette étape aurait pu être optimisée. En effet, grâce à l'aide financière apportée par la région Poitou-Charentes, le laboratoire LGP a pu acquérir un système permettant la recherche automatisée de métaphases (décembre 2000) (Figure 3). Cet appareil est composé d'un microscope Zeiss sur lequel est monté une platine motorisée qui peut accueillir huit lames en même temps. Une caméra reliée à un système informatique permet le traitement des images et leur visualisation. Le microscope balaie ainsi automatiquement des surfaces définies sur les huit lames et le logiciel permet la reconnaissance d'images ressemblant à des métaphases. Ces images sont stockées provisoirement sous formes de petites vignettes photographiques. L'opérateur, en "cliquant" sur une vignette montrant une métaphase, entraîne le repositionnement du microscope au-dessus de cette métaphase. Le comptage des chromosomes peut alors être réalisé. Il en découle un gain de temps non négligeable mais également un confort de travail pour le manipulateur.

En réalité le système de recherche automatisé a nécessité un travail profond de mise au point dû :

- 1) à des défaillances mécaniques et informatiques
- 2) aux adaptations nécessaires pour la lecture des lames d'huîtres. Ce travail a grandement occupé tous les membres de l'équipe cette année et a obligé plusieurs interventions des techniciens du fabricant Samba. Finalement, presque toute la lecture des lames décrite dans ce rapport a été faite 'manuellement', c'est-à-dire avec l'ancienne méthode de recherche à l'œil.



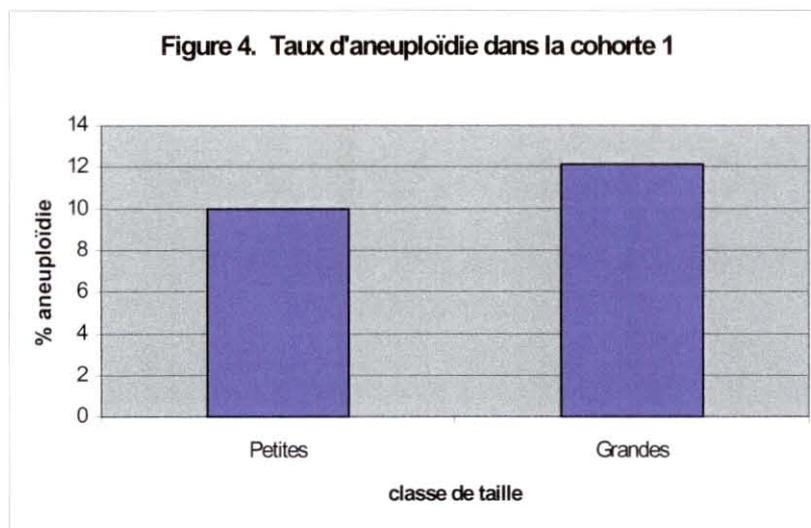
**Figure 3. Système de recherche de métaphases automatisé**

### 2.3 . Résultats-Cohortes de Captage

Les résultats sur le niveau d'aneuploïdie observé dans les populations captées à Fouras en 2000 ne montrent pas de différence significative entre petits et grands (ANOVA  $F=1,25$   $p=0,268$ ). Ce résultat est en accord avec celui trouvé à ce même endroit les deux années précédentes mais ne démontre pas la relation 'classique' négative entre taille et aneuploïdie trouvée dans les études précédentes (e.g. Leitão *et al.*, 2001a). Les valeurs du nombre moyen de cellules aneuploïdes par classe sont données en tableau 3 et montrées dans la figure 4.

**Tableau 3. Moyennes et écart-types du pourcentage d'aneuploïdie par classe de taille dans la cohorte 1**

Cohorte	Classe	Nombre de cellules aneuploïdes dénombrées dans 30 mitoses(Pourcentage)	Ecart-type
1	Petites	3 (10%)	2,46
	Grandes	3,63 (12,11%)	1,88
	Total	3,32 (11,05%)	2,20



Au vu de ce résultat, la cohorte 2 n'a pas été analysée en faveur des études sur la population d'écloserie suivie dans le temps.

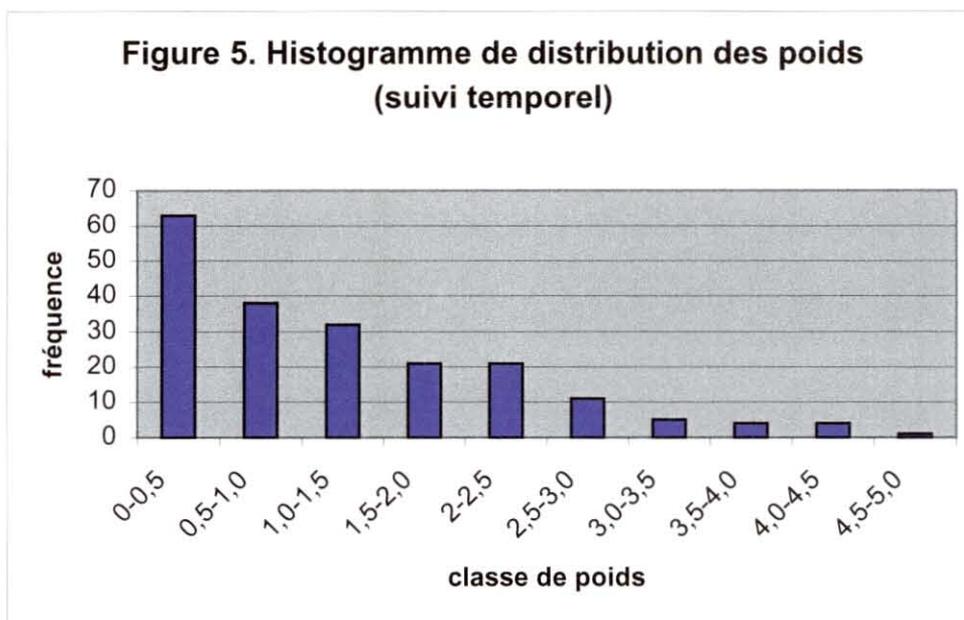
Il est à noter enfin que chez quelques animaux étudiés dans la cohorte 1, des cellules comportant plus de 20 chromosomes (21 à 23) ont été observées mais n'ont pas été comptabilisées dans nos analyses.

### 3. Suivi temporel d'une population d'écloserie

Le but du suivi dans le temps était de regarder les éventuels changements du taux d'aneuploïdie dans une population produite en conditions contrôlées et d'examiner si la relation aneuploïdie-taille évolue au cours du temps. L'expérience a aussi permis de réaliser les premiers essais de protocoles sur les stades précoces et une évaluation en détail d'une relation éventuelle entre mortalité et aneuploïdie dans des animaux de croissance différente.

#### 3.1. Matériel

La population provient d'un mélange de descendants de croisements biparentaux entre 6 mâles et 24 femelles réalisés le 2 février 2001 dans l'écloserie IFREMER de La Tremblade. Lorsque les larves ont atteint l'âge de 5 mois, un échantillon de 200 animaux a été pesé. La distribution des tailles est présentée dans la figure 5. Il peut être noté que la distribution n'est pas normale sur cette échelle linéaire. Il existe, en effet, un grand nombre de très petits animaux. Avec la technique de captage naturel utilisée dans le bassin de Marennes-Oléron lors de nos expériences précédentes, ces très petits animaux n'ont (1) pas pu être récoltés, ou (2) pas été enlevés des collecteurs. Dans l'écloserie, les pressions sélectives sont différentes de celles du milieu et permettent, fort probablement, la survie d'une plus grande échelle de taille de larves nées le même jour. Ce fait souligne l'importance d'une telle étude sur les lots provenant d'une écloserie où des études précédentes ont montré un taux d'aneuploïdie plus fort que pour les populations naturelles (GENEPHYS 2001, Leitão *et al.* 2001b). Cette comparaison revient à se poser la question suivante : « Dans le cas où les petits animaux s'avèrent bien plus aneuploïdes, l'élevage du naissain en écloserie aurait-il une tendance à promouvoir ce phénomène ? »



### 3.2. Méthode de choix des classes de taille et suivi de la mortalité

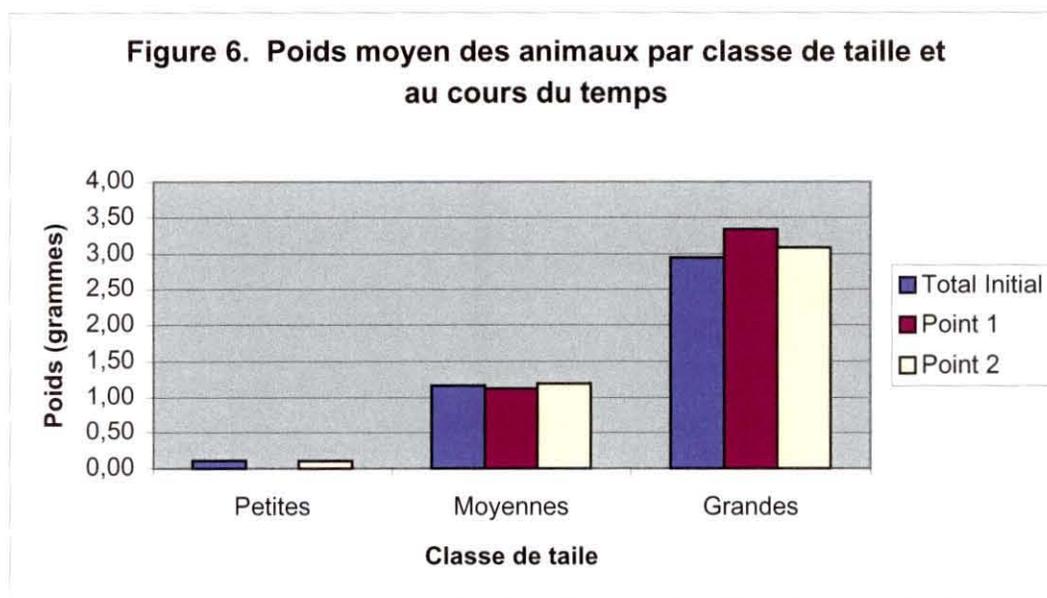
Trois classes de taille ont été définies à partir de cette distribution:

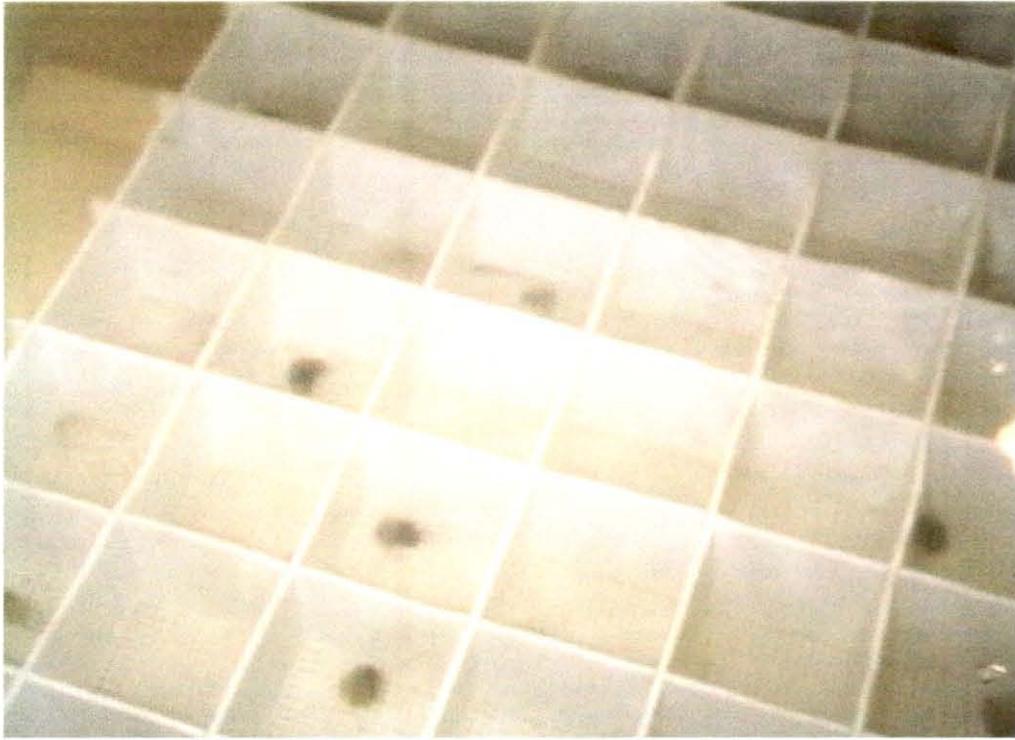
- Petites : moins de 0,2 grammes,
- Moyennes : entre 1 et 1,35 grammes,
- Grandes : plus de 2 grammes.

(voir Tableau 4, figure 6). Cette classification a permis de choisir des groupes représentatifs des plus grandes et des plus petites huîtres, et qui correspondent approximativement à 15% de chaque extrémité selon la distribution de la figure 5, ainsi qu'une classe centrée autour de la moyenne. Un total de 120 individus par classe a été placé dans des casiers structurés en cellules individuelles (Figure 7, Collet *et al.*, 1999). Les casiers ont été placés dans des raceways à l'intérieur de l'écloserie. Deux fois par semaine, la mortalité dans les casiers était contrôlée, les morts étant identifiés et enlevés. Une rotation des casiers à l'intérieur de chaque raceway a été périodiquement réalisée afin de réduire l'effet de cette composante environnementale.

**Tableau 4 : Moyennes et écart-types des poids (g) des animaux étudiés pour chaque classe et chaque point.**

Point	Classe	Moyenne	Ecart-type
Total Initial	Petites	0,112	0,046
	Moyennes	1,167	0,103
	Grandes	2,949	0,691
1	Moyennes	1,128	0,094
	Grandes	3,338	0,723
2	Petites	0,109	0,048
	Moyennes	1,196	0,115
	Grandes	3,086	0,320





**Figure 7. Casier structuré en cellules pour individualiser les huîtres dès le plus jeune âge**

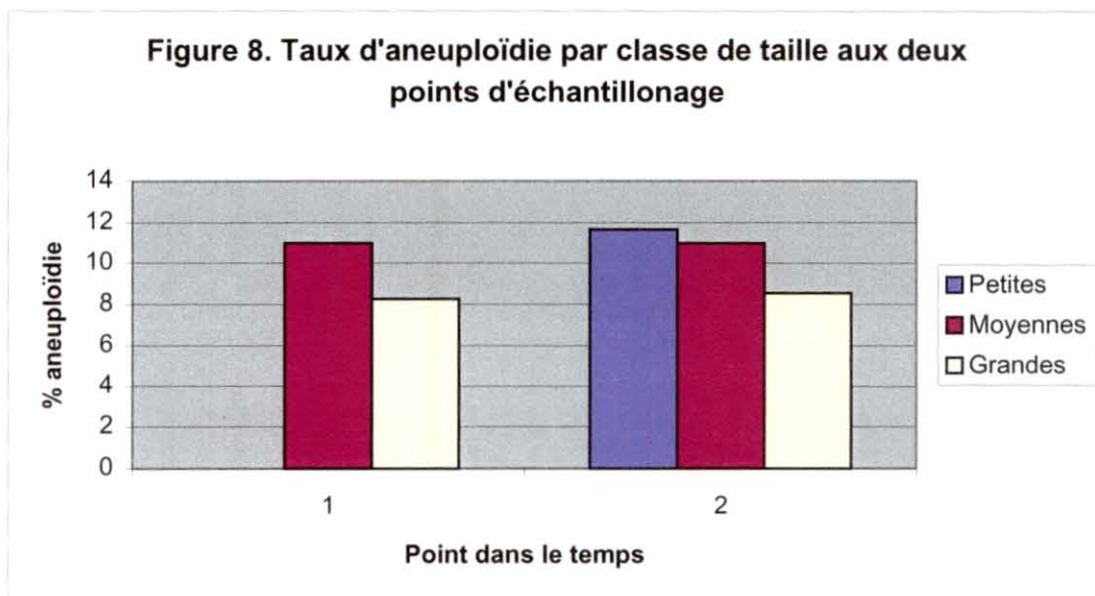
Les deux points temporels ont été réalisés le 10 juillet et le 3 septembre. A la première date, deux classes de taille seulement ont été concernées, les moyennes et les grandes, parce que les plus petits animaux étaient trop petits pour être étudiés. Lors du deuxième point, les trois classes ont été examinées. Le classement de taille, fait au début, s'applique aux deux points étudiés. Le suivi des mortalités permet de voir si une classe de taille a une sensibilité plus aiguë et, si c'est le cas, d'étudier la relation avec le taux d'aneuploïdie.

### **3.3. Resultats -Suivi dans le temps**

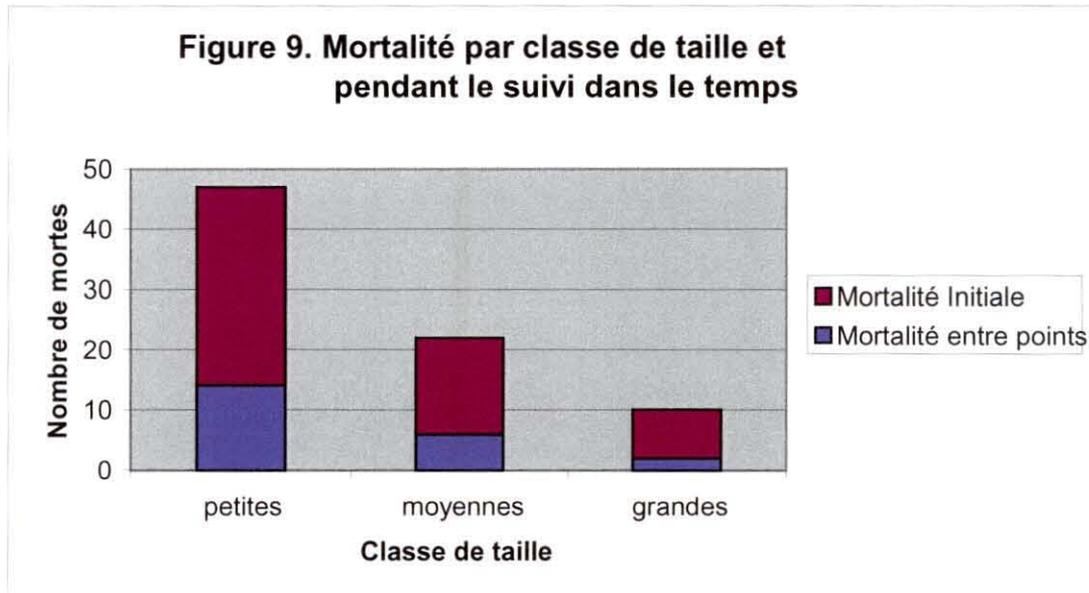
Le tableau 5 et la figure 8 présentent les moyennes des taux d'aneuploïdie observés dans les lots étudiés. La relation négative, entre aneuploïdie et taille est montrée par ces résultats (ANOVA petite/grande, deuxième point,  $F=4,056$ ,  $p=0,049$ ). Il est à noter que le taux d'aneuploïdie des deux points dans le temps sont très semblables et ne montrent en fait aucune différence (ANOVA sur moyennes  $F=0$   $p=1$  ; grandes  $F=0,039$   $p=0,844$  ; totale  $F=0,010$   $p=0,920$ ).

**Tableau 5. Moyennes et écart-types du pourcentage d'aneuploïdie par classe de taille et au cours du temps**

Point dans le temps	Classe de taille	Nombre de cellules aneuploïdes dénombrées dans 30 mitoses (Pourcentage)	Ecart-type
1- juillet	Moyennes	3,30 (11 %)	1,97
	Grandes	2,48 (8,27 %)	1,82
	Totale	2,90 (9,66 %)	1,93
2- septembre	Petites	3,50 (11,67 %)	2,09
	Moyennes	3,30 (11 %)	2,18
	Grandes	2,56 (8,53 %)	1,43
	Totale	2,93 (9,78 %)	1,87



Le taux d'aneuploïdie ne montre ainsi aucune évolution dans la population à l'échelle de temps étudiée. Bien que la petite taille de classe du premier point n'ait pas pu être étudiée, il est intéressant de noter que cette classe avait le taux de mortalité le plus élevé pendant la période expérimentale mais aussi le plus fort taux d'aneuploïdie.



Plusieurs études précédentes ont mis en évidence une corrélation négative entre aneuploïdie et taille. Dans l'expérience actuelle, tous les animaux, quelle que soit leur taille, ont subi les mêmes conditions environnementales. Cependant, les animaux appartenant à la petite classe de taille montrent toujours plus d'aneuploïdie et plus de mortalité. Comme il est actuellement impossible de regarder l'aneuploïdie *post-mortem*, il ne nous est pas possible de tester directement la relation entre aneuploïdie et mortalité. Une approche possible est un suivi de mortalité de lots dont les taux d'aneuploïdie seraient connus à l'avance. Si, dans l'expérience actuelle, nous avons déterminé le taux initial de l'aneuploïdie chez les plus petits animaux, ou si nous avons pu étudier un troisième point temporel (ce qui était malheureusement impossible à cause de la mortalité survenue en particulier sur les plus petits animaux) et qu'une diminution du taux d'aneuploïdie ait été détectée après deux mois, on aurait peut-être pu postuler que les animaux morts étaient aussi les plus aneuploïdes.

Il n'en reste pas moins que la co-occurrence d'une aneuploïdie et une mortalité des animaux de petite taille valide la pratique du tri selon taille dans les lots d'huîtres commerciales, telle que celle pratiquée en particulier dans les écloseries professionnelles.

Pour conclure, il s'avère que dans la tranche d'âge étudiée (naissain de 5 à 7 mois), le taux d'aneuploïdie est apparu stable. Deux hypothèses sont alors possibles : (1) soit nous n'avons pas étudié la bonne fenêtre temporelle, (2) soit le phénomène est réellement stable. Dans le premier cas, des mises au point méthodologiques sont encore nécessaires pour travailler sur des stades précoces et nous permettre également d'aborder la question « quelle est l'origine temporelle de l'aneuploïdie au niveau d'une génération ? ». Si le phénomène est stable au niveau d'une génération, il sera alors très intéressant d'aller étudier les différences au niveau individuel, sachant par ailleurs qu'une base génétique a été mise en évidence (Leitão *et al.*, 2001b), et qu'il pourrait alors être envisageable de sélectionner contre l'aneuploïdie.

## 4. Influence de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie

### 4.1. Matériel et Méthodes

#### 4.1.1. Origine des huîtres étudiées

Des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, âgées d'environ 3 ans et demi, provenant de Bretagne et étant en claire sur le bassin de Marennes-Oléron, ont été placées dans le conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade. Du naissain, provenant du même croisement qui a servi pour l'expérience "suivi dans le temps", a été mis dans les mêmes conditions que les huîtres adultes.

#### 4.1.2. Protocole expérimental

Ces deux populations d'huîtres, *Crassostrea gigas*, ont été soumises en milieu contrôlé à différentes concentrations d'atrazine. Deux concentrations d'atrazine ont été testées: 0,01 mg/l (valeur pic trouvée dans le milieu naturel) et 0,1 mg/l. Six lots (trois lots différents et leurs répliqués) ont été établis: deux lots témoins (1A et 1B), deux lots avec 0,01 mg d'atrazine/l (2A et 2B) et deux lots avec 0,1 mg d'atrazine/l (3A et 3B). Chaque lot contenait 75 huîtres et du naissain. Les lots d'huîtres ont eu une période d'acclimatation de 6 jours en circuit ouvert. Ensuite, ils ont été soumis à une exposition d'atrazine pendant 51 jours en circuit fermé. Chaque jour, le nombre de mortes par lot était noté ainsi que la température.

L'atrazine a été fournie par l'INRA de St-Laurent-de-la-Prée avec une concentration de 500 g/l. Le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas, au laboratoire de l'U. R. Qualité des eaux, a réalisé régulièrement des analyses d'atrazine et de ses produits de dégradation à partir de prélèvements d'eau de chaque lot tout au long de l'expérience (Annexe 6.3). Pour chaque bac, un litre d'eau a été prélevé (à diverses périodes) et homogénéisé, le pH et la conductivité ont été mesurés. L'eau a ensuite été filtrée puis le pH ajusté à 7 sur une aliquote de 200 ml. Celle-ci a été extraite sur cartouches en silice greffée C18, puis la cartouche a été séchée sous courant d'azote, et éluée avec 3 ml d'acétonitrile. L'éluat a été évaporé à sec sous azote et le résidu a ensuite été repris avec un mélange acétonitrile/eau (20/80), puis injecté pour analyse sur HPLC muni d'un détecteur UV à barrettes de diodes. La détection des composés a été effectuée à 220 nm.

Chaque bac contenait 157 litres d'eau de mer. Cette eau, ainsi que l'atrazine étaient renouvelées chaque jour. Les bacs ainsi que les filtres biologiques étaient vidés puis remplis en eau chaude ( $19,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). 157ml d'atrazine à 10 mg/l et à 100 mg/l dilués dans 5 litres d'eau de mer étaient rajoutés dans les lots 2A, 2B et 3A, 3B respectivement. Les huîtres ont été nourries quotidiennement avec pour chaque lot: 8 litres d'*Isochrysis galbana* à  $6.10^6$  cellules/ml et 3,5 litres de *Tetraselmis suecica* à  $1,5.10^6$  cellules/ml.

#### 4.1.3. Fécondations

Pour chacun des 6 lots, des fécondations ont été réalisées à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Les gamètes de chaque animal mûre ont été observés au microscope afin de choisir 6 mâles et 6 femelles ayant la meilleure activité reproductrice. Les gonades de chaque individu ont été scarifiées afin de récupérer les gamètes dans des béchers. Les gamètes ont ensuite été filtrés. Les gamètes mâles ont été dilués avec de l'éosine puis placés sur une

cellule de Thoma avant d'être dénombrés. Les gamètes femelles ont également été dénombrés après avoir été disposés sur des cellules de Mallasez. Les fécondations ont eu lieu dans des béciers en verre d'un litre contenant, pour chaque lot, de l'eau de mer filtrée, 3 millions d'ovocytes et 600 millions de spermatozoïdes. Des réplicats de chaque lot ont été réalisés. Le développement s'est poursuivi dans des jarres de 30 l en salle d'élevage larvaire. Les croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été identifiés lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 respectivement et leurs réplicats: lots 7, 8, 9, 10, 11 et 12 respectivement.

#### **4.1.4. Elevage larvaire**

Trois fois par semaine, les larves ont été filtrées sur des tamis variant en fonction de leur taille, leur densité a été évaluée par comptage au microscope optique et leur croissance a été étudiée en mesurant la taille de 50 larves par lot en moyenne à partir d'un programme d'analyse d'images. Chaque jour, chaque lot a été nourri avec un mélange de trois phytoflagellés *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* et *Tetraselmis suecica* et une diatomée *Chaetoceros calcitrans* avec des concentrations de 25, 10, 2 et 25 cellules/ $\mu$ l respectivement. Le mélange de ces 4 espèces favorise la croissance et augmente le taux de survie. Au bout de 22 ou 24 jours, les larves retenues sur un tamis de 220  $\mu$ m ont été placées en micronurserie afin de permettre leur fixation. Les larves ont été disposées sur des tamis de 150  $\mu$ m avec du sable (les grains de sable ont à peu près la taille des larves permettant ainsi la fixation d'une seule larve par grain de sable).

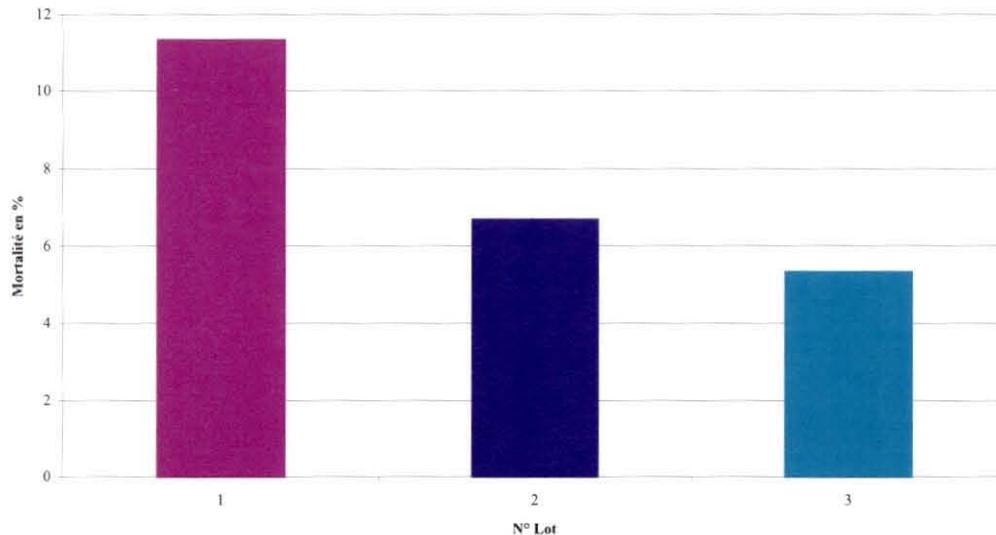
#### **4.1.5. Etude de l'aneuploïdie**

Les préparations chromosomiques ont été effectuées selon la même méthode que pour les expériences précédentes (Annexe 6.1).

### **4.2. Résultats**

#### **4.2.1. Action de l'atrazine sur les mortalités des huîtres *Crassostrea gigas* adultes**

Les mortalités ont été peu importantes tout au long de l'expérience. Elles ont varié entre 5,33% et 11,33% selon les lots (lots 1, 2 et 3: 0; 0,01 et 0,1 mg/l d'atrazine respectivement) (Annexe 6.4, Figure 10). Un test G a permis de mettre en évidence que la différence entre lots n'était pas statistiquement significative. Le test de conformité (test du  $\chi^2$ ) nous a permis d'admettre que les lots étudiés ont été prélevés dans une même population homogène ne présentant pas de différence significative en ce qui concerne leurs taux respectifs de mortalité. Le test t de student pour une comparaison de pourcentage a montré que toutes les valeurs de t étaient inférieures à la valeur critique (valeur de t la plus élevée: 1,93).

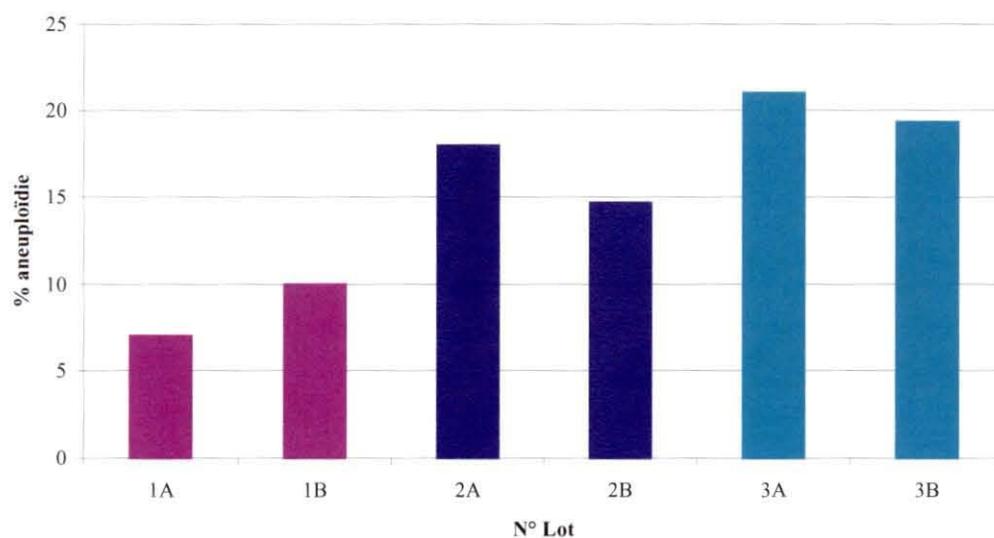


**Figure 10.** Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes en fonction du lot: lot 1 (0 mg/l), lot 2 (0,01 mg/l) et lot 3 (0,1 mg/l).

#### 4.2.2. Action de l'atrazine sur le matériel génétique des huîtres *Crassostrea gigas* adultes

Bien que l'huître *Crassostrea gigas* ait un nombre diploïde normal de 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967), des cellules hypodiploïdes de  $2n = 19$ , 18 ou 17 chromosomes ont été observées dans tous les lots étudiés (Annexe 6.5).

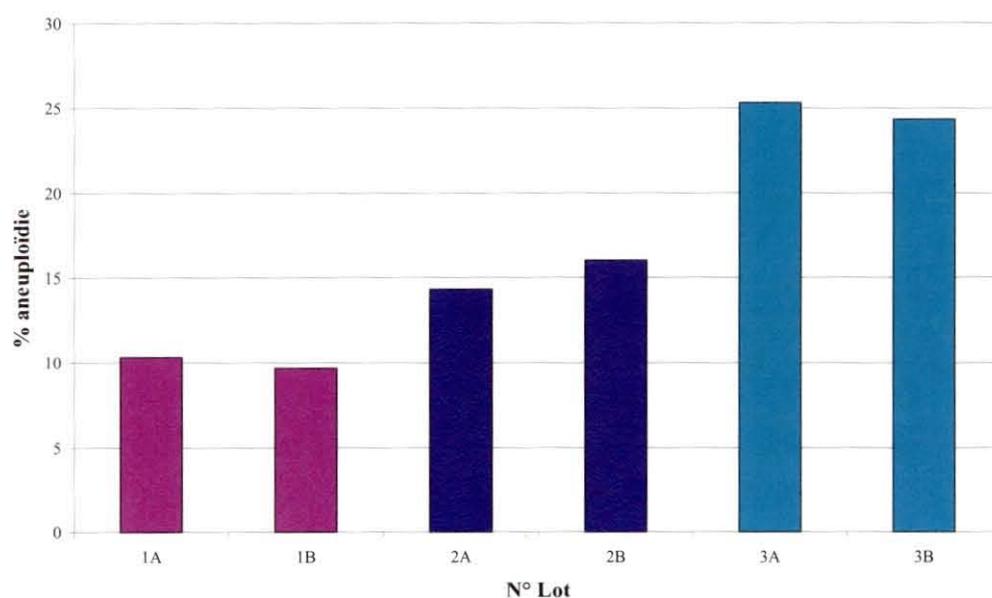
Les lots qui ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 (A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3 (A et B, 0,1 mg/l) ont varié de 7 à 10%, 14,67 à 18% et 19,33 à 21% respectivement (Figure 11). Des analyses statistiques ont révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F = 0,089$ ;  $P = 0,766$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F = 9,458$ ;  $P < 0,001$ ).



**Figure 11.** Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes 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).

#### 4.2.3. Action de l'atrazine sur le matériel génétique du naissain de *Crassostrea gigas*

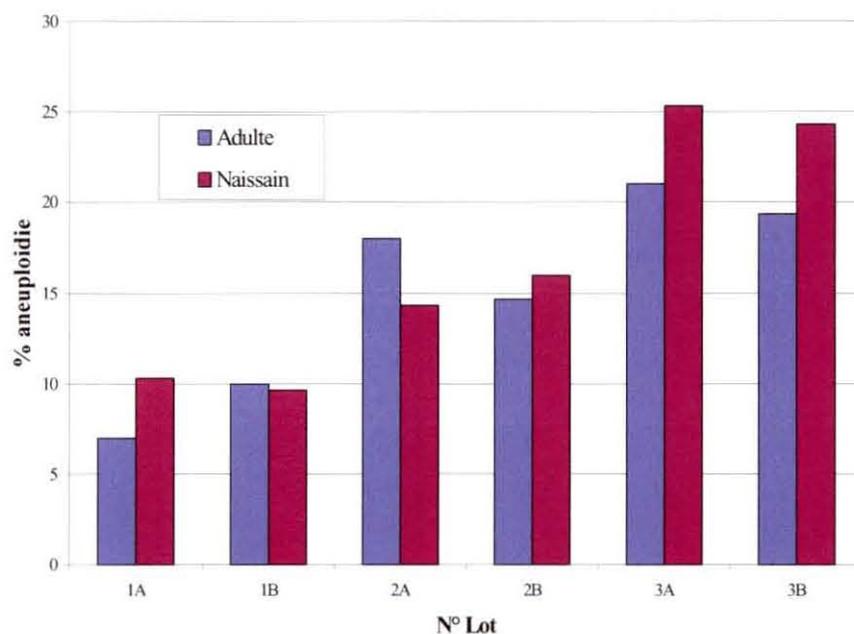
Comme précédemment, le pourcentage de cellules aneuploïdes observé chez du naissain de *Crassostrea gigas* a augmenté avec la concentration d'atrazine. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 (A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3 (A et B, 0,1 mg/l) ont varié de 9,67 à 10,33%, 14,33 à 16% et 24,33 à 25,33% respectivement (Annexe 6.6, Figure 12). Des analyses statistiques ont aussi révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F = 0,16$ ;  $P = 0,922$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F = 33,81$ ;  $P < 0,001$ ).



**Figure 12.** Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* au stade naissain 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).

#### 4.2.4. Comparaison des données obtenues chez *Crassostrea gigas* aux stades adulte et naissain

Une augmentation du taux d'aneuploïdie avec la concentration d'atrazine a été observée quelque soit le stade de développement de l'huître (Figure 13). Une analyse de variance a permis de tester ce troisième facteur et a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les adultes et le naissain ( $F = 0,95$ ;  $P = 0,331$ ).

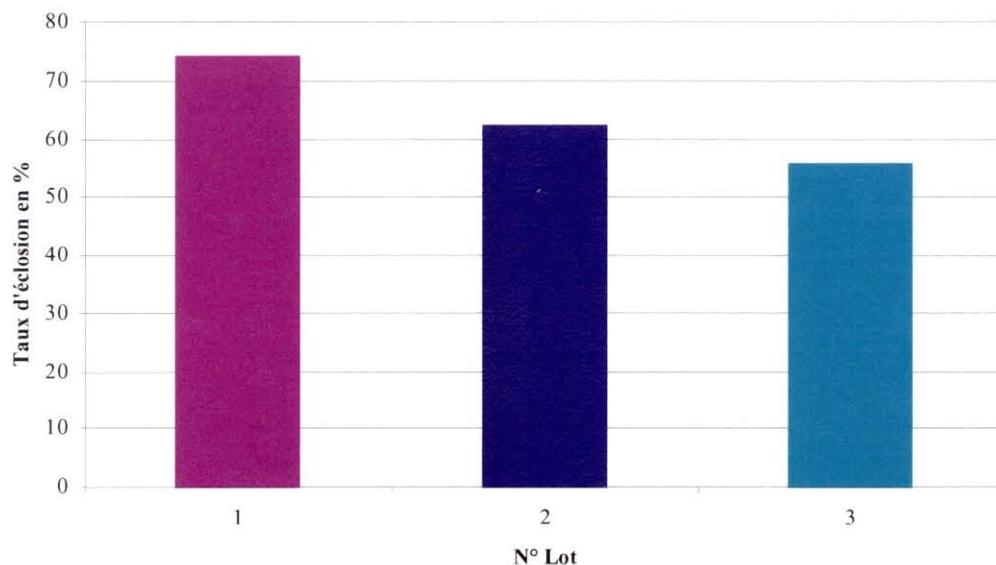


**Figure 13. Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* aux stades adulte et naissain en fonction du lot: lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l).**

#### **4.2.5. Action de l'atrazine sur la descendance d'une population d'huîtres *Crassostrea gigas***

##### 4.2.5.1. Action sur le taux d'éclosion

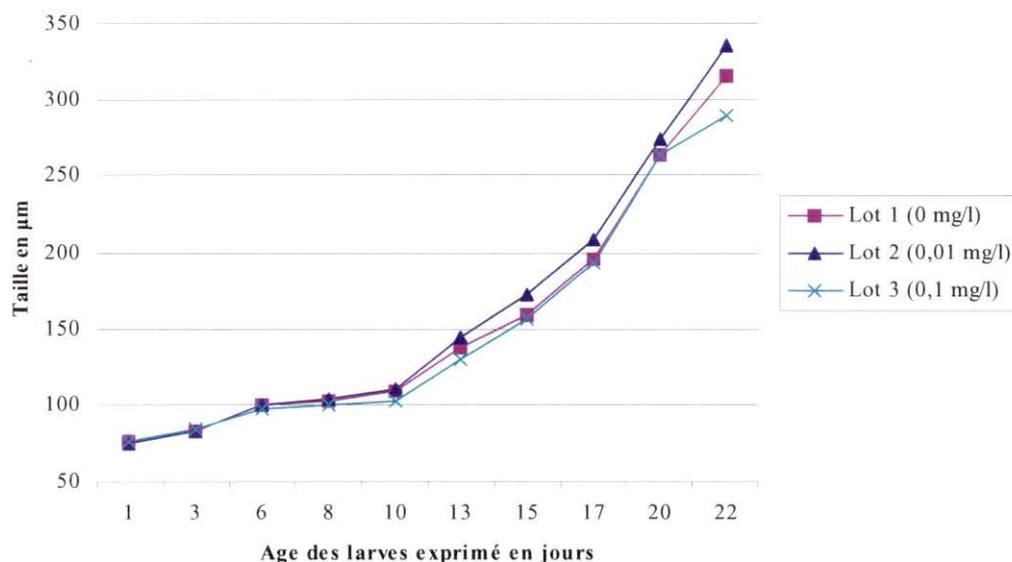
Les lots où les géniteurs ont été exposés à de l'atrazine ont montré un taux d'éclosion plus faible que les lots témoins. En effet, les taux d'éclosion dans les lots où les géniteurs ont été exposés à 0, 0,01 et 0,1 mg/l d'atrazine sont de 74,25%, 62,1% et 55,5% respectivement (Annexe 6.7, Figure 14). Un test G a permis de mettre en évidence qu'il existe une différence très significative entre les 3 lots. Les valeurs de t entre les trois lots ont été calculées et elles sont toutes beaucoup plus élevées que la valeur critique.



**Figure 14. Taux d'éclosion en pourcentage en fonction du lot: lot 1 (0 mg/l), lot 2 (0,01 mg/l) et lot 3 (0,1 mg/l).**

#### 4.2.5.2. Action sur la croissance larvaire

Un test F de Fisher-Snedecor a permis d'établir que les différentes séries de croissance sont corrélées et qu'elles obéissent donc à une même loi de croissance (Annexe 6.8, Figure 15). Le calcul des coefficients de corrélation (R) entre les différentes séries de mesures des croissances des 3 lots (0; 0,01 et 0,1 mg/l) a été effectué. La plus forte valeur de R était de 0,9925.



**Figure 15. Taille des larves en µm en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.**

## 5. Bibliographie

- Ahmed, M. & Sparks, A. K., (1967). A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). *J. Fish. Res. Bd. Canada* 24: 2155-2159.
- Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B. and Gérard, A. (1999). Relationship between pre- and post-settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 175:215-226.
- GENEPHYS (2001) Genetical bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas* Final report for the European Commission FAIR project 95.421 (1996-2000).
- Lapègue, S., Thiriot, C., McCombie, H., Heurtebise, S., Boudry, P., Robert, S., Soletchnik, P., Gouletquer, P. et Gérard, A. (1999). Etude du niveau d'aneuploïdie dans les populations des zones de captage du bassin de Marennes-Oléron. Rapport Contrat Région Poitou-Charentes 1999. Convention 99 RPC-A-201 "Génétique".
- Lapègue, S., McCombie, H., Leitão, A., Heurtebise, S., Boudry, P., Thiriot, C. et Gérard, A. (2000). Etudes des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Rapport Contrat Région Poitou Charentes 2000. Programme 3: Gestion durable des productions ostréicoles: les apports de la génétique.
- Leitão, A., Boudry, P. et Thiriot-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., Gerard, A. et Thiriot-Quiévreux, C. (2001b). Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic living resources*, 14:233-237.

## 6. Annexes

### 6.1. Protocoles

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**1- Solutions**

*A préparer avant la manip. (après-midi de la nuit où ça sera lancé)*

#### a) Les solutions suivantes:

- Solution hypotonique de citrate de sodium à 0,9% (pour utilisation le matin)
- Solution 'Mère' de colchicine 0,1% permettant de bloquer les mitoses en métaphase (sera diluée le soir avant de traiter les huîtres)

La quantité de solution nécessaire est dépendante du nombre d'animaux traités et des volumes des containers dans lesquels le traitement de la nuit aura lieu (colchicine) et dans lesquels les préparations seront fixées et stockées le matin (citrate).

**CITRATE** : Solution de citrate de sodium à 0,9%, donc:  
900 mg de citrate de sodium dans  
100 ml H<sub>2</sub>O **distillée (stockage au réfrigérateur)**

Le tissu est mis dans le citrate une seule fois (directement après la dissection), donc la quantité nécessaire est égale au volume des tubes dans lesquels on mettra le tissu.

*e.g. Les bocal ont la capacité de 150ml et il y en a 4 :*  
 $150\text{ml} \times 4 = 600\text{ml}$

*Si on a 900 mg de citrate de sodium dans 100 ml H<sub>2</sub>O distillée*  
*On a besoin de 6 x 900 mg*  
 $= 5400 \text{ mg sodium citrate pour } 600 \text{ ml H}_2\text{O distillée}$

**COLCHICINE 'MÈRE'** : Solution 'Mère' de colchicine à 0,1%, donc:  
100 mg colchicine  
100 ml H<sub>2</sub>O **de mer filtrée (stockage au réfrigérateur)**

La quantité de solution 'Mère' nécessaire dépend du volume de solution 'fille' de colchicine, à 0,005%, nécessaire pour le traitement de nuit, qui est égal au volume dans lequel les huîtres vont être traitées.

100 ml solution 'fille'  
= 5 ml solution 'mère'  
+ 95 ml H<sub>2</sub>O **de mer avec Isochrisis**

*i.e. 5 ml de solution Mère est nécessaire pour chaque 100ml de solution fille*

*e.g. Si on utilise approx. 50 ml par petit animal (<2 g) et que l'on a 60 animaux, on a besoin d' au moins 3 litres de solution 'fille'.  
Si on fait 4 litres de solution 'fille'*

$$4000 \text{ ml} / 100 = 40$$

$$40 \times 5 \text{ ml} = 200 \text{ ml}$$

Donc 200 ml de solution 'mère' est requis. Et si on a 100 mg de colchicine dans 100 ml de H<sub>2</sub>O de mer, dans 200 ml on va avoir besoin de 200 mg.

**ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, A PESER AVEC GANTS ET MASQUE.**

**b) Numéroté les bocaux qui seront utilisés.**

**A préparer le matin juste avant le fixation**

**SOLUTION FIXATRICE :** Le fixateur est composé d'un mélange (3/1) éthanol absolu/ acide acétique glacial. Il est utilisé après le citrate et changé 4 fois avant que les échantillons soient stockés dans le réfrigérateur. La quantité nécessaire est donc 5 fois le volume des tubes dans lesquels seront fixés les animaux.

Dans l'exemple ci-dessus, 150 ml tubes x 4 = 600 ml

$$600 \text{ ml} \times 5 = 3000 \text{ ml}$$

$$3000/4=750$$

Donc 2250 ml éthanol absolu

Et 750 ml acide acétique glacial

sont nécessaires au maximum (les bocaux ne sont jamais remplis jusqu'au bout).

Préparer au fur et à mesure cette solution: 300 ml alcool absolu + 100 ml acide acétique glacial.

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**2- Manip de nuit (automatisée).**

**A préparer l'après-midi ou le soir.**

- Pompe péristaltique
- Timer automatique
- Tube pour pompe et sa pince à linge
- Bulleur
- Animaux dans leurs poches
- Récipient de traitement avec : eau de mer avec *Isochrisis* 2 :1
- Bouteille avec solution de Colchicine 'mère' (voir fiche 1 – solutions)

Tout d'abord il faut préparer le récipient avec les huîtres et également la pompe, les tubes, les solutions et le timer. La solution de colchicine 'fille' est produite automatiquement lorsque la pompe se met en marche durant la nuit et que la solution colchicine mère est introduite dans le récipient contenant les huîtres dans de l'eau de mer avec l'algue *Isochrisis*. L'eau de mer avec *Isochrisis* est composée du mélange (2/1) Eau de mer filtrée/ *Isochrisis* pris dans la salle des algues (à choisir dans un 300 litres à couleur brune moyenne).

*Dans l'exemple ci-dessus, 4000 ml de solution 'fille' est requis  
Dont 200 ml de solution mère de colchicine (5%)  
Et du mélange (2/1) de 2550 ml d'eau de mer filtrée/1250 ml Isochrisis,*

Ce mélange est mis dans le récipient (un grand aquarium rond pour les volumes de 3 à 6 litres) et les animaux sont placés à l'intérieur dans des filets plastiques pour séparer les lots et permettre aux animaux de filtrer le milieu. Le bulleur est introduit pour oxygéner l'eau. La pompe est alors branchée dans le timer et celui-ci est réglé pour minuit ou 01h00 du matin. Le tube de la pompe est positionné entre la bouteille de colchicine mère et l'aquarium (en maintenant les extrémités avec une pince à linge si nécessaire).

**Pour le matin (à préparer le soir précédent):**

- Solution de citrate,
- Ethanol absolu et Acide Acétique Glacial et bouteille pour le fixateur,
- Tubes eppendorfs pour mettre les échantillons,
- Microscope pour la dissection (loupe binoculaire),
- Chaise à la bonne hauteur pour la dissection,
- Outils de dissection (ciseaux, forceps, scalpel/couteau pour ouvrir les huîtres),
- Boîte de Pétri
- Pissette d'eau de mer,
- Bol pour servir de poubelle,
- Pipette/s pasteur,
- Sopalin,
- Minuteurs,
- Papier brouillon et crayon papier,
- Gants,
- Blouse de laboratoire.

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**3- Dissection et fixation le matin**

Les démarches décrites ci-dessous sont à faire suite à la manip détaillée en fiche 2: Manip de nuit. Elles sont à faire le matin suivant le traitement des huîtres à la colchicine. Pour une visualisation du nombre de chromosomes, la manip est arrêtée entre 8 à 10 heures plus tard pour du comptage (6 heures pour du banding).

La fixation concerne les solutions suivantes:

- Citrate (déjà préparé et stocké au réfrigérateur, voir fiche 1)
- Fixateur: solution (3/1) d'éthanol absolu/acide acétique glacial (à préparer le matin, voir fiche 1)

### Dissection

Les branchies des huîtres sont découpées dans de l'eau de mer propre et mises dans les bocaux (si manipulés en groupe) ou eppendorfs (si manipulés individuellement) ou récipient de taille adéquate avec le citrate (volume 20 x supérieur à celui du tissu étudié) pendant 40 minutes. Puis le citrate est enlevé par aspiration avec une pipette pasteur et remplacé par du fixateur. Pour découper les branchies, l'huître est ouverte avec un scalpel et regardée avec le microscope de dissection. Le manteau et les branchies sont découpés ensemble en prenant soin de ne pas abîmer la glande digestive ni la gonade si il y en a. Les branchies (et peut-être le manteau avec!) sont enlevées ensemble puis le manteau (plus épais avec les poils) est découpé afin de garder seulement les lamelles des branchies qui sont entre les deux couches de manteau. Avant de mettre le tissu dans le citrate, 2 (ou plus selon la taille des branchies) petites coupures sont faites du haut vers le bas des branchies pour faciliter la pénétration du citrate. Ces coupures ne sont pas faites sur la totalité mais seulement deux tiers de la largeur des branchies. Ceci permet d'éviter que les branchies ne se séparent en morceaux. Elles restent attachées les unes avec les autres à la base.

### Fixation

Les branchies restent dans leur tube d'origine et différents bains (un de citrate et cinq de fixateur (F)) sont appliqués:

Citrate pendant	40 min
F1	10 min
F1'	10 min
F2	20 min
F3	20 min
F4 final (dans lequel l'échantillon va être stocké au réfrigérateur)	

D'un point de vue pratique, il est généralement plus facile de faire la fixation des échantillons par groupes de 10 ou 15. Un minuteur est mis en marche lorsque la dissection ou le changement de fixateur est terminé pour chaque lot. L'heure de chaque changement est notée pour chaque lot afin de respecter au mieux les durées des bains précisées ci-dessus.

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des lames microscopiques.**  
**1- Fixation des chromosomes**

Les lames peuvent être préparées à partir de 24 heures après la fin de fixation (Penser à préparer des lames propres à l'avance (voir plus bas)!!!).

**Matériel**

Le matériel suivant est nécessaire:

Microscope de dissection binoculaire  
Une table chauffante pour lames (mis à 44°C)  
Lames 'porte objets' (lavées à l'acide chlorhydrique, voir ci-dessous)  
Lame avec dépression circulaire (ou petit verre de cristallisation)  
Pincettes fines  
Ciseaux fins  
2 Pipettes pasteur et poires (et un stock de pipettes pour renouveler après chaque animal)  
Eprouvettes non graduées pour les solutions d'eau acidifiée  
Boîte pétri  
Bol poubelle

Les solutions suivantes sont également nécessaires :

1/1 Acide Acétique/ Eau distillée  
Fixateur 3/1 Ethanol Absolu/ Acide Acétique Glacial (frais)

**Méthodologie**

Une lame 'porte objets' est mise sur la table chauffante à 44°C sur laquelle le numéro de l'animal (numéro de lame, date etc.) est inscrit. Pour voir le numéro clairement lorsque la lame est sur le microscope pendant le comptage, orienter la partie où l'on écrit à droite.

Les bocal ou tubes eppendorf contenant les branchies sont retirés du réfrigérateur. Une branchie est mise sur la boîte de pétri avec son fixateur et un petit morceau est découpé. Ce morceau mesure 2-3mm de longueur. Les extrémités des branchies sont plus riches en mitoses (lieux d'attache des 4 lamelles). Aussi, est-il préférable de prélever à cet endroit, en prenant soin d'inclure les différentes lamelles.

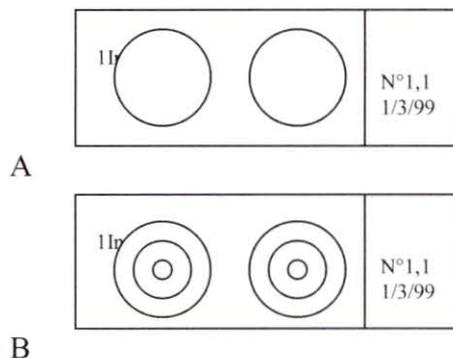
Remettre le reste des branchies dans un tube indiquant l'identité de l'animal, remplir avec du fixateur frais et remettre le tube au réfrigérateur.

Le morceau découpé est séché sur du papier absorbant et mis sur la lame avec la dépression avec le mélange 1/1 Acide/Eau de façon à remplir cette dépression (Utilisation de la pipette Pasteur n°1). La lame est posée sous le microscope de dissection. Après quelques minutes il apparaît de petites bulles autour du morceau. Le morceau peut être agité dans la solution avec la pince pour libérer ces bulles. Enfin le morceau, qui est devenu transparent, est enlevé et

jeté. Le liquide restant contient les noyaux. Le liquide est aspiré avec une pipette pasteur (Pipette Pasteur n°2) et laissé tomber sur la lame de la manière suivante:

Le liquide est donc aspiré, en évitant d'aspirer les éventuels déchets de tissu qui sont déchirés du morceau original. Essayer de récupérer toutes les bulles.

Pour déposer le liquide sur la lame, on doit le laisser tomber d'une hauteur de 60cm. D'abord, toucher la lame avec le bout de la pipette pour viser. Puis lever la pipette et laisser tomber le liquide en gouttes sur la lame. L'objectif est de casser la membrane nucléaire. Pour bien distribuer le matériel sur la lame, faire deux gouttes rondes côte à côté (voir figure A).



Le liquide est ensuite réaspiré très doucement avec la même pipette (N°2). La pipette placée bien verticalement permet d'aspirer petit à petit le liquide au centre de chaque goutte (aller de l'une à l'autre rapidement) afin de tracer des cercles concentriques (Figure B). Le matériel nucléaire se dépose sur la lame et sèche en même temps que le liquide est aspiré ou s'évapore naturellement avec la chaleur de la table chauffante (lorsque les gouttes rétrécissent d'elles-mêmes, les laisser faire: utiliser l'aspiration comme une aide!). Ainsi, le matériel est mieux distribué facilitant la lecture ultérieure. Une fois le liquide évaporé, on enlève la lame de la plaque chauffante et on la place sur un portoir de lames à l'abri des éclaboussures.

La pipette N°2 est remplacée entre les échantillons. La table chauffante est nettoyée. La lame avec la cavité est nettoyée avec de l'eau acidifiée sans l'essuyer pour ne pas introduire de peluches. De façon générale, travailler en blouse et gants pour éviter de salir les lames.

### ***Nettoyage à l'acide chlorhydrique des lames avant utilisation pour l'étude de l'aneuploïdie***

*Les lames sont trempées du soir au matin dans un mélange (9/1) d'alcool 90/95% / acide chlorhydrique (HCl). Pour mélanger les deux solutions, ajouter doucement l'acide à l'alcool. La solution va fumer donc faire cette étape sous la hotte. Utiliser comme stockage une boîte plastique qui ferme.*

*Retirer les lames du bain d'acide (le bain peut être gardé et réutilisé). Les mettre dans un porte-lames et les rincer sous le robinet légèrement ouvert pendant 24 heures. (En cas d'urgence 16-18h suffisent)*

*Les lames sont ensuite stockées dans un bain d'alcool à 90% jusqu'à leur utilisation.*

## **Aneuploïdie:** **Préparation des lames microscopiques.** **2- Coloration des lames**

### **Matériel**

Le matériel suivant est nécessaire:

- pHmètre (la première fois et lorsque l'on a besoin de mélanger du tampon)
- Bain à lames = "baignoire" Le bain 100ml prend jusqu'à 18 lames.
- Epruvettes graduées (en verre si possible, sinon l'éprouvette 'aneuploïdie' est reconnaissable par sa couleur mauve).
- Pipette (pour le bain de coloration), filtres et cônes
- Parafilm et ciseaux
- Bouteille en verre pour faire le mélange (si le cylindre n'est pas en verre)
- Minuteur
- Portoir des lames

Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

- Colorant de Giemsa
- Tampon phosphate à pH 6.8: Préparé avec  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- Eau distillée

### **Méthodologie 1: Préparation du tampon phosphate.**

Le tampon est composé de deux solutions stock qui sont mélangées afin de produire une solution à pH 6.8.

Solution A: 7.8g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissous dans 250ml d'eau distillée

Solution B: 17.9g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dissous dans 250ml d'eau distillée

Le mélange est fait à partir de 51ml de A et 25ml environ de solution B et le pH est mesuré avec le pHmètre. De la solution B (prévoir 25 autres ml) est ajoutée progressivement jusqu'à ce que le pH voulu (6.8) soit atteint. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour donner 200ml au total.

Le tampon est stocké au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. Il faut le laisser se réchauffer à température ambiante avant chaque utilisation afin d'attendre le bon pH.

Les solutions de base sont stockées.

### **Méthodologie 2: Coloration des lames.**

**ATTENTION : GIEMSA EST UN PRODUIT TOXIQUE, PORTER DES GANTS !**

Après avoir fixé les chromosomes, les lames sont mises dans le bain à lames. Pour un bain de 100ml, le bain est composé de :

4ml Giemsa,  
4ml Tampon Phosphate pH 6.8,  
92ml Eau distillée.

Les trois liquides sont mis dans une éprouvette, qui est fermée par du parafilm et agitée pour mélanger le contenu jusqu'à ce qu'il soit bien homogène.

Le mélange est ensuite versé directement sur les lames placées dans leur "baignoire" et le minuteur lancé pour 9 ou 10 minutes. Les lames ont été positionnées dos à dos. Bouger les lames doucement avec un doigt (en portant des gants) pour vérifier que leurs surfaces sont en contact avec la solution.

Lorsque la coloration est finie, jeter la solution dans l'évier et rincer les lames dans leur baignoire 3 fois avec de l'eau du robinet et 1 fois enfin avec de l'eau distillée. Les lames peuvent être séchées à la verticale sur un portoir de lames avec le bout étiqueté dépoli en bas.

## 6.2. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

<b>Cohorte de Captage 2000 N°1. Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille</b>							
N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	30				0	1	0,00
2	28	1	1		2	1	6,67
3	25	4		1	5	1	16,67
4	26	1	3		4	2	13,33
5	28	1	1		2	1	6,67
6	27	2	1		3	1	10,00
7	29		1		1	1	3,33
8	27	1	2		3	1	10,00
9	25	4	1		5	1	16,67
10	27	2	1		3	1	10,00
11	27	2	1		3	1	10,00
12	25	4	1		5	1	16,67
13	29	1			1	2	3,33
14	26	2	1	1	4	1	13,33
15	28		2		2	1	6,67
16	25	3	2		5	1	16,67
17	23	4	2	1	7	2	23,33
18	27	2	1		3	1	10,00
19	26	5	1		6	1	20,00
20	28	1	1		2	1	6,67
21	25	5			5	1	16,67
22	22	6	2		8	1	26,67
23	26	1	3		4	1	13,33
24	28	2			2	1	6,67
25	23	6		1	7	1	23,33
27	26	2	2		4	1	13,33
28	26	2	2		4	1	13,33
29	26	2	2		4	1	13,33
30	28	2			2	1	6,67
31	27	2	1		3	3	10,00
						<b>%aneuploïdie total :</b>	<b>12,11</b>

**Cohorte de Captage 2000 N°1. Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille**

N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	27		3		3	1	10,00
2	27	3			3	1	10,00
3	30				0	1	0,00
4	28	2			2	1	6,67
5	29	1			1	1	3,33
6	28	2			2	1	6,67
7	24	6			6	1	20,00
8	28	1	1		2	1	6,67
9	28	2			2	1	6,67
10	27		2	1	3	1	10,00
11	20	5	2	3	10	1	33,33
12	29	1			1	2	3,33
13	26	4			4	1	13,33
14	29	1			1	1	3,33
16	26	4			4	1	13,33
17	25	1	4		5	1	16,67
18	30				0	1	0,00
19	24	1	3	2	6	1	20,00
20	21	4	5		9	1	30,00
21	28	2			2	1	6,67
22	25	2	3		5	1	16,67
23	28		2		2	1	6,67
24	28		2	2	4	1	13,33
25	29	1			1	1	3,33
26	29	1			1	1	3,33
27	29	1			1	1	3,33
28	28	1	1		2	1	6,67
29	25	2	3		5	1	16,67
30	27	3			3	2	10,00
32	30				0	3	0,00
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>10,00</b>

**Suivi temporel Point 1 : juillet 2001. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille**

N° animal	Nombre de mitoses (N=29)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	29		1		1	1	3,33
2	30				0	1	0,00
3	26	0	3	1	4	2	13,33
4	27	2		1	3	1	10,00
5	27	1		2	3	1	10,00
6	27	2		1	3	1	10,00
7	26	1	1	2	4	1	13,33
8	29		1		1	1	3,33
9	29	1			1	1	3,33
10	28	2			2	1	6,67
11	27	1	2		3	1	10,00
12	25	2	3		5	2	16,67
13	30				0	1	0,00
14	29			1	1	1	3,33
15	28	2			2	2	6,67
16	30				0	1	0,00
17	24	3	2	1	6	1	20,00
18	29	1			1	1	3,33
19	27	2	1		3	2	10,00
20	29	1			1	1	3,33
21	29	1			1	1	3,33
22	25	4	1		5	1	16,67
23	26	2	1	1	4	1	13,33
24	26	2	1	1	4	1	13,33
26	27	3			3	1	10,00
27	29		1		1	1	3,33
28	24	4	1	1	6	1	20,00
29	26	3		1	4	1	13,33
30	30				0	1	0,00
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>8,27</b>

<b>Suivi temporel Point 1 : juillet 2001. Echantillonnage de 30 animaux de moyenne taille</b>							
N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	28	1	1		2	1	6,67
2	28	2			2	1	6,67
3	28	2			2	1	6,67
4	24	3	2	1	6	1	20,00
5	24	3	2	1	6	1	20,00
6	26	3	1		4	1	13,33
7	23	5	1	1	7	2	23,33
8	28	2			2	1	6,67
9	29	1			1	1	3,33
10	27	2	1		3	1	10,00
11	28	1	1		2	1	6,67
12	28	2			2	1	6,67
13	26	3	1		4	1	13,33
14	29		1		1	1	3,33
15	28	1	1		2	1	6,67
16	25	3	1	1	5	2	16,67
17	28	1	1		2	1	6,67
18	19	1			1	1	3,33
19	26	2	2		4	1	13,33
20	26	3	1		4	1	13,33
21	28	2			2	1	6,67
22	25	4		1	5	1	16,67
23	26	4			4	1	13,33
24	25	4	1		5	2	16,67
25	28	1	1		2	1	6,67
26	25	4	1		5	1	16,67
27	24	3	2	1	6	1	20,00
28	23	5	2		7	2	23,33
29	29		1		1	1	3,33
30	30				0	1	0,00
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>11</b>

**Suivi temporel Point 2:septembre 2001. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille**

N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	26	3		1	4	1	13,33
2	30				0	1	0,00
3	26	2	1	1	4	1	13,33
4	29		1		1	1	3,33
5	28	2			2	1	6,67
7	30				0	1	0,00
8	28			2	2	1	6,67
9	26	3	1		4	1	13,33
10	25	4		1	5	1	16,67
11	25	3	1	1	5	1	16,67
12	29	1			1	1	3,33
13	27	2	1		3	1	10,00
14	26	1	3		4	1	13,33
15	28	1	1		2	1	6,67
16	30				0	1	0,00
17	29		1		1	1	3,33
18	28	2			2	1	6,67
19	28	2			2	1	6,67
20	27	3			3	1	10,00
21	27	3			3	1	10,00
22	27	2	1		3	1	10,00
23	27	2		1	3	1	10,00
24	26	3		1	4	1	13,33
25	28	2			2	1	6,67
26	29	1			1	1	3,33
27	27		1	2	3	1	10,00
28	28	1		1	2	1	6,67
29	26	3	1		4	1	13,33
30	27	2	1		3	1	10,00
31	26	2	1	1	4	1	13,33
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>8,53</b>

**Suivi temporel Point 2:septembre 2001. Echantillonnage de 30 animaux de moyenne taille**

N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	29	1			1	1	3,33
2	27		2	1	3	1	10,00
3	27	2	1		3	1	10,00
4	26	3	1		4	1	13,33
5	30				0	1	0,00
6	27	2	1		3	1	10,00
7	26	2	2		4	1	13,33
8	26	2	2		4	1	13,33
9	28		2		2	1	6,67
10	24	4	1	1	6	1	20,00
11	28	1	1		2	1	6,67
12	26	1	3		4	1	13,33
13	13	1	1		2	1	6,67
14	26	2	2		4	1	13,33
15	28	2			2	1	6,67
16	27	3			3	1	10,00
17	24	3	3		6	1	20,00
18	27	2	1		3	1	10,00
19	30				0	1	0,00
20	22	6	1	1	8	1	26,67
21	30				0	1	0,00
22	26	3	1		4	1	13,33
23	27	3			3	1	10,00
24	21	6	3		9	1	30,00
25	26	2	2		4	1	13,33
26	30				0	1	0,00
27	28	1	1		2	1	6,67
28	24	5		1	6	1	20,00
29	26	4			4	1	13,33
31	27	3			3	1	10,00
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>11</b>

**Suivi temporel Point 2:septembre 2001. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille**

N° animal	Nombre de mitoses (N=30)					Nb de lames	%aneuploidie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	27	3			3	1	10,00
2	27	1	1	1	3	1	10,00
3	28	2			2	1	6,67
3	28	1	1		2	1	6,67
4	25	4		1	5	1	16,67
5	28		1	1	2	1	6,67
6	22	3	4	1	8	2	26,67
7	29			1	1	1	3,33
8	25	2	3		5	1	16,67
9	27	2		1	3	1	10,00
10	23	6		1	7	1	23,33
11	28	2			2	1	6,67
12	30				0	1	0,00
13	26	2	2		4	1	13,33
14	27	2	1		3	1	10,00
15	29		1		1	1	3,33
16	28	1	1		2	1	6,67
17	27	2		1	3	1	10,00
18	25	1	2	2	5	1	16,67
19	28	2			2	1	6,67
22	20	7	1	2	10	1	33,33
23	25	4	1		5	1	16,67
24	27	2	1		3	1	10,00
25	27	1	1	1	3	1	10,00
26	27	2	1		3	1	10,00
27	26	3	1		4	1	13,33
28	26	2	2		4	1	13,33
29	28	2			2	1	6,67
30	26	3	1		4	1	13,33
31	26	3		1	4	1	13,33
						<b>%aneuploidie total :</b>	<b>11,67</b>

### 6.3. Résultats des analyses effectuées par le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas.

Concentrations des triazines exprimées en µg/l. "-": composé non détecté. e: entrée. s: sortie. Des prélèvements en entrée (donc juste après avoir versé l'atrazine) ont été effectués au départ afin de vérifier les concentrations d'atrazine versées dans le milieu. Les prélèvements suivants (à partir du 05/03/01) ont tous été effectués en sortie (un jour après l'entrée d'atrazine).

Date prelev.	Bac n°	Atrazine	DIA	DEA	Simazine
28/02/01	3e	98,03	0,02	0,03	0,62
02/03/01	1s	0,05	0,06	-	-
	2e	10,98	-	-	0,07
	3s	79,47	0,03	0,09	0,51
	3e	105,47	0,03	0,05	0,65
05/03/01	1	0,03	-	-	-
	2	11,77	0,02	-	0,08
	3	89,04	0,04	0,14	0,55
28/03/01	1	0,03	-	0,01	-
	2	8,70	-	-	-
	3	88,13	-	-	-
30/03/01	1	0,13	0,02	-	-
	2	6,08	-	-	-
	3	70,70	-	-	0,92
06/04/01	1	-	-	-	-
	2	9,94	-	0,02	-
	3	4,31	-	-	-
09/04/01	1	9,57	-	-	-
	2	8,39	-	-	-
	3	81,23	0,04	0,07	0,42
11/04/01	1	-	-	-	-
	2	8,11	-	0,04	0,08
	3	63,78	-	0,06	0,21
13/04/01	1	0,78	-	-	0,01
	2	8,87	0,03	0,03	-
	3	70,83	0,01	0,05	0,48
18/04/01	1	0,95	-	-	0,02
	2	9,35	-	0,04	0,08
	3	73,84	-	0,08	0,46
20/04/01	1	0,04	-	0,03	-
	2	7,54	-	0,04	-
	3	73,06	-	0,07	0,29
23/04/01	1	0,79	-	-	-
	2	8,28	-	0,03	-
	3	62,11	-	0,08	0,25
25/04/01	1	-	-	-	-
	2	7,25	-	-	0,07
	3	70,65	-	0,07	0,27
27/04/01	1	1,15	-	-	-
	2	8,13	-	-	-
	3	61,04	0,06	0,08	0,22
29/04/01	1	0,71	-	-	0,03
	2	8,74	-	0,04	-
	3	86,99	0,09	0,10	0,33
02/05/01	1	1,23	-	-	-
	2	9,69	-	-	-
	3	57,03	0,06	0,07	0,16
04/05/01	1	0,06	-	-	0,03
	2	9,53	-	0,02	0,05
	3	69,54	0,07	0,08	0,21
11/05/01	1	0,07	-	-	-
	2	10,09	-	0,03	-
	3	70,07	0,04	0,07	0,37
14/05/01	1	0,93	-	0,01	0,04
	2	8,73	-	0,03	-
	3	85,15	-	0,14	0,31

**6.4. Température des bacs et mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes au cours de l'expérience.**

Jours	Date	Lot 1A		Lot 1B		Lot 2A		Lot 2B		Lot 3A		Lot 3B		Mort/Jour
		T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	
	20/03/01	14,5		15,2		14		14,7		14,5		14		
	21/03/01	14,8	0	15,5	0	14	0	15	0	14,8	1	14,2	0	1
	22/03/01	14	0	15	0	13,5	1	14,3	0	14	0	13,5	0	1
	23/03/01	15	0	15,7	0	14	1	15	0	14,7	0	14,5	0	1
	24/03/01	16	0	17	0	17	0	16	0	16	0	15	0	0
	25/03/01	16	0	17	0	16	0	16	0	16	0	15	0	0
1	26/03/01	16,7	0	16,8	0	16,6	0	16,8	0	16,8	1	16,1	0	1
2	27/03/01	19,5	2	19,5	0	18,6	0	19	0	19,1	0	18,5	1	3
3	28/03/01	19,6	0	19,5	1	18,8	0	19,4	0	18,8	1	18,8	0	2
4	29/03/01	19	0	19,5	0	19,3	0	20	0	20	0	19,8	0	0
5	30/03/01	19,2	0	19,5	0	19	0	19,2	0	19	1	19	0	1
6	31/03/01	18,5	0	19,2	0	17,8	0	18,5	0	18,2	0	17,8	0	0
7	01/04/01	18,5	0	19	1	17,8	0	18,5	1	18,2	0	17,8	0	2
8	02/04/01	19,8	0	19,8	0	19,2	0	19,7	0	19,6	0	19,2	0	0
9	03/04/01	19,5	0	19,7	0	19,3	0	19,6	0	19,3	0	19,5	1	1
10	04/04/01	19,2	0	19,5	0	19,2	0	19,5	0	19	0	19	0	0
11	05/04/01	19,1	0	19,7	1	18,8	0	19,2	0	19	0	18,5	0	1
12	06/04/01	19,6	1	19,5	0	19,1	0	19,6	0	19	0	18,5	0	1
13	07/04/01	19	0	20	0	19	0	19	0	19	0	19	0	0
14	08/04/01	19	0	21	0	19	0	19	0	19	0	19	0	0
15	09/04/01	19,1	2	19,1	1	18,8	1	19	0	19,5	0	18,9	2	6
16	10/04/01	20	0	20	0	19,2	0	19,7	0	19,8	0	18,7	1	1
17	11/04/01	19,2	1	19,8	0	18,8	0	19	0	19,8	0	18,8	0	1
18	12/04/01	19,3	0	19,9	1	18,7	0	19,5	0	19,1	0	18,6	0	1
19	13/04/01	19,6	0	20	0	18,7	0	19,3	1	19,8	0	18,7	0	1
20	14/04/01	20	0	20	1	19	0	20	0	20	0	20	0	1
21	15/04/01	20	0	19,5	0	20	0	19	0	19	0	20	0	0
22	16/04/01	20	0	19	0	18,5	0	19,5	0	19	0	19	0	0
23	17/04/01	19,8	0	20	0	19,5	0	19,7	0	20	0	19,5	0	0
24	18/04/01	19	0	20	0	19	0	19,5	1	19,5	0	19,5	0	1
25	19/04/01	19	0	19,6	0	19,5	0	19,5	1	19,5	0	19	0	1
26	20/04/01	19	0	19,8	0	18,7	0	19,7	0	19,7	0	19	0	0
27	21/04/01	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	0
28	22/04/01	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	0
29	23/04/01	19,5	0	19,6	0	19	0	19,2	1	19,8	0	19,5	0	1
30	24/04/01	19,8	0	20	0	19,1	0	20	0	19,8	0	19,4	0	0
31	25/04/01	20	0	19,6	0	18,5	0	19,2	0	19	0	18,5	0	0
32	26/04/01	19,8	0	20,6	1	18,8	0	19,7	0	19,5	0	19,8	0	1
33	27/04/01	19,5	0	20	0	18,8	0	20	0	19,6	0	19,3	0	0
34	28/04/01	19,7	0	20,2	1	19,3	0	20	0	19,7	0	19,2	0	1
35	29/04/01	19,5	0	20	0	19	0	19,5	0	19,5	0	19	0	0
36	30/04/01	19	0	19,8	0	18	0	18,7	0	19	0	18,2	0	0
37	01/05/01	19,5	0	20	0	18,7	0	19,5	0	19,5	0	19	0	0
38	02/05/01	19,6	0	20	1	18,9	0	19,5	1	19,4	0	19	0	2
39	03/05/01	19	0	19,3	0	18,5	0	19	0	19,2	0	18,7	0	0
40	04/05/01	19,5	0	20	0	19	0	19,5	0	19,4	0	19	0	0
41	05/05/01	20,2	0	20,4	1	19	0	20	0	19,8	0	19	0	1
42	06/05/01	19,5	0	19,8	0	18,5	0	19,2	1	19,6	0	19	0	1
43	07/05/01	19,5	0	20,3	0	19	0	19,9	0	19,8	0	18,8	0	0
44	08/05/01	20	1	20	0	19	0	20	0	20	0	19	0	1
45	09/05/01	20	0	20,2	0	19	0	19,8	1	19,8	0	19,2	0	1
46	10/05/01	19,8	0	20	0	18,8	0	19,5	0	19,6	0	19,2	0	0
47	11/05/01	20	0	20	0	19	0	19,5	0	19,2	0	18,9	0	0
48	12/05/01	20,2	0	20,8	0	20	0	20,4	0	20,2	0	20	0	0
49	13/05/01	20	0	20,2	0	19,9	0	20,1	0	20,2	0	19,8	0	0
50	14/05/01	20	0	20,5	0	19,5	0	20	1	20	0	19,2	0	1
51	15/05/01	19,8	0	20,2	0	19,2	0	19,9	0	19,9	0	19,2	0	0
<b>Somme</b>			7		10		1		9		3		5	35
<b>Mortalité en %</b>			9,33		13,33		1,33		12		4		6,67	7,78
<b>Moyenne</b>		11,33				6,67				5,33				

### 6.5. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les huîtres adultes.

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1A	1	28	0	2	0	2	6,666666667	7	2
1A	2	28	2	0	0	2	6,666666667		1
1A	3	28	0	1	1	2	6,666666667		2
1A	4	27	2	1	0	3	10		4
1A	5	28	0	0	2	2	6,666666667		1
1A	6	29	0	1	0	1	3,333333333		1
1A	7	27	2	0	1	3	10		2
1A	8	28	2	0	0	2	6,666666667		2
1A	9	27	2	1	0	3	10		2
1A	10	29	1	0	0	1	3,333333333		2
1B	1	28	1	1	0	2	6,666666667	10	1
1B	2	28	0	1	1	2	6,666666667		2
1B	3	27	3	0	0	3	10		2
1B	4	28	1	1	0	2	6,666666667		3
1B	5	24	1	3	2	6	20		2
1B	6	24	4	2	0	6	20		1
1B	7	28	1	1	0	2	6,666666667		1
1B	8	26	1	1	2	4	13,33333333		2
1B	9	28	1	1	0	2	6,666666667		2
1B	10	29	1	0	0	1	3,333333333		1
2A	1	28	2	0	0	2	6,666666667	18	1
2A	2	25	3	2	0	5	16,66666667		2
2A	3	24	2	1	3	6	20		1
2A	4	29	0	1	0	1	3,333333333		2
2A	5	25	2	2	1	5	16,66666667		2
2A	6	22	3	5	0	8	26,66666667		1
2A	7	25	1	1	3	5	16,66666667		3
2A	8	27	1	1	1	3	10		2
2A	9	22	6	2	0	8	26,66666667		2
2A	10	19	9	1	1	11	36,66666667		1
2B	1	26	3	0	1	4	13,33333333	14,66667	1
2B	2	22	5	1	2	8	26,66666667		1
2B	3	29	1	0	0	1	3,333333333		2
2B	4	24	4	1	1	6	20		1
2B	5	27	0	1	2	3	10		1
2B	6	25	3	0	2	5	16,66666667		1
2B	7	26	3	1	0	4	13,33333333		1
2B	8	28	1	0	1	2	6,666666667		1
2B	9	24	4	1	1	6	20		1
2B	10	25	1	2	2	5	16,66666667		2

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
3A	1	27	2	1	0	3	10	21	1
3A	2	27	1	1	1	3	10		1
3A	3	25	2	0	3	5	16,66666667		2
3A	4	27	1	1	1	3	10		1
3A	5	28	2	0	0	2	6,666666667		1
3A	6	22	6	2	0	8	26,66666667		1
3A	7	22	5	2	1	8	26,66666667		1
3A	8	17	6	4	3	13	43,33333333		1
3A	9	16	7	6	1	14	46,66666667		2
3A	10	26	2	1	1	4	13,33333333		1
3B	1	28	1	0	1	2	6,666666667	19,33333	1
3B	2	24	4	2	0	6	20		2
3B	3	24	3	1	2	6	20		1
3B	4	26	1	2	1	4	13,33333333		2
3B	5	22	4	0	4	8	26,66666667		2
3B	6	20	5	4	1	10	33,33333333		1
3B	7	24	5	1	0	6	20		1
3B	8	25	3	0	2	5	16,66666667		1
3B	9	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3B	10	24	2	4	0	6	20		1

**6.6. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les huîtres au stade naissain.**

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1A	1	30	0	0	0	0	0,0	10,3%	2
1A	2	27	1	1	1	3	10,0		2
1A	3	26	3	1	0	4	13,3		1
1A	5	25	4	1	0	5	16,7		2
1A	6	27	2	1	0	3	10,0		1
1A	7	26	2	0	2	4	13,3		2
1A	8	28	1	1	0	2	6,7		2
1A	9	26	3	0	1	4	13,3		2
1A	10	28	1	1	0	2	6,7		1
1A	11	26	3	1	0	4	13,3		1
1B	1	27	1	2	0	3	10,0		9,7%
1B	2	26	2	2	0	4	13,3	2	
1B	3	27	2	1	0	3	10,0	2	
1B	4	27	3	0	0	3	10,0	2	
1B	7	28	1	1	0	2	6,7	1	
1B	8	26	4	0	0	4	13,3	1	
1B	9	28	1	1	0	2	6,7	1	
1B	10	26	3	1	0	4	13,3	2	
1B	11	28	2	0	0	2	6,7	2	
1B	12	28	1	1	0	2	6,7	2	
2A	2	24	5	0	1	6	20,0	14,3%	
2A	3	27	2	1	0	3	10,0		2
2A	4	26	4	0	0	4	13,3		1
2A	5	25	3	2	0	5	16,7		2
2A	6	26	4	0	0	4	13,3		2
2A	7	28	2	0	0	2	6,7		2
2A	8	26	2	2	0	4	13,3		1
2A	9	24	5	0	1	6	20,0		2
2A	11	27	2	0	1	3	10,0		1
2A	12	24	3	3	0	6	20,0		2
2B	1	26	2	1	1	4	13,3		16,00%
2B	2	23	4	2	1	7	23,3	2	
2B	3	25	2	3	0	5	16,7	2	
2B	4	23	3	1	3	7	23,3	2	
2B	5	28	1	0	1	2	6,7	1	
2B	6	25	3	2	0	5	16,7	1	
2B	7	24	6	0	0	6	20,0	2	
2B	8	26	3	1	0	4	13,3	1	
2B	9	27	1	0	2	3	10,0	1	
2B	11	25	3	1	1	5	16,7	2	

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
3A	1	25	3	1	1	5	16,7	<b>25,3%</b>	2
3A	2	22	4	4	0	8	26,7		2
3A	3	22	3	1	4	8	26,7		1
3A	4	24	4	1	1	6	20,0		2
3A	5	24	4	1	1	6	20,0		2
3A	6	20	5	4	1	10	33,3		2
3A	7	22	5	2	1	8	26,7		1
3A	8	22	3	3	2	8	26,7		1
3A	9	23	4	2	1	7	23,3		2
3A	10	20	5	2	3	10	33,3		1
3B	1	21	4	2	3	9	30,0	<b>24,3%</b>	2
3B	2	20	5	2	3	10	33,3		2
3B	3	25	3	2	0	5	16,7		1
3B	4	24	4	1	1	6	20,0		2
3B	5	20	5	5	0	10	33,3		2
3B	6	20	2	5	3	10	33,3		2
3B	7	26	1	3	0	4	13,3		2
3B	8	25	4	1	0	5	16,7		2
3B	9	20	7	3	0	10	33,3		2
3B	10	26	3	1	0	4	13,3		1

**6.7. Taux d'éclosion des larves issues de croisements d'huîtres exposées à différentes concentrations d'atrazine.**

<b>Lot</b>	<b>Nombre d'ovocytes</b>	<b>Nombre de larves à J1</b>	<b>Taux d'éclosion en %</b>
1	3000000	2416000	80,53
2	3000000	2300000	76,67
3	3000000	2673000	89,10
4	3000000	1027000	34,23
5	3000000	1387000	46,23
6	3000000	1813000	60,43
7	3000000	2407000	80,23
8	3000000	1787000	59,57
9	3000000	2152000	71,73
10	3000000	1600000	53,33
11	3000000	1647000	54,90
12	3000000	1813000	60,43

**Moyenne**

<b>Lot</b>	<b>Taux d'éclosion en %</b>
0 mg/l	74,25
0,01 mg/l	62,1
0,1 mg/l	55,5

### 6.8. Tailles des larves ( $\mu\text{m}$ ) en fonction des différents lots et des journées d'élevage (J).

La tête de lot représente les larves retenues sur un tamis de 220  $\mu\text{m}$  et la queue de lot représente les larves retenues entre 125 et 220  $\mu\text{m}$ .

Lot	J1	J3	J6	J8	J10	J13	J15	J17	J20	J22 tête	J22 queue	J24 tête
1	73,84	81,33	97,08	98,60	101,42	125,73	143,74	182,76	245,95		286,63	349,49
2	76,28	81,27	98,11	103,03	114,16	145,44	170,55	201,78	274,05	349,17		342,15
3	75,13	78,55	99,19	102,82	103,12	132,49	158,54	187,09	260,92		285,91	338,95
4	75,32	82,42	95,28	99,90	100,03	129,88	161,08	183,80	234,22	347,84		344,37
5	76,48	85,00	97,97	101,48	104,63	138,30	166,81	213,27	293,49	351,31		336,35
6	74,28	84,68	97,15	99,84	103,70	141,38	173,44	215,71	303,48	359,64		348,62
7	76,27	83,12	99,73	102,27	105,86	133,85	157,31	202,27	288,31	355,33		343,88
8	77,71	87,20	104,53	107,34	113,39	143,63	162,29	195,38	247,46		270,72	336,14
9	76,09	86,28	101,49	105,91	119,47	154,17	189,94	244,15	300,68	355,65		346,16
10	75,31	83,51	100,94	106,79	120,77	162,74	177,61	220,93	298,51	351,42		349,28
11	76,50	85,03	97,51	99,03	102,48	125,05	139,61	175,42	220,26		221,66	
12	76,35	83,00	97,21	97,65	100,21	115,88	144,22	167,63	239,52		224,65	

#### Moyenne

Lot	J1	J3	J6	J8	J10	J13	J15	J17	J20	J22
0 mg/l	76,03	83,23	99,86	102,81	108,71	137,16	158,47	195,55	263,95	315,46
0,01 mg/l	75,46	82,69	99,23	103,85	110,85	144,82	171,79	208,99	273,58	335,21
0,1 mg/l	75,90	84,43	97,46	99,5	102,75	130,15	156,02	193,01	264,19	289,32