



**UNIVERSITE DE LA ROCHELLE**  
**U.F.R. DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**  
**ECOLE DOCTORALE**

**Thèse Doctorat**

Biologie

**KARINE BOUILLY**

**IMPACT DE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX**  
**SUR L'ANEUPLOÏDIE CHEZ**  
**L'HUITRE CREUSE, *Crassostrea gigas*,**  
**DANS LE BASSIN DE MARENNES-OLERON**

*Thèse dirigée par Pierre Miramand*

Soutenue le 10 décembre 2004

**Jury :**

M. Pierre MIRAMAND	Professeur, Université de La Rochelle	Directeur de thèse
M. Michel MATHIEU	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Mme Laureana REBORDINOS	Professeur associée, Université de Cádiz (Espagne)	Rapporteur
M. André GERARD	Directeur de recherches, IFREMER, Nantes	Examineur
Mme A. LEITÃO-BEN HAMADOU	Docteur en Cytogénétique, Université de Trás-os-Montes et Alto Douro, Vila Real (Portugal)	Examineur
Mme Slvie LAPEGUE	Chargée de recherches, IFREMER, La Tremblade	Co-directeur



# REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer ma gratitude à l'ensemble des personnes qui sont intervenues de près ou de loin au cours des quatre années passées au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade (DEA puis thèse), tant professionnellement que personnellement.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de la station Ifremer de La Tremblade, dirigée successivement par André Gérard et Philippe Gouletquer. Je les remercie tous deux de m'avoir accueillie dans ce laboratoire. Je tiens à remercier plus particulièrement André Gérard d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Pierre Miramand pour avoir accepté la direction de cette thèse. Merci de l'intérêt porté à mon sujet d'étude et de vos conseils.

Sylvie Lapègue a assuré l'encadrement scientifique de ce travail ainsi que de mon stage de DEA. Elle a toujours été présente au cours de ses quatre années de travail et m'a laissé une grande autonomie scientifique qui m'a permis de développer mon esprit critique. Sans elle, ce travail n'aurait pas vu le jour, et je tiens donc à la remercier pour sa confiance tout au long de ces années de recherche.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Alexandra Leitão pour m'avoir donné goût à la cytogénétique. Je la remercie chaleureusement pour son implication au cours de ce travail même malgré l'éloignement géographique et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Merci aussi à Helen McCombie qui a suivi mes débuts en cytogénétique, m'a donné de nombreux conseils et pour ses corrections d'articles.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Michel Mathieu et Laureana Rebordinos pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, et pour s'y être investi avec plaisir.

Merci également à Pierre Boudry et à Tim Sharbel pour leurs nombreux conseils concernant mon travail de recherche et de publication.

Je tiens aussi à remercier l'équipe technique de l'écloserie de La Tremblade qui ont contribué au bon déroulement de mes expérimentations et qui étaient toujours présents pour les croisements, élevages larvaires, production de phytoplancton, etc... Je remercie donc Serge Heurtebise, Pascal Phelipot, Christophe Ledu, Florence Cornette et Frédéric Blouin.

Un grand merci aux « filles », c'est-à-dire Alexandra, Helen et Sylvie pour avoir toujours été présentes lors des matinées « fixations des branchies des huîtres » !

Un très grand merci aux différents stagiaires qui ont contribué à ce travail, Sébastien Sabatier, Vincent Baffard, Cécile Caillaud, Stéphanie Grouhel et Marc Bonnard.

Merci à Radhouane Ben Hamadou pour son aide très précieuse en statistiques. Merci d'avoir toujours répondu présent pour les multiples questions qui me venaient à l'esprit !

Je tiens également à remercier Dominique Munaron, ancien « thésard » du CEMAGREPH de Bordeaux pour avoir réalisé les analyses de pesticides dans le cadre de mes expérimentations. Merci aussi pour toutes tes réponses toujours très rapides concernant mes questions sur les quantités de pesticides dans le bassin de Marennes-Oléron.

Je tiens aussi à adresser tous mes remerciements à l'ensemble du personnel de la station Ifremer de La Tremblade pour leur collaboration, leur accueil chaleureux, leur joie de vivre, leur convivialité...

Merci aux différentes secrétaires du LGP qui se sont succédées (Delphine Rousic, Emmanuelle Vincent, Isabelle Duet et Véronique Renaud) pour leur aide « administrative » ainsi qu'à Martine Grasset et à Florence Rivet.

Merci aux différents thésards du labo ! Entre « thésards », nous nous soutenons ! Bonne chance à Lionel Dégremont qui est maintenant aux Etats-Unis pour un post-doc. Il aura été notre « aîné » ! Merci à Mélanie Gay qui va finir sa thèse en même temps que moi. Je lui souhaite bonne chance pour son avenir professionnel. Enfin, les deux derniers « petits thésards », Béatrice Gagnaire et Nicolas Taris. Bon courage à vous pour votre dernière ligne droite. Un grand merci à Béatrice pour la collaboration dans nos sujets d'étude respectifs et la réalisation d'une publication en commun.

Une partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins de l'Université de La Rochelle, dirigé successivement par Pierre Miramand, puis Gérard Blanchard. Je remercie principalement Thierry Guyot pour son initiation à la technique d'analyse du cadmium et à l'utilisation du « spectro ».

Une autre partie de ce travail a été réalisée au Centro de Genética e Biotecnologia de l'Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, à Vila Real au Portugal, dirigé par Henrique Guedes-Pinto. Je remercie Raquel Chaves de m'avoir permis de mener à bien mon projet là-bas. Un immense merci encore une fois à Alexandra qui m'a initiée à la cytogénétique moléculaire et qui m'a beaucoup aidée dans la réalisation des caryotypes marqués.

Une partie de ce travail a également été effectuée au sein d'une éclosérie de la Taylor Shellfish Farms, à Quilcene, Washington, aux Etats-Unis, dirigée par Joth Davis, en collaboration avec Dennis Hedgecock de l'Université de Davis, Californie. Je remercie Dennis pour les fonds qui ont permis mon séjour aux Etats-Unis. Merci aussi à Joth et à sa famille pour leur accueil. Un grand merci aussi à toute l'équipe de l'éclosérie et surtout à une étudiante, Lizzie Nelson, sans qui ce séjour n'aurait pas été aussi agréable !

Je tiens à remercier particulièrement le Conseil Général de Charente-Maritime qui a soutenu ce travail financièrement via ma bourse de thèse.

Je voudrais également remercier tous les stagiaires qui ont fait un court ou long séjour à la station I fremer de La Tremblade. Sans eux, la vie n'aurait pas été la même ici... Je ne vais pas tous les citer par peur d'en oublier...

Remerciements des plus chaleureux à tous ceux qui ont marqués ma vie par leur présence, leur amitié : Alexandra, Vedrana, Véro, Steph, Mélanie, Delphine L, Béa, Céline, Maeva, Adeline, Helen, Valérie, Delphine R, Flo, Sara, Lionel, Niklas, Marc, Nico, Tim, Jean-Côme, Christophe, Cécé, ...et tout ceux que j'oublie...

Je tiens également à remercier tous mes supérieurs qui m'ont soutenue dans mes démarches afin de participer à différents colloques internationaux et pour mes diverses missions à l'étranger. Cela m'a permis d'acquérir une expérience très enrichissante.

Enfin, un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans la voie que j'ai choisie.

**Merci à tous pour ces quatre années fabuleuses et inoubliables**



*A mes parents...*





# Avant - Propos

Une partie des résultats rapportés dans ce mémoire a donné lieu à des publications dans des revues scientifiques et des communications dans des congrès scientifiques internationaux :

## **Publications :**

1. **Karine Bouilly**, Alexandra Leitão, Helen McCombie and Sylvie Lapègue. **2003**. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology and Chemistry** 22 (1): 229-233 (Annexe 1).
2. Béatrice Gagnaire, Tristan Renault, **Karine Bouilly**, Sylvie Lapègue and Hélène Thomas-Guyon. **2003**. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. **Current Pharmaceutical Design** 9: 193-199.
3. **Karine Bouilly**, Helen McCombie, Alexandra Leitão and Sylvie Lapègue. **2004**. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology** 145 (4): 699-705 (Annexe 2).
4. **Karine Bouilly**, Alexandra Leitão, Raquel Chaves, Henrique Guedes-Pinto, Pierre Boudry and Sylvie Lapègue. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. **Genome**, sous presse (Annexe 3).

## **Communications :**

### **Posters :**

1. **31<sup>ème</sup> Conférence du GSP (Groupe Français des Pesticides)** 'Recherches d'effets biologiques de l'atrazine sur hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*'. B. Gagnaire, T. Renault, H. Thomas-Guyon, S. Lapègue, **K. Bouilly**, A. Gérard et P. Miramand. **(Lyon, France) Mai 2001**.

2. **94<sup>th</sup> Annual Meeting of the National Shellfisheries Association.** ‘Impact of atrazine on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie and S. Lapègue. (Mystic, Connecticut, Etats-Unis) 14-18 avril 2002. **Journal of Shellfish Research** 21(1): 425 Juin 2002.
3. **7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.** ‘Recent advances on aneuploidy study in oysters: the effect of an environmental factor’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie, S. Sabatier and S. Lapègue. (Montpellier, France) 19-23 août 2002.
4. **Second B Chromosome Conference.** ‘Impact of atrazine on somatic aneuploidy in cupped oysters, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. (Bubión, Granada, Espagne) 26-29 juin 2004.
5. **15<sup>th</sup> International Chromosome Conference.** ‘Effects of the herbicide atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. (London, Royaume-Uni) 5-10 septembre 2004. **Chromosome Research** 12 (Suppl. 1): 140.

#### **Présentations orales :**

1. **European Society of Marine Biotechnology Conference-ESMB.** ‘New molecular cytogenetic tools and their application for the study of aneuploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*’. A. Leitão, R. Chaves, H. McCombie and S. Lapègue, **K. Bouilly**, P. Boudry, H. Guedes-Pinto and C. Thiriot-Quévieux. (Nantes, France) 12-14 mai 2002.
2. **5<sup>th</sup> International Congress of Limnology-Oceanography.** ‘Impact of atrazine on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand and S. Lapègue. (Paris, France) 9-12 septembre 2002.
3. **95<sup>th</sup> Annual Meeting of the National Shellfisheries Association.** ‘Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, H. McCombie,

A. Leitão and S. Lapègue. (New Orleans, Louisiana, Etats-Unis) 13-17 avril 2003.  
**Journal of Shellfish Research** 22(1): 320 Juin 2003.

4. **3<sup>rd</sup> International Congress of European Malacological Societies.** ‘Impact of pollutants on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand and S. Lapègue. (La Rochelle, France) 24-27 juin 2003.
5. **133<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Fisheries Society.** ‘Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*’. **K. Bouilly**, H. McCombie, A. Leitão and S. Lapègue. (Québec, Canada) 10-14 août 2003.



---

## Table des matières

<i>Table des matières</i> .....	<b>13</b>
<i>Introduction générale</i> .....	<b>23</b>
<b><i>Partie I : Présentation du sujet d'étude</i></b> .....	<b>29</b>
<b>1 L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	<b>29</b>
1.1 Systématique .....	29
1.2 Carte d'identité cytogénétique .....	29
1.3 Anatomie .....	30
1.4 Reproduction .....	31
1.5 Vie larvaire .....	32
1.6 Importance économique .....	32
1.7 Mortalités estivales.....	34
1.8 Espèce sentinelle .....	34
<b>2 L'aneuploïdie</b> .....	<b>35</b>
2.1 Définition et origine .....	35
2.2 Chez les mollusques bivalves.....	36
2.3 Induction chimique.....	37
<b>3 Pollution marine</b> .....	<b>38</b>
3.1 Sources de pollution .....	38
3.2 Etat des lieux dans le bassin de Marennes-Oléron.....	39
<b>4 Les pesticides</b> .....	<b>40</b>
4.1 Définition, utilisation .....	40
4.2 Les triazines : famille d'herbicides .....	40
4.3 Transport dans le milieu aquatique .....	41

---

4.4	Contamination du bassin de Marennes-Oléron par les herbicides .....	42
4.5	Bioconcentration .....	45
<b>5</b>	<b>Toxicité de l'atrazine vis-à-vis des organismes vivants.....</b>	<b>46</b>
5.1	Toxicité vis-à-vis d'organismes aquatiques (ex : les grenouilles) .....	46
5.2	Toxicité vis-à-vis du phytoplancton.....	47
5.3	Toxicité vis-à-vis des mollusques .....	47
<b>6</b>	<b>L'atrazine et ses conséquences au niveau génétique .....</b>	<b>48</b>
6.1	Activité clastogène .....	48
6.2	Activité aneugène.....	49
6.3	Activité mutagène .....	50
<b>7</b>	<b>Le cadmium .....</b>	<b>50</b>
7.1	Sources .....	50
7.2	Réglementation.....	51
7.3	Transport dans le milieu aquatique .....	52
7.4	Contamination de l'environnement par le cadmium .....	52
7.5	Origine du cadmium dans le bassin de Marennes-Oléron.....	53
7.6	Bioconcentration .....	53
7.7	Facteurs influençant les taux de cadmium chez les organismes .....	54
7.8	Mécanismes de détoxification .....	55
<b>8</b>	<b>Toxicité du cadmium vis-à-vis des organismes vivants.....</b>	<b>56</b>
8.1	Toxicité vis-à-vis de l'homme.....	56
8.2	Toxicité vis-à-vis d'organismes aquatiques .....	57
8.3	Toxicité vis-à-vis du phytoplancton.....	57
8.4	Toxicité vis-à-vis des mollusques .....	58
<b>9</b>	<b>Le cadmium et ses conséquences au niveau génétique.....</b>	<b>59</b>
9.1	Activité clastogène .....	59

9.2	Activité aneugène .....	59
9.3	Activité mutagène .....	60
<b>Partie II : Matériels et Méthodes .....</b>		<b>63</b>
<b>1</b>	<b>Etude de l'aneuploïdie .....</b>	<b>63</b>
1.1	Conditionnement des huîtres .....	63
1.2	Préparations chromosomiques.....	63
1.2.1	Arrêt des cellules en métaphase .....	64
1.2.2	Choc hypotonique.....	65
1.2.3	Fixation .....	65
1.2.4	Exécution des préparations chromosomiques.....	65
1.2.5	Coloration .....	66
1.3	Comptage chromosomique.....	66
<b>2</b>	<b>Croisements.....</b>	<b>67</b>
<b>3</b>	<b>Elevage larvaire .....</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>Quantification du cadmium.....</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>72</b>
<b>Partie III : Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez les huîtres <i>Crassostrea gigas</i> .....</b>		<b>77</b>
<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>77</b>
<b>2</b>	<b>Impact à différents stades de développement .....</b>	<b>77</b>
2.1	Introduction .....	77
2.2	Matériels et méthodes.....	78
2.2.1	Matériel biologique .....	78
2.2.2	Exposition à l'atrazine .....	79
2.2.3	Exposition pendant le stade larvaire.....	80
2.2.4	Analyses statistiques.....	82
2.3	Résultats .....	82
2.3.1	Huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes .....	82

2.3.2	<i>Huîtres Crassostrea gigas juvéniles</i> .....	84
2.3.3	<i>Comparaison des données obtenues chez Crassostrea gigas aux stades adulte et juvénile</i> .....	85
2.3.4	<i>Exposition pendant le stade larvaire</i> .....	85
2.4	Discussion .....	88
<b>3</b>	<b>Persistance de l'effet observé</b> .....	<b>90</b>
3.1	Introduction .....	90
3.2	Matériels et méthodes.....	91
3.2.1	<i>Descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine</i> .....	91
3.2.2	<i>Transfert dans des conditions non polluées</i> .....	91
3.2.3	<i>Comptages chromosomiques</i> .....	92
3.2.4	<i>Analyses statistiques</i> .....	92
3.3	Résultats .....	93
3.3.1	<i>Descendance d'huîtres Crassostrea gigas exposées à l'atrazine</i> .....	93
3.3.2	<i>Comparaison entre les parents exposés à l'atrazine et leurs descendants</i> .....	95
3.3.3	<i>Transfert dans des conditions non polluées</i> .....	96
3.4	Discussion .....	98
<b>4</b>	<b>Identification des chromosomes manquants par digestion enzymatique</b> .....	<b>101</b>
4.1	Introduction .....	101
4.2	Matériels et méthodes.....	102
4.2.1	<i>Matériel biologique</i> .....	102
4.2.2	<i>Digestion enzymatique</i> .....	102
4.2.3	<i>Analyse des métaphases aneuploïdes</i> .....	102
4.2.4	<i>Analyse statistique</i> .....	103
4.3	Résultats .....	103
4.4	Discussion .....	105
<b>5</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>107</b>
	<b><i>Partie IV : Impact du cadmium sur l'aneuploïdie chez les huîtres Crassostrea gigas</i></b> .....	<b><i>111</i></b>



<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>111</b>
<b>2</b>	<b>Impact à différents stades de développement .....</b>	<b>111</b>
2.1	Introduction .....	111
2.2	Matériels et méthodes.....	112
2.2.1	<i>Matériel biologique .....</i>	<i>112</i>
2.2.2	<i>Exposition au cadmium .....</i>	<i>112</i>
2.2.3	<i>Analyses statistiques.....</i>	<i>113</i>
2.3	Résultats .....	114
2.3.1	<i>Huîtres Crassostrea gigas adultes .....</i>	<i>114</i>
2.3.2	<i>Huîtres Crassostrea gigas juvéniles.....</i>	<i>117</i>
2.3.3	<i>Comparaison des données obtenues chez Crassostrea gigas aux stades adulte et juvénile .....</i>	<i>119</i>
2.4	Discussion .....	121
<b>3</b>	<b>Effet sur la descendance de la population adulte .....</b>	<b>123</b>
3.1	Introduction .....	123
3.2	Matériels et Méthodes .....	124
3.2.1	<i>Fécondations .....</i>	<i>124</i>
3.2.2	<i>Développement.....</i>	<i>124</i>
3.2.3	<i>Analyses statistiques.....</i>	<i>124</i>
3.3	Résultats .....	124
3.3.1	<i>Taux d'éclosion.....</i>	<i>124</i>
3.3.2	<i>Croissance larvaire.....</i>	<i>125</i>
3.3.3	<i>Quantification du cadmium.....</i>	<i>126</i>
3.3.4	<i>Aneuploïdie.....</i>	<i>127</i>
3.3.5	<i>Comparaison entre les parents exposés au cadmium et leurs descendants...</i>	<i>128</i>
3.4	Discussion .....	129
<b>4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>130</b>
<b>Partie V : Etude de l'aneuploïdie chez des huîtres en milieu naturel.....</b>		<b>133</b>
<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>133</b>

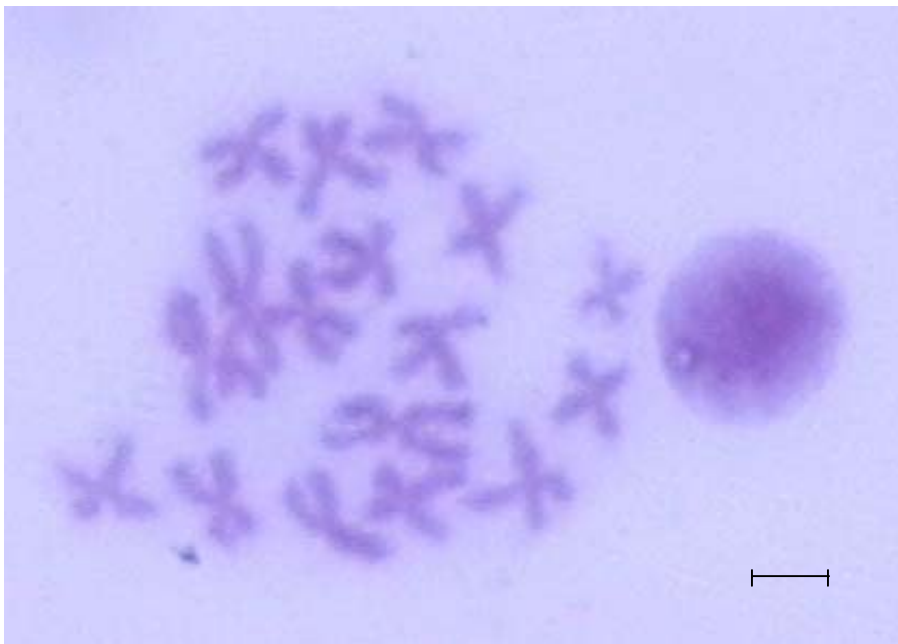
<b>2</b>	<b>Relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie ?.....</b>	<b>134</b>
2.1	Introduction .....	134
2.2	Matériels et méthodes.....	135
2.2.1	<i>Matériel biologique</i> .....	135
2.2.2	<i>Conditionnement</i> .....	135
2.2.3	<i>Analyses statistiques</i> .....	135
2.3	Résultats .....	136
2.3.1	<i>Mortalité</i> .....	136
2.3.2	<i>Aneuploïdie des huîtres Crassostrea gigas situées à Perquis</i> .....	136
2.3.3	<i>Aneuploïdie des huîtres Crassostrea gigas situées à Bouin</i> .....	136
2.3.4	<i>Comparaison des données obtenues chez Crassostrea gigas sur les sites de Perquis et de Bouin</i> .....	137
2.4	Discussion .....	137
<b>3</b>	<b>Impact des conditions d'élevage sur le taux d'aneuploïdie .....</b>	<b>139</b>
3.1	Introduction .....	139
3.2	Matériels et Méthodes .....	139
3.2.1	<i>Matériel biologique</i> .....	139
3.2.2	<i>Prélèvements</i> .....	140
3.2.3	<i>Comptage chromosomique</i> .....	141
3.2.4	<i>Analyses statistiques</i> .....	141
3.3	Résultats .....	141
3.3.1	<i>Mortalité et croissance</i> .....	141
3.3.2	<i>Aneuploïdie</i> .....	143
3.4	Discussion .....	145
<b>4</b>	<b>Fluctuations au cours du temps du taux d'aneuploïdie d'huîtres d'un même site : la vasière de Brouage .....</b>	<b>146</b>
4.1	Introduction .....	146
4.2	Matériels et méthodes.....	147
4.2.1	<i>Matériel biologique</i> .....	147
4.2.2	<i>Conditionnement</i> .....	148

---

4.2.3	<i>Comptage chromosomique</i> .....	148
4.2.4	<i>Analyses statistiques</i> .....	148
4.3	Résultats .....	149
4.3.1	<i>Quantification du cadmium</i> .....	149
4.3.2	<i>Aneuploïdie</i> .....	149
4.4	Discussion .....	150
<b>5</b>	<b>Relation entre croissance due à l'hétérosis et aneuploïdie ?</b> .....	<b>152</b>
5.1	Introduction .....	152
5.2	Matériels et méthodes.....	152
5.2.1	<i>Matériel biologique</i> .....	152
5.2.2	<i>Conditionnement</i> .....	153
5.2.3	<i>Analyses statistiques</i> .....	153
5.3	Résultats .....	153
5.3.1	<i>Longueur et poids des huîtres</i> .....	153
5.3.2	<i>Aneuploïdie des huîtres</i> .....	154
5.3.3	<i>Comparaison entre les deux expériences</i> .....	154
5.4	Discussion .....	155
<b>6</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>157</b>
	<b><i>Conclusion générale et Perspectives</i></b> .....	<b>161</b>
	<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	<b>169</b>
	<b><i>Liste des tableaux</i></b> .....	<b>191</b>
	<b><i>Liste des figures</i></b> .....	<b>192</b>
	<b><i>Liste des annexes</i></b> .....	<b>197</b>
	<b><i>Annexes</i></b> .....	<b>201</b>



## Introduction générale



*Métaphase aneuploïde de Crassostrea gigas avec  $2n=17$  chromosomes*

*Echelle = 3,5  $\mu$ m*



---

## Introduction générale

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, mollusque bivalve marin, a une large répartition géographique et cette espèce a un intérêt commercial très important. *C. gigas* est présente dans de nombreux écosystèmes plus ou moins soumis aux perturbations d'origine anthropique et donc à une pollution par des xénobiotiques. *C. gigas* a ainsi été choisie comme modèle biologique pour étudier les effets de polluants car ce mollusque sédentaire et filtreur est particulièrement exposé aux contaminations du milieu marin et peut présenter de fortes concentrations tissulaires en métaux lourds.

La zone de Marennes-Oléron est une région où cohabitent deux activités majeures : l'agriculture et la conchyliculture. Le bassin de Marennes-Oléron est la première zone de production ostréicole en France avec 40 à 60000 tonnes d'huîtres par an (soit environ 45% des huîtres consommées en France). Si l'eau douce apporte au bassin des conditions favorables pour l'élevage des huîtres, elle peut aussi apporter différents types de polluants. Les polluants chimiques tels que les pesticides et les métaux lourds peuvent avoir des conséquences défavorables sur les organismes vivants. Les quantités de pesticides et métaux lourds apportées au bassin dépendent de la météorologie et des périodes d'épandage. Parmi ceux-ci, l'atrazine, un herbicide très couramment utilisé au début de cette étude, surtout pour la culture de maïs, est retrouvé en grande quantité dans les canaux de drainage puis dans le bassin de Marennes-Oléron. Le cadmium, métal lourd, est aussi présent en quantité assez importante dans le bassin de Marennes-Oléron à cause de l'apport des eaux girondines.

Des anomalies cytogénétiques, telles que l'aneuploïdie, sont connues pour être communes chez les bivalves (ex : Dixon, 1982 ; Thiriot-Quiévreux, 1986). Ce phénomène, qui a pour origine principalement une non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose (Bond et Chandley, 1983 ; Martin et Rademaker, 1990), est souvent léthal chez les vertébrés tels que les mammifères ou bien associé à un retard de croissance (Vig et Sandberg, 1987). Par contre, ce phénomène est mieux toléré chez les plantes et les invertébrés (Verma, 1990 ; Wang *et al.*, 1999). Chez *C. gigas*, l'aneuploïdie est caractérisée par l'altération du nombre diploïde normal de 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967 ; Thiriot-Quiévreux, 1984a) en cellules hypodiploïdes avec 19, 18 ou 17 chromosomes (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992).

Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a déjà été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *C. gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitão *et al.*, 2001a) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère (Leitão *et al.*, 2001b) a été émise et il existe une perte préférentielle de certains chromosomes (Leitão *et al.*, 2001c). Cependant, aucune recherche n'avait été effectuée sur l'influence de facteurs environnementaux (tels que des polluants) sur le taux d'aneuploïdie des huîtres. En ce qui concerne les bivalves, seule une étude réalisée chez des embryons de moules *Mytilus edulis* provenant d'un environnement pollué chimiquement avait montré un effet sur leur taux d'aneuploïdie (Dixon, 1982).

Les causes du phénomène d'aneuploïdie ne sont pas encore très claires, mais cette étude a pour but d'apporter des réponses aux questions suivantes :

- Le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* peut-il être influencé par une pollution environnementale ?
- Si tel est le cas, l'effet observé persiste-t-il dans le temps et entre les générations ?
- L'aneuploïdie est-elle un phénomène agissant sur les mêmes chromosomes ou bien certains facteurs peuvent-ils agir sur différents chromosomes cibles ?
- Existe-t-il une relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie ?
- Les conditions environnementales ont-elles une influence sur le taux d'aneuploïdie des huîtres *C. gigas* ?
- Sur un même site, le taux d'aneuploïdie des huîtres d'une même population évolue-t-il au cours du temps ?
- Existe-t-il une relation entre croissance due à l'hétérosis et aneuploïdie ?

Dans une première partie, une revue bibliographique non exhaustive des connaissances acquises sur notre sujet d'étude sera exposée en présentant brièvement le modèle biologique utilisé (l'huître creuse *C. gigas*), l'aneuploïdie, la contamination de l'environnement par des polluants chimiques tels que l'atrazine et le cadmium, leur toxicité vis-à-vis de divers organismes et les conséquences génétiques de ces deux contaminants. Dans une seconde partie, la méthodologie utilisée sera décrite. La troisième partie est consacrée à la présentation



des résultats acquis lors de l'étude de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas*. Une grande majorité des résultats présentés dans cette partie a déjà fait l'objet de trois publications. Dans une quatrième partie, les résultats obtenus avec une exposition au cadmium seront présentés. Enfin, la cinquième et dernière partie sera consacrée à l'étude de l'aneuploïdie chez des huîtres en milieu naturel.

**Ces travaux permettent de déterminer si un facteur environnemental (l'atrazine ou le cadmium) peut avoir un effet sur le taux d'aneuploïdie des huîtres creuses *C. gigas* et apportent des éléments de réponse sur l'observation de taux d'aneuploïdie différents dans le milieu naturel.**



# Partie I :

## Présentation du sujet d'étude



*Huître Crassostrea gigas juvénile*

*Echelle = 7 mm*



## Partie I : Présentation du sujet d'étude

### 1 L'huître creuse *Crassostrea gigas*

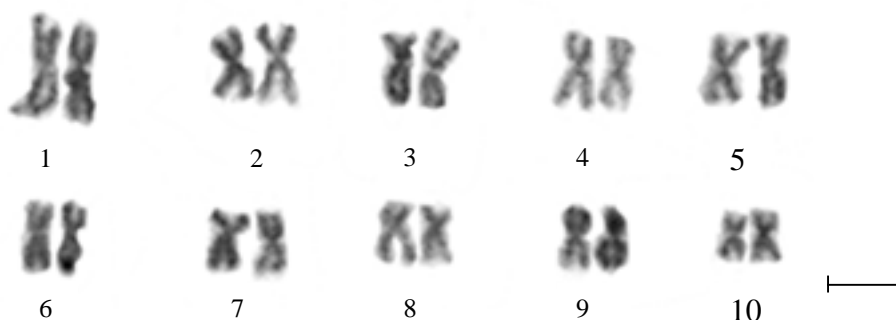
#### 1.1 Systématique

Selon Grassé (1960), la classification de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est la suivante :

<u>Règne</u> :	Animal
<u>Embranchement</u> :	Mollusque
<u>Classe</u> :	Bivalve
<u>Ordre</u> :	Filibranchia
<u>Sous-ordre</u> :	Anisomyaria
<u>Super-famille</u> :	Ostreidea
<u>Famille</u> :	Ostreidae
<u>Sous-famille</u> :	Crassostreinae
<u>Genre</u> :	<i>Crassostrea</i>
<u>Espèce</u> :	<i>gigas</i>

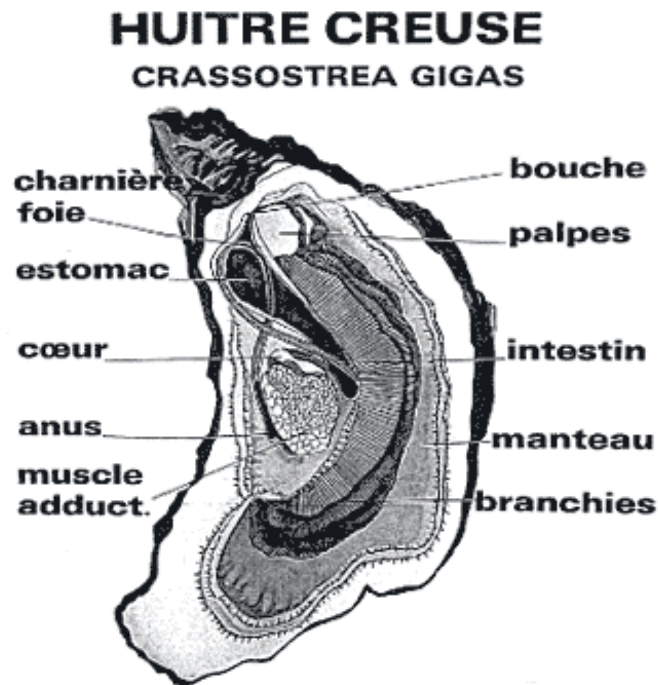
#### 1.2 Carte d'identité cytogénétique

L'huître creuse *Crassostrea gigas* a un nombre chromosomique diploïde  $2n=20$  (Thiriot-Quévieux, 2002) comme la plupart des huîtres de la famille des Ostreidae. Il existe une seule exception. Il s'agit de l'huître *Dendostrea folium* qui a un nombre chromosomique diploïde  $2n=18$  (Ieyama, 1990). L'huître *C. gigas* a un caryotype avec 10 paires de chromosomes métacentriques numérotées selon leur taille décroissante (Thiriot-Quévieux, 1984b) (Figure 1).



**Figure 1 : Caryotype de *Crassostrea gigas* ( $2n=20$ ) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. Echelle = 5  $\mu$ m.**

### 1.3 Anatomie



**Figure 2 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Barnabé, 1985).**

La Figure 2 représente l'anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* hors période de maturation.

L'huître possède une coquille constituée de deux valves : la valve gauche est creuse permettant à la masse viscérale de s'y développer tandis que la valve droite est plate, ornée d'un certain nombre de « frisures ». Ces valves sont composées principalement de carbonate de calcium (95%) et d'oligo-éléments tels que le fer et le magnésium.

Le ligament commande l'ouverture de l'huître tandis que le muscle adducteur la maintient fermée.

Le manteau est constitué de deux lobes et renferme la cavité palléale. Son rôle est multiple puisqu'il assure la filtration pour la nutrition de l'huître et constitue un organe sensoriel. Il assure aussi la croissance et le développement de la coquille de l'huître et contribue à la fabrication de la nacre qui en recouvre l'intérieur. La cavité palléale contient l'anus, les orifices rénaux et génitaux, et les branchies (ou cténidies). Les branchies sont constituées de minuscules filaments irrigués et équipés de cils vibratiles. Par leurs

mouvements, ils créent des courants qui apportent la nourriture vers la bouche. Ainsi, elles filtrent l'eau pour en extraire les éléments nutritifs mais également l'oxygène dissous, donc elles ont un rôle à la fois dans la nutrition et la respiration. L'huître creuse filtre en moyenne 15 litres d'eau par heure.

L'appareil digestif est constitué de la bouche, l'œsophage, la partie stomacale, la glande digestive et l'intestin. L'huître est planctonophage, elle se nourrit essentiellement de phytoplancton (diatomées, flagellés, ...) et de zooplancton.

La cavité péricardique renferme le cœur. Celui-ci est formé de deux oreillettes et d'un ventricule, qui par des artères et des artéioles distribuent le sang aux différentes parties du corps.

L'appareil reproducteur est constitué d'une gonade qui varie de taille en fonction des saisons. Les organes reproducteurs de l'huître comprennent un double système de tubules très ramifiés de part et d'autre du corps dont les canaux se réunissent pour constituer des conduits plus importants qui s'unissent eux mêmes en un seul conduit excréteur. En hiver, pendant la phase de repos sexuel, la gonade est à peine visible, elle se développe en revanche considérablement au printemps et en été dans le tissu conjonctif enveloppant la masse digestive.

#### **1.4    Reproduction**

Les huîtres adultes présentent une reproduction sexuée. Les géniteurs produisent donc des gamètes mâles (spermatozoïdes) ou femelles (ovocytes). Chez *Crassostrea gigas*, la sexualité est alternative, l'huître fonctionne donc comme mâle ou femelle au cours d'une saison et peut changer ou non de sexe l'année suivante. Cependant, quelques individus hermaphrodites peuvent être observés. Le milieu (température et nutrition), mais aussi des facteurs hormonaux internes, semblent contrôler le déterminisme du changement de sexe (Barnabé, 1985).

La gamétogenèse débute dès que la température de l'eau s'élève au-dessus de 10°C. Les produits génitaux ne sont émis que 4 ou 5 mois plus tard, lorsque la température dépasse les 18°C. La fécondation a lieu à l'extérieur du corps de l'animal et l'huître creuse *C. gigas* est ovipare (Grelon, 1978).

---

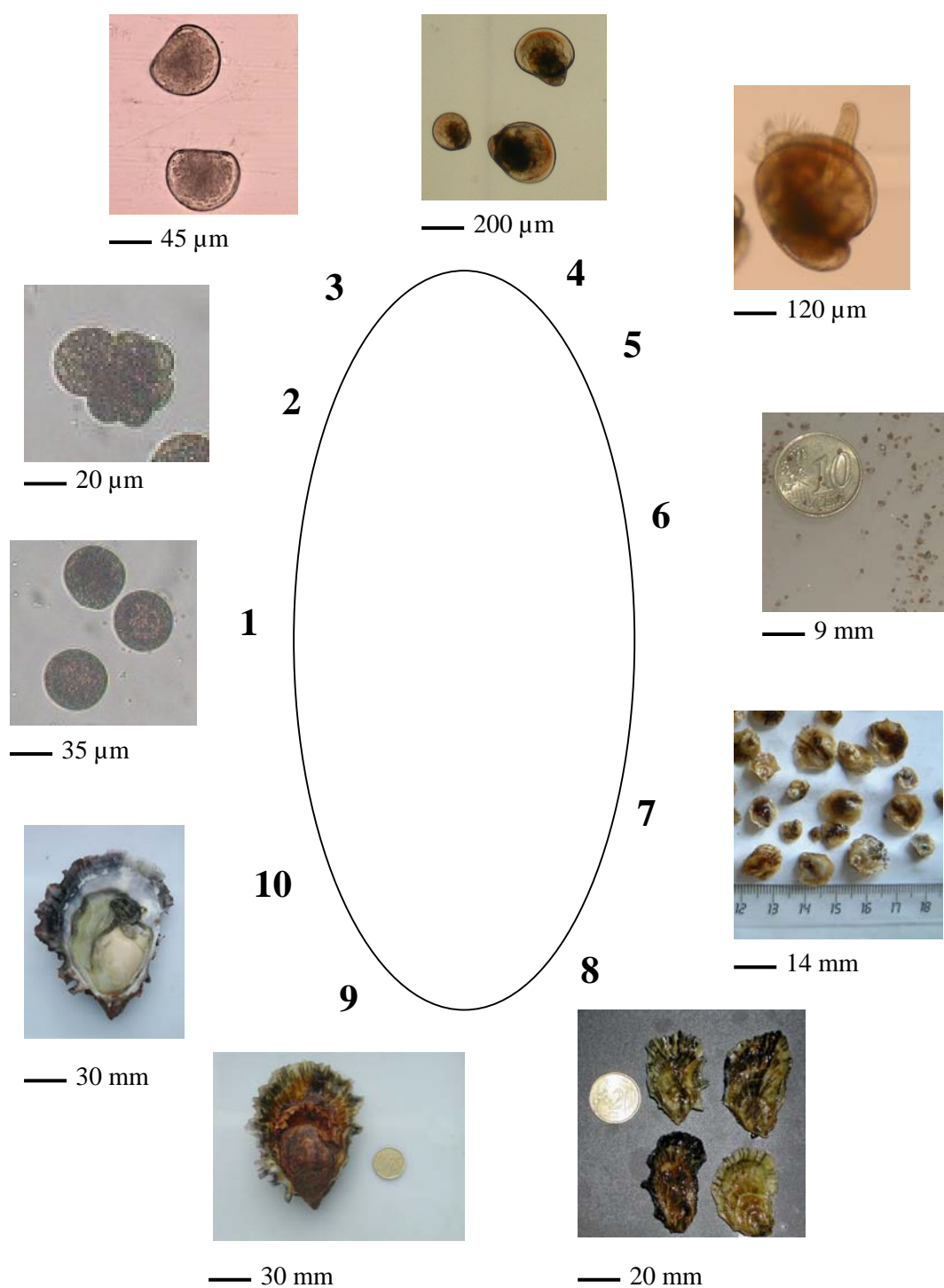
## **1.5 Vie larvaire**

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la fécondation des ovules par les spermatozoïdes (Figure 3, Photo 1) se produit dans la mer, au gré des courants et des rencontres. Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula (Figure 3, Photo 2), puis trochophore pour obtenir, 24 heures après la fécondation, une larve véligère en forme de D dont la taille est de 70  $\mu\text{m}$  (Figure 3, Photo 3). A ce stade, la larve possède une coquille à deux valves (Prodissochonche I) et un velum, organe de nutrition et de locomotion. La forme de ces larves évolue parallèlement à leur croissance avec l'apparition d'une extension en forme de crochet qui correspond à l'umbo environ 10 jours après la fécondation, vers 150  $\mu\text{m}$  (Figure 3, Photo 4). Quelques jours avant la fin de la vie larvaire, l'organe sensoriel principal apparaît sous forme d'un point noir donnant à ce stade le nom de larve oeuillée. Lorsque la larve atteint une taille comprise entre 300 et 380  $\mu\text{m}$ , un pied se développe, permettant à la larve pédivéligère (Figure 3, Photo 5) qui se déplace toujours grâce à son velum de rechercher un substrat sur lequel elle va se fixer. Une goutte de ciment rapidement sécrétée colle définitivement l'huître sur le substrat. La métamorphose s'achève par la disparition du pied et du velum et donne place à une huître juvénile aussi appelée naissain (Figure 3, Photo 6). La durée de la vie larvaire est sous la dépendance principale de la température, elle varie généralement entre 15 et 28 jours (Barnabé, 1985 ; Dégremont, 2003).

## **1.6 Importance économique**

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, a été introduite en France à partir de 1966 pour testage (Grizel et Héral, 1991) et a finalement remplacé l'huître portugaise *Crassostrea angulata* à partir des années 1970 suite à deux maladies d'origine virale (Comps et Duthoit, 1976 ; Comps, 1983) pour soutenir les exploitations ostréicoles. *C. gigas* est très importante d'un point de vue économique. En effet, la France est le quatrième producteur mondial avec un peu plus de 126000 tonnes en 2001 (FAO, 2003). La production française d'huîtres est constituée à 98% par la culture de l'huître creuse *C. gigas*, le reste correspondant à la production de l'huître plate *Ostrea edulis*. En 2003, la région Poitou-Charentes a produit 38000 tonnes d'huîtres creuses (CNC, 2004).





**Figure 3 : Cycle de vie de l'huître creuse (Dégremont, 2003).** (1) Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). (2) Embryon stade morula (2-3 heures). (3) Larves D (24 heures). (4) Larves véligères umbonées (14 jours). (5) Larve pédivéligère (18 jours). (6) Naissains post-fixation (1 mois). (7) Naissains (2 mois). (8) Naissains (6 mois). (9) Adulte (10 mois). (10) Géniteur mature (10 mois). *Nb : l'âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole, mais pas pour des huîtres du milieu naturel.*

### **1.7    Mortalités estivales**

Malgré une très bonne implantation pour une espèce introduite, des mortalités ont été observées massivement chez l'espèce *Crassostrea gigas*. En France, l'apparition de mortalités estivales chez *C. gigas* a été signalée dès son introduction dans les années 1970-1971 (Maurer et Comps, 1986). De nombreuses études ont montré qu'un seul facteur ne permet pas d'expliquer ces mortalités estivales. De nombreux paramètres sont donc impliqués dans les mortalités estivales, et plusieurs facteurs peuvent être concomitants à l'apparition de ces mortalités. Ainsi, les facteurs environnementaux (trophique, physico-chimique, toxique), l'aspect zootechnique (pratiques culturales), le patrimoine génétique, l'état physiologique et le rôle des agents infectieux constituent un ensemble qui détermine la survie des huîtres en élevage (Dégremont, 2003).

### **1.8    Espèce sentinelle**

Par ailleurs, considérant plusieurs critères biologiques et écotoxicologiques comme leur mode de vie sédimentaire et leur mode de nutrition par filtration, les huîtres sont considérées comme des espèces sentinelles d'écosystèmes côtiers anthropisés. En effet, elles sont utilisées comme biomarqueurs afin de mesurer le degré de pollution environnementale à cause de leur capacité à bioaccumuler dans leurs tissus de fortes teneurs en métaux lourds par filtration de l'eau. De plus, leur sédentarité leur interdit toute possibilité de fuite face à une pollution chronique ou soudaine.

L'huître creuse *C. gigas* a donc été choisie comme modèle d'étude pour toutes ces raisons et en particulier pour son importance économique au niveau du bassin de Marennes-Oléron.

## **2 L'aneuploïdie**

### **2.1 Définition et origine**

L'aneuploïdie est un phénomène cytologique qui peut être défini par l'existence de plus de deux chromosomes homologues par paire chromosomique (hyperdiploïdie) ou par l'absence d'un ou des deux chromosomes dans une paire d'homologues (hypodiploïdie).

Dans le cas d'une disjonction normale, les chromatides d'un chromosome se séparent à chaque pôle cellulaire pendant la division mitotique, mais parfois, une mauvaise ségrégation chromosomique peut se produire et amener à l'observation du phénomène de l'aneuploïdie. La non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose est l'origine principale de l'aneuploïdie (Bond et Chandley, 1983 ; Martin et Rademaker, 1990). Toutefois, deux processus classiques amènent à l'aneuploïdie (Seoane *et al.*, 2000 ; Kirsch-Volders *et al.*, 2002) :

- La non-disjonction : quand les chromatides d'un chromosome ne se séparent pas correctement et ainsi, le chromosome entier migre à un seul pôle. Cette ségrégation anormale va produire deux cellules descendantes aneuploïdes. Une des cellules va avoir un chromosome supplémentaire et est appelée cellule hyperploïde (ex : trisomie  $2n + 1$  pendant la mitose ou disomie  $n + 1$  pendant la méiose). L'autre cellule va avoir un chromosome en moins et est appelée cellule hypoploïde (ex : monosomie  $2n - 1$  pendant la mitose ou nullisomie  $n - 1$  pendant la méiose).
- La perte de chromosomes : quand un chromosome ou une chromatide reste en arrière, à l'équateur, et ne migre pas au pôle correspondant. C'est le phénomène de retard dans l'ascension anaphasique. Dans le premier cas, deux cellules sœurs hypoploïdes vont être produites. Dans le second cas, une cellule sera diploïde et l'autre hypoploïde.

D'autres mécanismes peuvent amener à l'aneuploïdie (Kirsch-Volders *et al.*, 2002) :

- La non conjonction : quand des chromosomes homologues ne s'apparient pas.
- La mauvaise division du centromère : quand une mauvaise séparation des chromatides sœurs se produit au cours de la première division méiotique.

- L'extra-réplication d'un chromosome : quand une erreur de réplication d'un chromosome se produit à un moment de la méiose, ainsi, une extra-copie d'un chromosome est générée.

Ainsi, à la différence des altérations chromosomiques structurales (telles que délétions, duplications, inversions et translocations), les aberrations numériques sont habituellement causées par des dommages infligés sur l'appareil microtubulaire menant à la perte ou au gain de chromosomes durant la division cellulaire (Dixon et Wilson, 2000).

## 2.2 Chez les mollusques bivalves

L'aneuploïdie a été étudiée au niveau embryonnaire, larvaire ou au stade adulte chez de nombreux mollusques (Tableau 1). Le pourcentage d'aneuploïdie représente le pourcentage de cellules métaphasiques ayant un nombre anormal de chromosomes.

**Tableau 1 : Etudes de l'aneuploïdie réalisées chez divers mollusques.**

Famille	Nom scientifique	Nom commun	Références
OSTREIDAE	<i>Crassostrea gigas</i>	Huître creuse du Pacifique	Thiriot-Quiévreux <i>et al.</i> , 1988, 1992 ; Guo <i>et al.</i> , 1992 ; Zouros <i>et al.</i> , 1996 ; Wang <i>et al.</i> , 1999 ; Leitão <i>et al.</i> , 2001a, b et c
	<i>Ostrea edulis</i>	Huître plate européenne	Thiriot-Quiévreux, 1986
	<i>Ostrea angasi</i>	Huître plate australienne	Li et Havenhand, 1997
PTERIIDAE	<i>Pinctada fucata martensii</i>	Huître perlière japonaise	Komaru et Wada, 1994
MYTILIDAE	<i>Mytilus edulis</i>	Moule bleue commune	Dixon, 1982
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule de Méditerranée	Martínez-Expósito <i>et al.</i> , 1992
PECTINIDAE	<i>Chlamys farreri</i>	Pétoncle	Yang <i>et al.</i> , 2000
MACTRIDAE	<i>Mulinia lateralis</i>	Maître d'Amérique nain	Wada <i>et al.</i> , 1990

Chez les moules, des taux d'aneuploïdie plus ou moins élevés ont déjà été décrits. Ahmed et Sparks (1970) ont en effet observé sur des œufs et embryons de *Mytilus edulis* et *Mytilus californianus* ( $2n=28$ ) 5 à 10% de mitoses à nombre chromosomique anormal (27-30). De plus, Dixon (1982) a décrit 8% d'embryons aneuploïdes chez *M. edulis* dans une zone non polluée et 26% dans une zone polluée tandis que Martínez-Expósito *et al.* (1992) ont observé des niveaux d'aneuploïdie de 23 à 32% sur des populations naturelles de *Mytilus galloprovincialis*. Pour d'autres familles de bivalves, des cas de métaphases aneuploïdes ont également été rapportés sur des œufs et des embryons mais sans précision quantitative chez

les Ostreidae (Ahmed et Sparks, 1967 ; Longwell *et al.*, 1967) et chez les Pectinidae (Beaumont et Gruffydd, 1974).

Des cellules aneuploïdes (hypodiploïdie) ont aussi été décrites chez des juvéniles de Mytilidae et d'Ostreidae (Thiriot-Quévieux et Ayraud, 1982 ; Thiriot-Quévieux, 1984a). Par exemple, le pourcentage total d'aneuploïdie a varié de 12 à 34% chez des juvéniles d'*Ostrea edulis*, de 9 à 26% chez des juvéniles de *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quévieux, 1986). Un taux d'aneuploïdie moyen de 7,62% a aussi été observé chez des adultes d'*Ostrea angasi* (Li et Havenhand, 1997). Ce phénomène est donc présent à tous les stades de développement et la proportion de cellules aneuploïdes dans les tissus somatiques d'huîtres diffère substantiellement entre les individus. Cette différence de pourcentage d'aneuploïdie peut en partie être expliquée par des taux de croissance différents. En effet, une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *C. gigas* (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitão *et al.*, 2001a) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). Le pourcentage d'aneuploïdie entre les animaux à croissance rapide et ceux à croissance lente a varié entre 5 et 22% (Leitão *et al.*, 2001a). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de l'aneuploïdie a été émise (Leitão *et al.*, 2001b) et il existerait aussi une perte préférentielle de certains chromosomes (dans les paires 1, 5, 9 et 10) dans les cellules aneuploïdes (Leitão *et al.*, 2001c).

L'aneuploïdie a aussi été observée chez des huîtres *C. gigas* triploïdes et tétraploïdes (Guo et Allen, 1994 ; Wang *et al.*, 1999). En effet, Wang *et al.* (1999) ont montré que les méthodes pour produire des triploïdes peuvent générer des aneuploïdes (20%). De plus, chez les pétoncles *Chlamys farreri* triploïdes et tétraploïdes, au stade embryon, une variation de 5 à 32% du taux d'aneuploïdie a déjà été observée (Yang *et al.*, 2000). Durant la première semaine de développement, une forte mortalité est apparue qui serait une conséquence directe des forts taux d'aneuploïdie observés (Yang *et al.*, 2000). Selon ces auteurs, un trop fort taux d'aneuploïdie entraînerait donc la mort de l'organisme.

### **2.3 Induction chimique**

L'aneuploïdie peut survenir spontanément, mais elle peut être également due à une exposition à des agents génotoxiques d'origine naturelle ou d'origine anthropique. Différentes méthodes sont utilisées pour étudier l'aneuploïdie induite chimiquement :

- Le comptage chromosomique dans des lignées cellulaires diploïdes (Danford, 1984, 1985 ; Dulout et Natarajan, 1987).
- L'hybridation *in situ* par fluorescence avec des sondes pour les chromosomes entiers (Van Diemen *et al.*, 1995 ; Dulout *et al.*, 1996 ; Natarajan *et al.*, 1996).
- La coloration de kinétochores dans le test « cytokinesis-blocked micronucleus » (Eastmond et Tucker, 1989 ; Lynch et Parry, 1993, Kirsch-Volders *et al.*, 1997 ; Thompson et Perry, 1988).
- L'hybridation *in situ* avec sondes d'ADN spécifiques du centromère, suivie par une coloration par immunofluorescence (Eastmond et Pinkel, 1990 ; Farooqi *et al.*, 1993).
- L'analyse anaphase-télophase (Nichols *et al.*, 1972 ; Dulout et Olivero, 1984).

### **3 Pollution marine**

#### **3.1 Sources de pollution**

Selon la définition donnée par le GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) dans le cas particulier de l'environnement marin, le terme de pollution désigne l'introduction directe ou indirecte par l'homme de substances ou d'énergie dans le milieu marin lorsqu'elle a, ou peut avoir, des effets nuisibles. Le terme de polluant est donc associé à l'apparition dans le milieu d'effets délétères.

Actuellement, la pollution aquatique est devenue une préoccupation du fait de l'observation de conséquences défavorables sur les écosystèmes et les organismes. Malgré cette prise de conscience, la dégradation de l'environnement marin continue à s'intensifier. L'histoire de la pollution aquatique remonte au tout début de l'histoire de la civilisation humaine. En effet, la production et les émissions de polluants sont souvent dérivées des activités humaines, telles que 1) l'agriculture (ex : les fertilisants, pesticides et produits agrochimiques), 2) l'industrie (ex : les métaux lourds, les éléments traces et les composés organiques), 3) l'urbanisme (ex : agents pathogènes, substances organiques, métaux lourds et éléments traces contenus dans les eaux usées), 4) le tourisme (ex : débris plastiques sur les côtes), etc... Les sources de pollution de l'environnement marin sont donc multiples. Elles englobent aussi 1) les sédiments sur lesquels divers polluants peuvent s'adsorber, 2) l'eutrophisation qui peut entraîner d'importants changements dans la composition des

communautés marines, et les blooms algaux qui peuvent être toxiques vis-à-vis des autres organismes aquatiques et des humains, 3) les activités aquacoles qui peuvent décharger des effluents riches en agents polluants et 4) la pollution biologique (espèces introduites) qui peut causer des problèmes. Ces divers polluants et sources de pollution peuvent avoir des impacts sur la physiologie, la reproduction, le système immunitaire, le système endocrinien des organismes, des effets tératogènes, etc... (revue : Islam et Tanaka, 2004).

### **3.2 Etat des lieux dans le bassin de Marennes-Oléron**

L'évaluation de la qualité chimique du bassin de Marennes-Oléron est réalisée par le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO), créé en 1972 par le Ministère chargé de l'Environnement et géré par l'IFREMER. Il a pour objectif principal « l'évaluation des niveaux et tendances des polluants et des paramètres généraux de la qualité du milieu marin, notamment sur l'eau, la matière vivante et le sédiment. La surveillance dans les eaux littorales s'effectue essentiellement dans les sites où des apports d'eau douce importants influent notablement sur la qualité du milieu marin » (Code permanent de l'environnement et des nuisances). Les résultats obtenus dans le cadre du RNO qui utilise les huîtres et les moules comme espèces bioindicatrices, montrent clairement que le littoral Picto-Charentais est soumis à une pollution chronique par des micropolluants chimiques et, notamment, par les métaux lourds.

Une étude réalisée sur une zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron a montré que les contaminants les plus « préoccupants » sont le cadmium, le plomb et les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) car ils présentent dans certaines espèces de fortes concentrations pouvant dépasser ou approcher les seuils réglementaires. Les contaminants qualifiés de « non préoccupants » sont le cuivre, le zinc et les PCB (polychlorobiphényles) dont les concentrations restent globalement faibles mais néanmoins supérieures au « bruit de fond ». Le mercure et le lindane, bien que présents dans toutes les espèces analysées, étaient en faibles quantités et ne semblent pas poser de problèmes environnementaux dans la zone étudiée (Miramand *et al.*, 2002).

Une meilleure connaissance des impacts des polluants vis-à-vis des organismes et des écosystèmes est importante. Le contrôle de la pollution aquatique est une priorité pour le développement durable et la conservation des ressources aquatiques. En particulier, la détermination de l'effet génotoxique des polluants dans l'environnement marin est devenue

une nécessité principale pour la protection de cet écosystème. Deux sources de pollution différentes, un pesticide (l'atrazine) et un métal lourd (le cadmium) ont donc été choisies pour évaluer cet effet chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* car ces deux produits chimiques étaient très présents sur le bassin de Marennes-Oléron et des propriétés génotoxiques leur étaient déjà connues.

## **4 Les pesticides**

### **4.1 Définition, utilisation**

Les pesticides sont définis comme étant des substances destinées à lutter contre les parasites au sens large, c'est-à-dire en fait contre des organismes « indésirables ». Ils regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifique, tels que herbicides, fongicides et insecticides, qui sont les trois plus importants types de produits utilisés.

En France, les pesticides appelés aussi produits phytosanitaires, sont utilisés principalement (à 90%) en agriculture. D'un point de vue économique, l'utilisation de pesticides apparaît bénéfique : en l'absence de traitements, les pertes dues aux dégâts sur les cultures seraient quatre fois plus importantes (Collet, 1988). Les autres utilisations sont liées aux industries (bois, textile, agro-alimentaire) ou aux traitements des voies ferrées, routes, étangs.

L'utilisation de substances de synthèse telles que les pesticides pose cependant des problèmes en matière de santé publique et de dommages sur les écosystèmes naturels. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être *a priori* considéré comme étant inoffensif. Les préoccupations concernant les effets des pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de très nombreux organismes.

### **4.2 Les triazines : famille d'herbicides**

Les herbicides de la famille des triazines sont principalement utilisés sur les cultures céréalières ; leur taux d'application varie de 0,25 à 60 kg ha<sup>-1</sup> (Smith *et al.*, 1982).



Les triazines, et l'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isoprpyl-amino-s-triazine) en particulier, sont les principaux facteurs ayant augmenté la production de maïs aux Etats-Unis dès les années 1960. L'atrazine est apparue dès 1958 (Stevens *et al.*, 1991) et est très utilisée mondialement. Son usage est toutefois interdit ou limité dans plusieurs pays européens (Allemagne, Italie et France). En effet, en France, auparavant, la dose d'atrazine était limitée à 1000 g ha<sup>-1</sup> en zone agricole et son usage était interdit en zone non agricole (Coirault, 1999). Depuis le 30 septembre 2003, son utilisation est totalement interdite en France.

Les données de la littérature sur la demie vie de l'atrazine dans les sols agricoles montrent une grande variabilité (entre 37 jours et 3 à 5 ans), dépendant de la composition du sol (argiles ou sable, teneur en matière organique) et de paramètres physico-chimiques tels que humidité, température et pH (Jones *et al.*, 1982).

### **4.3 Transport dans le milieu aquatique**

L'intensification de l'activité agricole entraîne une utilisation de produits phytosanitaires qui par lessivage et érosion des sols sont susceptibles d'être transportés vers le milieu aquatique. Ce sont les canaux de drainage qui constituent la voie d'entrée de l'atrazine dans le milieu marin. Les niveaux de concentrations de l'atrazine sont plus élevés en mai, juin et juillet suivant l'application printanière des traitements sur les cultures, indiquant un transport rapide de ce produit des zones d'épandage vers le milieu aquatique (Solomon *et al.*, 1996 ; Eisler, 1989). De plus, les événements pluvieux et leur intensité ont aussi une influence sur la quantité d'atrazine entraînée par érosion et/ou ruissellement des terres. Ainsi, les relations temporelles existant entre l'épandage et l'arrivée de ce contaminant en milieu aquatique sont fonction de la proximité des cultures et des canaux recevant les eaux de lessivage des sols (Munschy, 1995).

Toutefois, l'atrazine est présente en dehors de la période d'épandage dans les zones estuarienne et marine côtière, donc cela montre que ce produit est rémanent dans les sols pour être présent d'une année à l'autre et qu'il est mobile. Il est aussi persistant (Munschy, 1995). De plus, dans l'eau, les triazines sont pratiquement non affectées par des processus de dégradation microbienne ou hydrolytique (Knuesli *et al.*, 1969 ; Gamble *et al.*, 1983). L'adsorption par les colloïdes est un processus jouant aussi un rôle important dans les mécanismes de transport de l'atrazine vers les zones côtières (Means *et al.*, 1983).

---

A Chesapeake Bay (MD, Etats-Unis), des concentrations aussi élevées que  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  ont été rapportées (Huber, 1993 ; Kemp *et al.*, 1985). De plus, De Noyelles *et al.* (1982) ont rapporté que les taux d'atrazine dans les eaux adjacentes aux champs traités pouvaient atteindre  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  et Kadoum et Mock (1978) ont trouvé des concentrations de  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  dans des sites similaires. Ces concentrations très élevées sont très rares, en général, les concentrations en atrazine excèdent rarement  $20 \mu\text{g l}^{-1}$  dans les cours d'eau (Solomon *et al.*, 1996). En effet, dans l'estuaire d'Elorn en rade de Brest, une valeur pic de seulement  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  a été observée (Thomas et Durand, 1995). De fortes concentrations en atrazine peuvent donc être observées ponctuellement dans le milieu aquatique.

#### **4.4 Contamination du bassin de Marennes-Oléron par les herbicides**

La Charente est le fleuve constituant le principal apport d'herbicides au bassin de Marennes-Oléron. En 2001 et 2002, des études réalisées par Munaron *et al.* (2003, 2004) ont montré que parmi les herbicides recherchés, la Charente apporte jusqu'à 90% de triazines jusqu'à son estuaire, avec, de façon chronique l'atrazine et son principal métabolite, la déséthylatrazine (DEA). La simazine, la terbuthylazine et leurs métabolites ont également été retrouvés mais à des concentrations moindres. Des phényl-urées (diuron, isoproturon et chlortoluron) étaient aussi présentes et au regard des concentrations retrouvées, il apparaît qu'elles sont de plus en plus utilisées. L'acétochlore (famille des chloro-acétanilides) qui représente sans doute le produit de substitution de l'atrazine depuis son interdiction était déjà détecté à des concentrations voisines de celles de l'atrazine en 2002. En 2001, 1400 kg de produits phytosanitaires (toutes matières actives et métabolites confondus) ont été transportés jusqu'à l'estuaire de la Charente, contre 460 kg en 2002. Cette diminution est due à une différence nette dans l'hydrométrie de ces deux années.

En se basant sur le modèle hydrodynamique Mars2D, Munaron *et al.* (2003, 2004) ont montré que hors périodes d'épandage de l'atrazine, les niveaux d'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron étaient relativement faibles et généralement proches de  $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ils ne dépassaient que rarement les  $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (périodes de crues) et pouvaient localement dépasser les  $0,12 \mu\text{g l}^{-1}$  (en mai-juin, lors des périodes d'épandage). Les Figure 4 et Figure 5 représentent la visualisation de l'emprise maximale du panache d'atrazine lors de la modélisation de la crue importante de mai 2001 (jusqu'à  $300 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) lors des étales de haute et basse mer respectivement. Ces figures correspondent au pire cas obtenu durant les deux

années de suivi de Munaron (2004) en ce qui concerne les niveaux d'atrazine présents dans les eaux littorales.

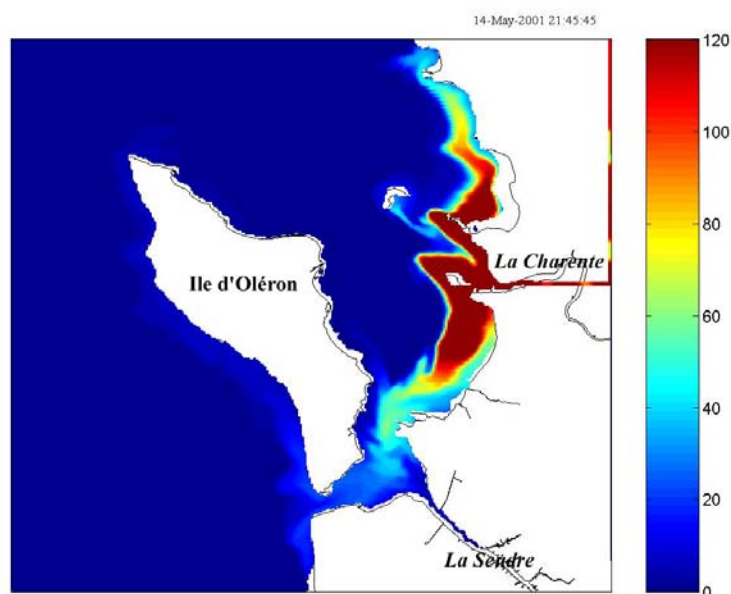


Figure 4 : Visualisation du panache d'atrazine (concentrations en ng l<sup>-1</sup>) dans le bassin de Marennes-Oléron au 14 mai 2001 (étiage de haute mer), d'après la simulation Mars2D du mois de mai 2001 (Munaron, 2004).

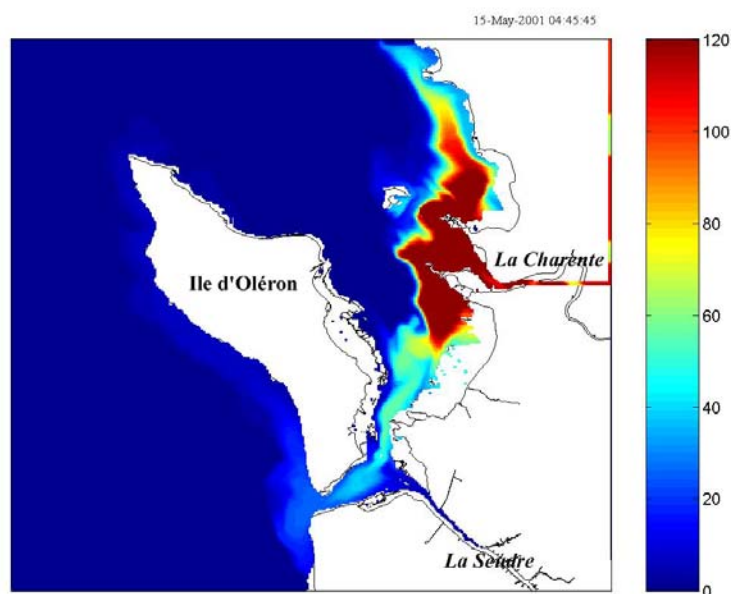


Figure 5 : Visualisation du panache d'atrazine (concentrations en ng l<sup>-1</sup>) dans le bassin de Marennes-Oléron au 15 mai 2001 (étiage de basse mer), d'après la simulation Mars2D du mois de mai 2001 (Munaron, 2004).

En juin 1993, une forte concentration en atrazine ( $7,8 \mu\text{g l}^{-1}$ ) avait été observée au niveau du canal de Grand Garçon (Charente-Maritime) (Munsch, 1995) probablement liée à la prépondérance de culture de maïs sur les marais de Moëze-Brouage (Charente-Maritime) (Figure 6). Ainsi, les périodes d'épandage de l'atrazine correspondraient aux périodes à risque vis-à-vis des apports au bassin de Marennes-Oléron. Lors de ces événements, la dispersion de la zone à fortes concentrations dépendrait étroitement des conditions climatiques (vent et marée) et hydrologiques de la période considérée. Les fortes crues de la Charente auraient pour conséquence de chasser l'atrazine plus loin et plus vite dans le bassin mais aussi de raccourcir la durée de présence des fortes teneurs en atrazine dans le bassin. A l'inverse, en période de faible débit de la Charente, les importantes teneurs en atrazine resteraient confinées dans l'estuaire en raison du va-et-vient dû à la marée et l'exutoire de la Charente serait alimenté plus longtemps par les apports d'atrazine (Munaron *et al.*, 2004).

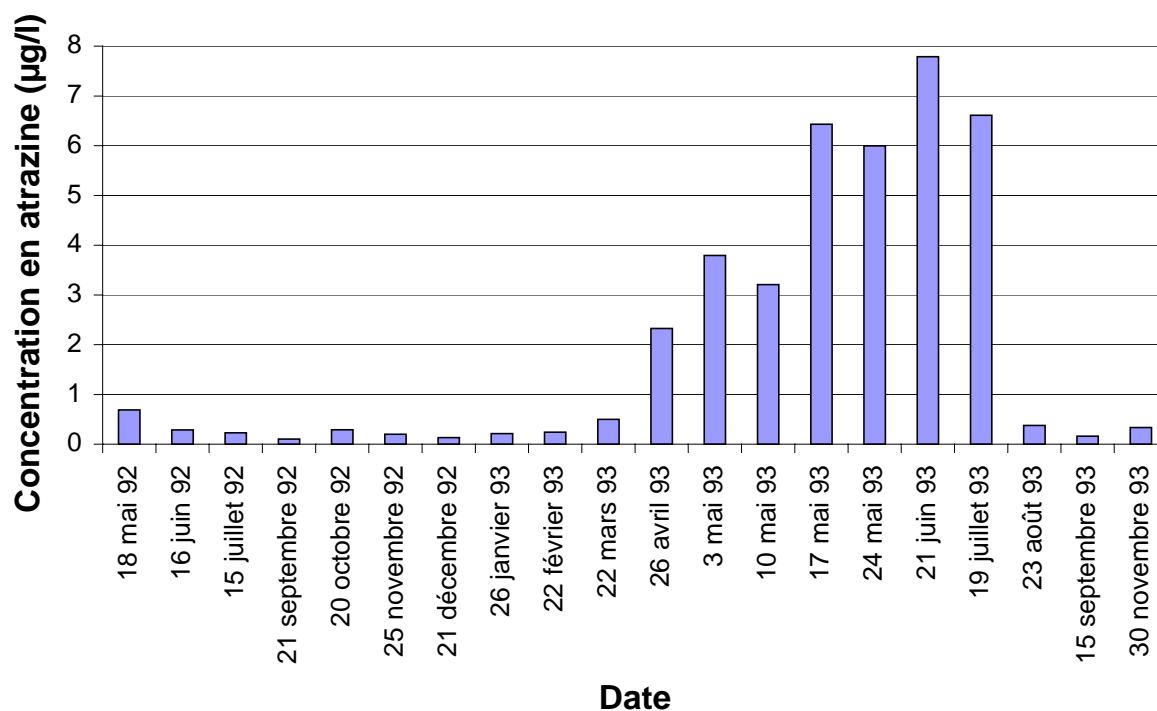


Figure 6 : Variations temporelles de la concentration en atrazine ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) dans le canal de Grand-Garçon (Munsch, 1995).

## **4.5 Bioconcentration**

L'accumulation de l'atrazine dans l'organisme dépend de l'espèce et de la concentration d'atrazine dans l'eau. Celle-ci est corrélée avec le coefficient de partage octanol/eau (Muñoz et Rosés, 2000). Selon Streit (1979), suivant la contamination, l'atrazine accumulée est très rapidement perdue par des invertébrés benthiques quand ils sont introduits dans de l'eau propre, mais aucune autre étude ne fait état d'une observation similaire.

Selon certains auteurs, la bioaccumulation et la biomagnification de l'atrazine sont considérées comme négligeables (Solomon *et al.*, 1996). Toutefois, certains auteurs ont montré une bioconcentration de l'atrazine chez quelques organismes (Tableau 2). Les facteurs de bioconcentration peuvent être assez faibles comme chez les grenouilles, les annélides, les gastéropodes et les poissons ou très élevés comme chez les champignons, les bactéries et les algues.

**Tableau 2 : Facteurs de bioconcentration de l'atrazine chez divers organismes vivants.**

Organisme vivant	Facteur de bioconcentration	Références
Grenouille <i>Rana pipiens</i>	6	Allran et Karasov, 2000
Annélides & Gastéropodes	4 à 7,5	Solomon <i>et al.</i> , 1996
Poissons	0,27 à 25	Solomon <i>et al.</i> , 1996 ; Giovanni, 1996 ; Du Preez et Van Vuren, 1992
Champignons & Bactéries	87 à 132	Solomon <i>et al.</i> , 1996
Algue <i>Cladophora glomerata</i>	29 à 5223	Shelton et Miller, 2002

Les mollusques bivalves accumulent l'atrazine essentiellement en filtrant l'eau (Moraga et Tanguy, 2000), l'atrazine est donc accumulée par les branchies (Gunkel et Streit, 1980). Cependant, la bioaccumulation de l'atrazine chez ces organismes est très peu étudiée. En effet, seule une étude à Chesapeake Bay avait montré que malgré des concentrations d'atrazine dans l'eau de l'ordre de 430 ng l<sup>-1</sup>, l'atrazine n'avait pas été détectée dans les huîtres *Crassostrea virginica* (Lehotay *et al.*, 1998). Les mollusques bivalves doivent donc faiblement bioconcentrer l'atrazine mais sans plusieurs études sur ces organismes, il est difficile de connaître réellement leur capacité à bioaccumuler l'atrazine.

## **5 Toxicité de l'atrazine vis-à-vis des organismes vivants**

La toxicité des pesticides reste toujours très élevée pour les organismes non cibles, plus particulièrement en milieu aquatique. Même s'ils se trouvent fortement dispersés dans ce milieu, ils peuvent toutefois provoquer des effets létaux ou sublétaux.

### **5.1 Toxicité vis-à-vis d'organismes aquatiques (ex : les grenouilles)**

De nombreuses études de toxicité de l'atrazine vis-à-vis des grenouilles ont été réalisées. Une exposition à 21  $\mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine pendant la différenciation sexuelle des têtards de *Xenopus laevis* pourrait réduire significativement la reproduction de ces animaux (Tavera Mendoza *et al.*, 2002). De plus, Hayes *et al.* (2002a) ont montré que l'atrazine ( $\geq 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ) produisait des anomalies gonadiques et induisait l'hermaphrodisme, et enfin démasculinisait les larynx des *X. laevis* mâles exposés ( $\geq 1 \text{ mg l}^{-1}$ ). Par contre, à toutes les doses testées, il n'y a pas eu d'effet ni sur la mortalité ni sur la métamorphose. De même, Diana *et al.* (2000) n'ont observé aucune mortalité sur des têtards de *Hyla versicolor* jusqu'à 2  $\text{mg l}^{-1}$  d'atrazine. Hayes *et al.* (2002b) ont aussi observé que l'atrazine pouvait affecter la différenciation sexuelle chez les grenouilles *Rana pipiens*. En effet, ils ont observé dans le milieu naturel que 10 à 92% des mâles avaient des anomalies gonadiques, un retard de développement et de l'hermaphrodisme. En milieu contrôlé, ils ont obtenu la même réponse en exposant des larves à des concentrations de 0,1 et 25  $\text{mg l}^{-1}$ . Allran et Karasov (2000) n'ont pas non plus montré d'effet ni sur la mortalité ni sur la métamorphose de *R. pipiens* à des concentrations de 20 et 200  $\mu\text{g l}^{-1}$ . De plus, aucun effet sur la mortalité n'a été observé chez des larves de *R. pipiens*, *Rana sylvatica* et *Bufo americanus* exposées jusqu'à 20  $\text{mg l}^{-1}$  (Allran et Karasov, 2001). Howe *et al.* (1998) ont montré que les larves plus âgées d'amphibiens *R. pipiens* et *B. americanus* étaient plus sensibles à l'atrazine que les jeunes larves. Morgan *et al.* (1996) ont montré que l'atrazine était tératogène pour des embryons de *X. laevis* dans les eaux naturelles seulement à des concentrations élevées, non attendues dans les eaux de surface ou souterraines.

## **5.2 Toxicité vis-à-vis du phytoplancton**

Les effets directs des triazines, du fait de leur mode d'action par inhibition de la photosynthèse, sont susceptibles d'intervenir essentiellement sur les végétaux. En effet, l'atrazine inhibe le photosystème II (Moreland, 1980), donc à de fortes concentrations ( $> 100 \mu\text{g l}^{-1}$ ), ce polluant peut causer des effets dramatiques sur la photosynthèse, la croissance, le contenu et la biomasse en chlorophylle de la plupart des producteurs aquatiques (Plumley et Davis, 1980 ; Broackway *et al.*, 1984 ; Kosinski et Merkle, 1984 ; Robert *et al.*, 1986). Cependant, mêmes de faibles taux d'atrazine (de 1 à  $14 \mu\text{g l}^{-1}$ ) ont eu des effets toxiques sur des communautés algales en inhibant la photosynthèse et donc la croissance du phytoplancton par exemple (Hutber *et al.*, 1979 ; De Noyelles *et al.*, 1982 ; Lampert *et al.*, 1989 ; Fletcher, 1990 ; Muñoz *et al.*, 2001). Par contre, une exposition à long terme à  $20 \mu\text{g l}^{-1}$  n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de croissance de *Pavlova* sp. excepté pour un lot sur les 4 étudiés (Pennington et Scott, 2001). Selon les auteurs, la valeur des teneurs en atrazine provoquant une toxicité vis-à-vis du phytoplancton diffère donc considérablement et il semblerait que les effets sublétaux de l'atrazine observés chez les algues phytoplanctoniques pourraient être réversibles et transitoires (Solomon *et al.*, 1996).

## **5.3 Toxicité vis-à-vis des mollusques**

Des travaux ont montré que l'atrazine pouvait entraîner des modifications comportementales chez des gastéropodes d'eau douce *Physa acuta* et *Ancylus fluviatilis* exposés à  $15 \mu\text{g l}^{-1}$ . De plus, des lyses cellulaires sont apparues quand ces animaux ont été exposés à des concentrations en atrazine de  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  pendant 10 jours. Par contre, l'atrazine n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de mortalité et la biomasse de ces organismes (Rosés *et al.*, 1999). Le métabolisme énergétique est également une cible des pesticides. En effet, le métabolisme du gastéropode *Physella acuta* a été affecté suite à une exposition à une concentration d'atrazine de  $14 \mu\text{g l}^{-1}$  (Muñoz *et al.*, 2001). La toxicité de l'atrazine dépend aussi de la durée d'exposition. Par exemple, sur des cellules de la glande digestive de *Pecten maximus in vitro*, une contamination à l'atrazine à  $21,5 \text{ mg l}^{-1}$  est faiblement toxique après 2 heures puis fortement toxique après 48 heures de contact (Le Penneec et Le Penneec, 2001). Par contre, sur l'ensemble des côtes des Etats-Unis, Wade *et al.* (1998) n'ont pas sélectionné

l'atrazine dans leur surveillance du milieu car elle n'était détectée que dans 5% des bivalves échantillonnés.

L'atrazine peut également avoir un effet sur la formation et la croissance de jeunes larves de *Crassostrea gigas* (Robert *et al.*, 1986). Une teneur de 0,5 mg l<sup>-1</sup> représente un seuil au delà duquel la croissance larvaire est anormale. Au delà de 1 mg l<sup>-1</sup>, des mortalités sont apparues dans les élevages larvaires. Toutefois, l'action d'un polluant sur des larves de *C. gigas* et sur la croissance larvaire ne semble pas être sensible avant une semaine d'exposition (His et Robert, 1986). La toxicité de l'atrazine a aussi causé un taux de mortalité approximativement de 60 à 70% à des concentrations de 0,1 et 0,2 mg l<sup>-1</sup> après deux mois d'exposition chez l'huître *C. gigas* adulte (Moraga et Tanguy, 2000). Auffret et Oubella (1997) ont aussi observé des changements modérés dans l'agglomération des hémocytes de *C. gigas* à des concentrations d'atrazine de 10 et 100 µg l<sup>-1</sup>. Par contre, Gagnaire *et al.* (2003) n'ont pas détecté d'effet de l'atrazine sur des paramètres cellulaires tels que l'activité de phagocytose, la viabilité cellulaire, le cycle cellulaire, les activités enzymatiques et la proportion de hyalinocytes chez *C. gigas*. Cependant, une forte concentration d'atrazine (200 mg l<sup>-1</sup>) a induit une augmentation de l'activité peroxidase *in vitro*.

Au bilan, les effets de l'atrazine susceptibles d'affecter les organismes aquatiques sont très variés. Des effets sur la capacité de développement, le potentiel reproducteur, le comportement, le métabolisme, la photosynthèse, la croissance, la mortalité... ont été reportés et montrent des modes d'action de l'atrazine différents selon les organismes.

## **6 L'atrazine et ses conséquences au niveau génétique**

### **6.1 Activité clastogène**

Le terme clastogène est utilisé lorsqu'il y a des dommages chromosomiques structuraux (cassures de chromosomes). Les anomalies chromosomiques structurales sont le résultat de dommages de l'ADN (Savage, 1993). Les conséquences des altérations chromosomiques sont universellement nuisibles et comprennent les anomalies congénitales, réduction de la fertilité et cancer (Hagmar *et al.*, 1994). L'atrazine est classifiée comme un carcinogène humain possible par l'International Agency for Research on Cancer (IARC, 1991)



et The United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1991) donc un risque de santé humaine potentiel peut être associé avec une contamination par cet herbicide (Taets *et al.*, 1998).

Loprieno *et al.* (1980) ont observé des altérations chromosomiques dans des cellules de moelle osseuse de souris exposées à l'atrazine. L'atrazine a aussi un potentiel clastogène dans des cellules d'ovaires de hamster chinois à des concentrations de 148 et 198  $\mu\text{g l}^{-1}$  (concentrations estimées saines par l'US Environmental Protection Agency pour l'eau de boisson) (Biradar et Rayburn, 1995) ainsi qu'avec le taux de contamination le plus fort trouvé dans les eaux de l'Illinois (Taets *et al.*, 1998).

Des résultats contradictoires sur l'effet de l'atrazine ont pourtant été observés dans des cultures de lymphocytes humains. En effet, Yoder *et al.* (1973) ont trouvé une augmentation des altérations chromosomiques dans les cultures de lymphocytes des fermiers exposés à des pesticides, y compris l'atrazine et Lioi *et al.* (1998) ont montré que l'atrazine provoque des échanges de chromatides sœurs et des altérations chromosomiques. Ils ont aussi observé une réduction de l'indice mitotique à de fortes concentrations d'atrazine et une baisse de la croissance cellulaire. Ce résultat est en contradiction avec celui de Kligerman *et al.* (2000) qui n'ont pas observé d'effet aux mêmes concentrations et Ribas *et al.* (1998) qui ont montré un manque d'efficacité de l'atrazine à provoquer des dommages clastogènes dans des lymphocytes humains en culture. Pour eux, l'atrazine est capable de déployer un effet cytotoxique faible.

En ce qui concerne les bivalves, des augmentations significatives dans la fréquence des cellules avec de l'ADN endommagé ont déjà été observées chez des moules *Mytilus edulis* exposées à des contaminants (Steinert *et al.*, 1998).

## **6.2    Activité aneugène**

Le terme aneugène est employé lorsqu'il y a des dommages chromosomiques numériques, c'est-à-dire lorsqu'il y a induction de l'aneuploïdie (perte ou gain de chromosomes). Sous des conditions générales d'utilisation, l'atrazine ne semble pas poser un risque génétique pour les humains (Brusick, 1994). En effet, Ribas *et al.* (1998) ont montré que l'atrazine n'était pas un inducteur efficace de l'aneuploïdie dans les cellules humaines. Cependant, ce produit chimique est capable d'induire l'aneuploïdie chez les champignons

*Aspergillus nidulans* (Bignami *et al.*, 1974) et *Neurospora crassa* (Griffiths, 1979) et chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Murnik et Nash, 1977).

### **6.3    Activité mutagène**

Beaucoup d'herbicides trouvés dans les eaux de surface et/ou souterraines sont mutagènes (capables d'induire une altération du matériel héréditaire). Pourtant, chez les mammifères, l'atrazine n'a pas montré avoir des effets mutagènes (Lossli, 1994) ni avoir un grand potentiel pour des effets génotoxiques/mutagènes *in vivo* (Plewa *et al.*, 1984 ; Dearfield *et al.*, 1993).

Ainsi, l'atrazine est capable d'induire des dommages chromosomiques structuraux et numériques chez divers organismes, mais ce produit chimique ne semble pas induire de mutations.

## **7    Le cadmium**

### **7.1    Sources**

Le cadmium a été découvert en 1817 et sa production industrielle remonte à 1829. Le cadmium est un sous-produit de l'extraction du zinc et accessoirement du plomb (Cossa et Lassus, 1989 ; Miramand *et al.*, 2000).

La production mondiale annuelle est à l'heure actuelle estimée à environ 18000 T an<sup>-1</sup>. En France, nous en utilisons près de 1300 T an<sup>-1</sup> dont : 30% sont destinés à des traitements de surface, 25% sont utilisés comme pigments essentiellement des matières plastiques, 30% servent à la fabrication des piles alcalines, 8% de stabilisants dans les matières plastiques et 7% servent d'usages divers (alliages, industrie nucléaire, chimie, électronique et électrotechnique) (Cossa et Lassus, 1989 ; Miramand *et al.*, 2000). Depuis 1817, près de 500000 T de cadmium ont été extraits. Une grande partie a été disséminée dans l'environnement (*in* Miramand *et al.*, 2000).

## 7.2 Réglementation

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2003, le règlement communautaire N° 466/2001 de la Commission Européenne du 8 mars 2001 a réduit de moitié les teneurs maximales acceptées en cadmium dans les bivalves pour leur consommation. La nouvelle norme est de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec ou bien  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids frais. Dans le bassin de Marennes-Oléron, ce seuil a déjà été dépassé en 1999 et en 2000, à « Les Palles » (embouchure de la Charente) et « Mus de Loup » (embouchure de la Seudre) (Ifremer, 2001) (Figure 7).



Figure 7 : Carte du bassin de Marennes-Oléron (Le Moine, LERPC La Tremblade, modifié).

### **7.3 Transport dans le milieu aquatique**

Le cadmium atteint les milieux aquatiques par la voie atmosphérique ou par lessivage des sols et rejets directs anthropiques (Miramand *et al.*, 2000). En France, les rejets de cadmium dans l'atmosphère se situent entre 10 et 85 T an<sup>-1</sup> et les fleuves, quant à eux, drainent environ 50 T an<sup>-1</sup> de cadmium dont près de la moitié est apportée par la Garonne. L'épandage d'engrais sur les terres agricoles apporte vraisemblablement un minimum de 70 T de cadmium par an dont une partie mineure est lessivée par les pluies et rejoint ainsi les eaux littorales. En effet, une grande partie du cadmium est retenue par les sols et une autre est absorbée par la végétation (Cossa et Lassus, 1989).

Le cadmium d'origine fluviale arrive aux estuaires essentiellement sous forme particulaire et est dissout pendant le transit estuarien, principalement sous l'effet d'une augmentation de la force ionique et de la complexation du cadmium particulaire associé avec les ions Cl<sup>-</sup>. Ainsi, le flux net à l'océan est principalement sous forme dissoute (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1982, 1987 ; Jouanneau *et al.*, 1990 ; Chiffoleau *et al.*, 1994 ; Turner, 1996 ; Kraepiel *et al.*, 1997 ; Zwolsman *et al.*, 1997). En milieu marin, c'est le chlorocomplexe CdCl<sub>2</sub> qui prédomine (Miramand *et al.*, 2000).

### **7.4 Contamination de l'environnement par le cadmium**

La quasi-totalité du cadmium utilisé est disséminée dans l'environnement (Cossa et Lassus, 1989). La contamination environnementale s'effectue à trois niveaux : les eaux, les sédiments et les organismes. Il existe trois catégories d'eaux : les eaux avec des concentrations en cadmium élevées (>100 ng l<sup>-1</sup>) (cas de la Garonne), celles avec des concentrations moyennes (30-100 ng l<sup>-1</sup>) et celles avec des concentrations proches des valeurs naturelles (< 30 ng l<sup>-1</sup>). Selon Thornton (1992), la concentration en cadmium dans le milieu marin est évaluée entre 0,5 et 10 ng l<sup>-1</sup> mais de plus fortes concentrations sont trouvées dans des zones estuariennes polluées. Au niveau des organismes, la Garonne étant très polluée par le cadmium, des concentrations supérieures à 100 µg g<sup>-1</sup> de poids sec chez des huîtres ont été observées entre Royan et Talmont (Boutier, 1984). Au niveau du bassin de Marennes-Oléron, la teneur moyenne était de 6,1 µg g<sup>-1</sup> de poids sec de 1979 à 1985 (Boutier et Chiffoleau, 1986).

### **7.5 Origine du cadmium dans le bassin de Marennes-Oléron**

Le bassin de Marennes-Oléron est soumis à des apports de cadmium provenant du panache de la Gironde. Le cadmium présent dans la Gironde provient de rejets d'une ancienne mine de blende (minerais permettant d'obtenir du zinc). Cette industrie métallurgique était située à Decazeville, dans l'Aveyron, à plus de 300 km en amont, sur le Riou Mort (affluent du Lot), se jetant ensuite dans la Garonne (Boutier *et al.*, 1989 ; Jouanneau *et al.*, 1990). Cette usine, fermée en 1986, a rejeté pendant des décennies de très grandes quantités de cadmium dans la rivière (60 kg par jour) (Boutier *et al.*, 1989). La pollution de l'estuaire de la Gironde se produit par apports de particules contaminées, dus à l'érosion des fonds. Au contact des eaux salées, le cadmium fixé sur les particules se désorbe et passe à l'état dissous. De ce fait, dans le panache de la Gironde, ce métal est majoritairement sous cette forme biodisponible pour les êtres vivants. Les flux sont actuellement estimés de 4 à 5 tonnes par an, dont environ 500 kg pénétreraient par le jeu des courants dans le bassin de Marennes-Oléron (Boutier, com. pers. in Miramand *et al.*, 1999).

### **7.6 Bioconcentration**

Chez les mollusques, le facteur de concentration du cadmium atteint communément  $10^4$  (Cossa et Lassus, 1989). Frazier (1979) a rapporté des concentrations de cadmium de 0,01 à 140  $\mu\text{g g}^{-1}$  (poids frais) dans les tissus mous, les plus fortes concentrations se rencontrant chez la patelle, le pétoncle et l'huître. Les mollusques bioconcentrent donc fortement le cadmium. Par contre, il n'y a pas de biomagnification du cadmium le long des réseaux trophiques. Au contraire, les concentrations diminuent avec l'augmentation du niveau trophique (Amiard-Triquet *et al.*, 1980).

La bioaccumulation des métaux chez les organismes aquatiques filtreurs peut se faire selon 3 voies : directement par l'eau, par l'intermédiaire de la nourriture phytoplanctonique et par les particules inertes du seston riches en éléments métalliques (Amiard-Triquet et Amiard, 1980). En milieu marin, l'eau constitue la voie préférentielle de bioconcentration (Cossa et Lassus, 1989). Des huîtres *Crassostrea gigas* ont prélevé 5,5% du cadmium total contenu dans *Skeletonema costatum* ou *Tetraselmis suecica* au bout de 10 jours de contamination

(Nassiri *et al.*, 1997) et 9 et 20% respectivement après 21 jours d'exposition à 20  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Ettajani *et al.*, 2001).

Comme les huîtres sont des filtreurs sessiles, les forts taux de métaux sont accumulés dans leurs tissus mous (Chan *et al.*, 1999) et principalement dans deux organes : l'hépatopancréas et le rein (Cossa et Lassus, 1989) mais aussi dans les lysosomes des branchies et dans la glande digestive (Jeantet *et al.*, 1985). De plus, la concentration en métal d'un organisme est le résultat du processus « absorption-stockage-excrétion » (Cossa et Lassus, 1989).

### **7.7 Facteurs influençant les taux de cadmium chez les organismes**

La bioaccumulation des métaux lourds dont le cadmium, quel que soit l'organisme considéré, est sous la dépendance directe de sa physiologie (Martoja et Elkaïm, 1980) elle même conditionnée par un ensemble de facteurs abiotiques comme la salinité, température, turbidité, saison, ... et de facteurs biotiques tels que la taille, l'âge, le sexe... (Cossa *et al.*, 1979 ; Simpson, 1979 ; Métayer *et al.*, 1982 ; Rainbow *et al.*, 1990).

En ce qui concerne les facteurs abiotiques, Pigeot (2001) a montré un effet site en relation avec la source cadmiée (gradient positif dans le sens Nord-Sud du bassin de Marennes-Oléron), un effet immersion et un effet saison. Plusieurs hypothèses ont été résumées par Lewis et Cave (1982) pour expliquer les fluctuations saisonnières des concentrations : changements de l'activité biologique des mollusques, augmentation de la biodisponibilité de nourriture phytoplanctonique résultant de fortes températures et de plus longs jours au printemps (plus de luminosité) et changements de la biodisponibilité des métaux induits par une montée des concentrations de métabolites dans l'eau. D'autres auteurs (Bryan, 1973 ; Frazier, 1975 ; Phillips, 1976 ; Majori *et al.*, 1978 ; Boyden et Phillips, 1981 ; Ritz *et al.*, 1982 ; Amiard *et al.*, 1986 ; Phelps et Hetzel, 1987 ; Pigeot, 2001) attribuent les variations saisonnières à la taille et au poids des organismes en relation avec la maturité sexuelle.

La salinité apparaît être un facteur naturel influençant les taux de métaux (Phelps *et al.*, 1985 ; Amiard-Triquet *et al.*, 1991 ; Roesijadi, 1994). En effet, Vicente *et al.* (1988) ont montré qu'une baisse de salinité augmentait la prise du cadmium par les bivalves. Ils ont aussi observé qu'une augmentation de la température entraînait une augmentation des taux de cadmium chez ces organismes. D'autres auteurs, Zarogian et Cheer (1976) ont rapporté que

l'accumulation du cadmium dans un environnement contaminé expérimentalement n'apparaissait pas tant que la température de l'eau n'était pas plus élevée que 15°C.

En ce qui concerne les facteurs biotiques, Pigeot (2001) n'a pas mis en évidence un effet régime alimentaire mais il a pu montrer un effet espèce et un effet taxon, notamment au niveau de l'ordre chez les mollusques bivalves. Il a également mis en évidence l'influence de la taille du coquillage sur la teneur en éléments traces de ce dernier et a montré une bioaccumulation différenciée du cadmium selon les organes (branchies, gonade, muscle et glande digestive).

Amiard *et al.* (1994) ont établi des relations entre les concentrations métalliques, la taille, le poids des individus et leur nourriture selon la saison. Ainsi, en période estivale, la quantité de nourriture fournie et la taille des individus sont corrélées positivement avec le poids moyen des individus et les quantités de métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) présentes dans les tissus mous des jeunes huîtres *Crassostrea gigas*. Par contre, la densité des individus dans l'élevage est corrélée négativement avec le poids des individus et les quantités métalliques incorporées. En période hivernale, la densité de la population est corrélée négativement avec le poids mais nullement avec les quantités ou les concentrations métalliques. L'augmentation de la nourriture fournie et de la taille des individus est accompagnée d'une augmentation du poids individuel et d'une diminution des concentrations métalliques.

## **7.8 Mécanismes de détoxification**

Les métaux sont isolés du milieu cellulaire et rendus chimiquement inertes vis-à-vis des fonctions cellulaires chez les bivalves. Ainsi, les mollusques bivalves peuvent survivre dans des milieux fortement contaminés par les métaux lourds (Jeantet *et al.*, 1985 ; Phillips, 1990). Cette adaptation génétique ou physiologique implique le développement de mécanismes de détoxification. Ils se mettent en marche pour des teneurs de quelques  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Marchand et Kantin, 1997). Ils agissent via la liaison du cadmium avec des protéines métallothionéines. Ce mécanisme a été démontré chez les moules (*Mytilus edulis* et/ou *Mytilus galloprovincialis*) (Nolan et Duke, 1983 ; Frazier, 1986 ; Pavicic *et al.*, 1991 ; Bebianno et Langston, 1991, 1992) et chez les huîtres (*Crassostrea gigas* ou *Crassostrea virginica*) (Siewicki *et al.*, 1983 ; Gillot *et al.*, 1989 ; Roesijadi *et al.*, 1989). Il existe plusieurs autres types de réponses à la contamination métallique chez les Invertébrés : la mobilisation d'un ensemble de ligands cytosolubles (George, 1990 ; Cosson *et al.*, 1991) et la

séquestration du métal dans les lysosomes ou granules (Brown, 1982 ; George, 1990 ; Viarengo et Nott, 1993).

Chan *et al.* (1999) ont montré qu'un transfert d'huîtres *C. gigas* de site pollué vers des sites non pollués induisait une dépuración du cadmium à 60% au bout de 60 jours.

## **8 Toxicité du cadmium vis-à-vis des organismes vivants**

Contrairement à de nombreux métaux (cuivre, zinc, fer...), le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants (Chiffolleau *et al.*, 1999). Par contre, le cadmium est un xénobiotique placé sur la liste noire de la plupart des conventions internationales de pollutions selon sa cytotoxicité, génotoxicité, son potentiel de bioaccumulation et sa persistance (Taylor, 1983), spécialement dans les organismes filtreurs qui sont connus pour accumuler de fortes concentrations de métaux lourds dans leurs tissus (Viarengo *et al.*, 1993).

### **8.1 Toxicité vis-à-vis de l'homme**

Chez l'homme, le phénomène de toxicité aiguë du cadmium est connu depuis 1950 sous le nom de syndrome d'Itaï-Itaï défini par l'association d'une insuffisance rénale avec ostéoporose (démínéralisation et fragilisation des os) et ostéomalacie (démínéralisation et déformation des os). Son nom provient des cris poussés par les malades, riziculteurs âgés de 40 à 60 ans, du bassin de la rivière Jintsu au Japon, intoxiqués par l'eau de boisson et la consommation de riz contaminés par les rejets d'une usine de métaux non ferreux. Depuis cet épisode, aucun autre cas de cette pathologie n'a été observé dans le monde (Chiffolleau *et al.*, 1999).

Le cadmium est un poison cumulatif, on estime que 5% du cadmium ingéré par l'homme est réellement absorbé, un tiers du cadmium total de l'organisme se concentre dans les reins avec une demie vie biologique de 20 ans. Les premiers signes d'intoxication humaine (dans le cas d'un empoisonnement chronique) consistent en un dysfonctionnement rénal, se traduisant par une décroissance de l'absorption tubulaire des protéines. La concentration critique dans le cortex rénal serait de 200  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec. Cette concentration serait



---

atteinte après 50 ans d'ingestion de 200 à 400  $\mu\text{g}$  de cadmium par jour (Chiffolleau *et al.*, 1999).

## **8.2 Toxicité vis-à-vis d'organismes aquatiques**

La toxicité du cadmium observée chez de nombreux organismes aquatiques porte surtout sur de nombreux paramètres physiologiques qui dépendent des espèces testées et des conditions expérimentales (Chiffolleau *et al.*, 1999). Le cadmium peut réduire la survie d'organismes tels que l'amphipode *Gammarus fossarum* et même entraîner leur mort lorsqu'ils sont exposés à une concentration de cadmium de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (Abel et Barlocher, 1988). Le cadmium peut aussi stimuler la métamorphose de larves du polychète euryhalin *Capitella* sp. à des concentrations en cadmium externes de  $1 - 2 \text{ mg l}^{-1}$  (Pechenik *et al.*, 2001). Chez les oursins, le cadmium, à des concentrations du sédiment solide supérieures ou égales à  $2 \text{ g l}^{-1}$ , peut diminuer le succès de l'embryogenèse de *Paracentrotus lividus* (Amiard-Triquet *et al.*, 1998) et peut aussi affaiblir le succès reproducteur de *Strongylocentrotus intermedius* à des concentrations de cadmium comprises entre  $0,05$  et  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  à travers une diminution de la qualité des gamètes (Au *et al.*, 2001). Le cadmium peut aussi entraîner la mort de différents organismes. Ramachandran *et al.* (1997) ont trouvé des  $\text{DL}_{50}$  à 48H de  $0,312 \mu\text{g ml}^{-1}$  chez des larves d'oursin *Diadema setosum* (malformations) et de  $0,078 \mu\text{g ml}^{-1}$  chez des larves de crabe *Scylla seratta* (mortalités). De plus, une mortalité importante (40%) a été observée chez des larves de copépode *Tigriopus brevicornis* après 8 jours d'exposition à des sédiments pollués (Amiard-Triquet *et al.*, 1998).

## **8.3 Toxicité vis-à-vis du phytoplancton**

En général, les plantes sont beaucoup moins susceptibles que les animaux à la pollution au cadmium (Solbe et Cooper, 1976 ; Ashanullah *et al.*, 1981). Par exemple, la croissance d'algues marines variées n'a pas été influencée jusqu'à des concentrations de  $6 \text{ mg l}^{-1}$  (Wikfors et Ukeles, 1982). Une dose de  $0,5$  à  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de cadmium a même favorisé la croissance de *Tetraselmis suecica* (Vicente *et al.*, 1988).

#### **8.4 Toxicité vis-à-vis des mollusques**

A de très fortes concentrations comprises entre 1 et 10 mg l<sup>-1</sup>, soit 20000 à 200000 fois supérieures à celles normalement rencontrées dans le milieu marin côtier, le cadmium provoque à court terme la mort des individus expérimentalement exposés. Ces concentrations ne se rencontrent jamais dans les milieux marins, même les plus contaminés (Chiffolleau *et al.*, 1999). Par exemple, chez *Ruditapes decussatus*, la DL<sub>50</sub> à 96H était de 8 mg de Cd l<sup>-1</sup>, cette valeur pouvant varier en fonction de facteurs biotiques et abiotiques (Vicente *et al.*, 1988). A des concentrations plus faibles (20 et 40 µg l<sup>-1</sup>), aucune mortalité significative n'a été observée chez *Cerastoderma glaucum* (Vicente *et al.*, 1988). La toxicité du cadmium dépend aussi de la durée d'exposition. En effet, sur des cellules de la glande digestive de *Pecten maximus in vitro*, le CdCl<sub>2</sub> à 1,8 mg l<sup>-1</sup> est faiblement toxique après 2 heures puis fortement toxique après 48 heures de contact (Le Pennec et Le Pennec, 2001). Le cadmium peut provoquer des perturbations dans la formation de la coquille des larves véligères de mollusques car il modifie le métabolisme du calcium. Les œufs et les stades larvaires sont les plus sensibles (Vicente *et al.*, 1988). Le cadmium peut également induire un retard de la croissance et une déformation des coquilles chez des moules *Mytilus edulis* à des concentrations comprises entre 1,25 et 5 mg l<sup>-1</sup> (Sunila et Lindström, 1985).

De nombreuses études ont été réalisées afin d'évaluer la toxicité du cadmium chez les huîtres. Certains auteurs ont montré l'apparition d'anomalies ou de retard dans le développement embryonnaire et larvaire de *Crassostrea virginica*, *Crassostrea margarita* et *Crassostrea gigas* à des concentrations comprises entre 5 et 20 µg l<sup>-1</sup> (Zarogian et Morrison, 1981 ; Watling, 1978, 1982 ; Amiard-Triquet *et al.*, 1998). Par contre, à des teneurs en cadmium plus élevées comprises entre 20 et 50 µg l<sup>-1</sup>, d'autres auteurs ont observé des résultats contradictoires, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas observé de perturbations de l'embryogenèse ou du développement larvaire chez *C. virginica* ou *C. gigas* respectivement (Ringwood et Brouwer, 1995 ; Robert et His, 1985). De même, Calabrese *et al.* (1973) et Martin *et al.* (1981) ont aussi observé que le cadmium n'était pas très toxique pour des larves de *C. gigas*. A des concentrations beaucoup plus élevées, le cadmium peut provoquer la mort des organismes. Ramachandran *et al.* (1997) ont trouvé une DL<sub>50</sub> à 48H de 0,46 µg ml<sup>-1</sup> chez des larves d'huîtres *Crassostrea iradalei* tandis que Pastorak *et al.* (1994) ont obtenu une DL<sub>50</sub> de 0,94 µg l<sup>-1</sup> chez des embryons d'huîtres. Le chlorure de cadmium n'a pas montré d'effet sur des hémocytes de *C. gigas* à des concentrations comprises entre 5,4 ng l<sup>-1</sup> et 54 mg

$\text{l}^{-1}$  (Gagnaire *et al.*, 2004), par contre, une diminution de l'index d'agrégation de 30% (contrôle) à 10 – 15% à  $10 \text{ mg l}^{-1}$  a déjà été observée (Auffret et Oubella, 1997). Chez *C. virginica*, la phagocytose, un phénomène impliquant la motilité cellulaire et l'adhésion, a été altérée *in vitro* par l'exposition au cadmium (Cheng et Sullivan, 1984). Sur des cultures cellulaires de cœur de *C. gigas*, le cadmium à des concentrations de  $109 \mu\text{g l}^{-1}$  ou  $1090 \mu\text{g l}^{-1}$  pendant 24 heures a induit une réduction des conductances ioniques et de l'automatisme. Au bout de 12 jours, une diminution des conductances ioniques a aussi été observée à  $109 \text{ ng l}^{-1}$ , mais cela n'a pas été le cas à  $1090 \text{ ng l}^{-1}$  (Pennec *et al.*, 2002).

Les effets du cadmium susceptibles d'affecter les organismes sont donc aussi très variés. Le cadmium peut induire un dysfonctionnement rénal et des effets sur la survie, le succès de l'embryogenèse et du développement larvaire, le succès reproducteur, la formation de la coquille des mollusques, la phagocytose, les conductances ioniques... ont également été reportés, ce qui démontre de modes d'action du cadmium très différents selon les organismes.

## **9 Le cadmium et ses conséquences au niveau génétique**

### **9.1 Activité clastogène**

De nombreuses études réalisées à partir du European Community Aneuploidy Project ont montré l'évidence de la clastogénicité du cadmium chez les mammifères (Natarajan, 1993 ; Parry et Sors, 1993 ; Warr *et al.*, 1993 ; Adler, 1993 ; Leopardi *et al.*, 1993 ; Lynch et Parry, 1993 ; Parry, 1993 ; Wallin et Hartly-Asp, 1993).

Par exemple, il a été montré que le  $\text{CdCl}_2$  induisait des altérations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs dans des cellules ovariennes de hamster chinois *in vitro* (Ochi *et al.*, 1984 ; Howard *et al.*, 1991). De plus, Saplakoglu et Iscan (1998) ont rapporté des échanges de chromatides sœurs induits par le  $\text{CdCl}_2$  ( $18 \mu\text{g l}^{-1}$  –  $180 \text{ mg l}^{-1}$ ), tandis que Coogan *et al.* (1992) et Dally et Hartwig (1997) ont trouvé que le Cd II induisait des cassures de simples brins à des concentrations de  $54,5 \text{ mg l}^{-1}$  et  $1,09 \text{ mg l}^{-1}$  respectivement.

### **9.2 Activité aneugène**

---

Le CdCl<sub>2</sub> n'est pas seulement capable d'induire des dommages chromosomiques structuraux, il a aussi des propriétés aneugènes. En effet, un effet aneugène sur des cellules ovariennes de hamster chinois a été observé à des concentrations de CdCl<sub>2</sub> de 359,6 et 719,2 µg l<sup>-1</sup> (Seoane et Dulout, 1994 ; Seoane *et al.*, 2000). Une augmentation de la fréquence de cellules aneuploïdes a également été observée sur des cellules humaines MRC-5 aux mêmes concentrations (Güerci *et al.*, 2000 ; Seoane *et al.*, 2000) mais aussi dans des cellules embryonnaires de hamster chinois à des concentrations comprises entre 0,5 et 3 µg ml<sup>-1</sup> (Natarajan *et al.*, 1993). Dans ce dernier cas, l'hypodiploïdie était induite plus fréquemment que l'hyperdiploïdie, ainsi que lors d'un traitement au CdCl<sub>2</sub> dans des cellules humaines MRC-5 (Seoane et Dulout, 2001). Le CdCl<sub>2</sub> a induit une hyperploïdie chez des souris et des oocytes de hamster syrien (Watanabe *et al.*, 1979) et des augmentations significatives de trisomies, triploïdies dans des blastocystes de souris (Watanabe et Endo, 1982). Le CdCl<sub>2</sub> est classifié par l'Aneuploidy Data Review Committee of the U.S. Environmental Protection Agency comme un aneugène positif dans les cellules germinales de rongeurs femelles (Mailhes *et al.*, 1986), par contre, les résultats étaient peu concluants chez les mâles (Allan *et al.*, 1986). Chez des larves femelles de *Drosophila melanogaster*, le CdCl<sub>2</sub> à des concentrations de 20, 50, 200 et 600 mg l<sup>-1</sup> a induit à la fois la perte et le gain de chromosomes (Osgood *et al.*, 1991).

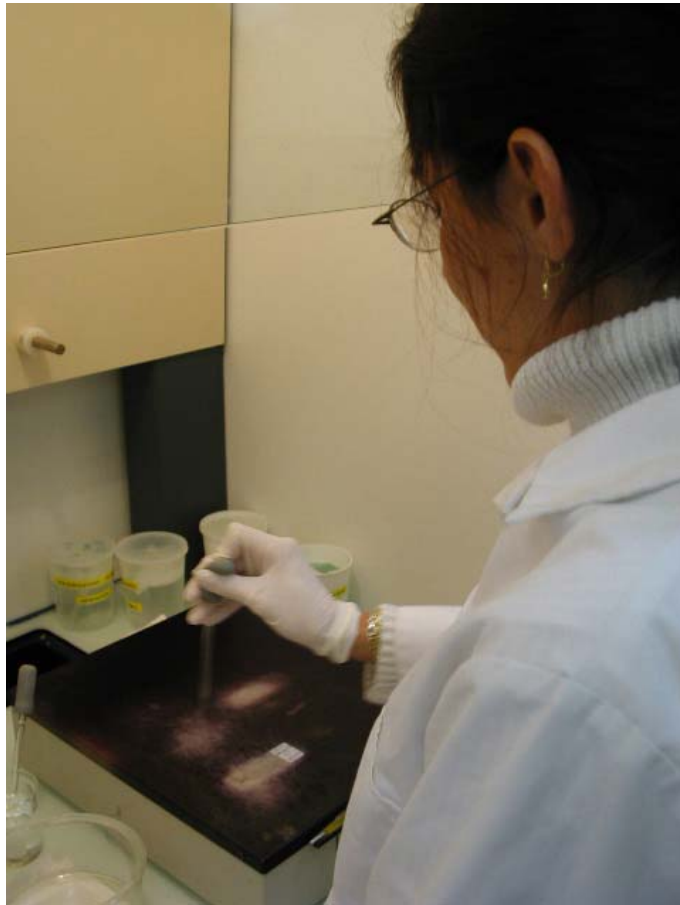
### **9.3    Activité mutagène**

Le CdCl<sub>2</sub> est un représentant de la classe des produits chimiques référés comme des carcinogènes non-mutagènes (Schiestl, 1989). En effet, le cadmium est principalement non mutagène dans les systèmes bactériens et seulement faiblement mutagène dans les tests de cellules mammaliennes en culture (De Flora *et al.*, 1990 ; Mortelmans *et al.*, 1986 ; Marzin et Phi, 1985).

Ainsi, le cadmium est capable d'induire des dommages chromosomiques structuraux et numériques chez divers organismes. Par contre, il est considéré comme non mutagène chez la plupart des organismes.

## Partie II :

# Matériels et Méthodes



*Aspiration du mélange d'eau acidifiée lors de l'exécution des préparations chromosomiques*



## **Partie II : Matériels et Méthodes**

Dans cette partie, nous allons présenter tout ce qui est commun à plusieurs expérimentations, c'est-à-dire la méthodologie utilisée pour l'étude de l'aneuploïdie, la réalisation de croisements, l'élevage larvaire, la quantification du cadmium et les analyses statistiques.

### **1 Etude de l'aneuploïdie**

L'étude de l'aneuploïdie a été réalisée avec la méthode dite « classique » de comptage chromosomique car des méthodes telles que la cytométrie en flux, l'hybridation *in situ* par fluorescence ou encore le chromosome painting ne sont pas encore utilisables chez les huîtres.

#### **1.1 Conditionnement des huîtres**

Les huîtres en provenance du milieu naturel doivent être conditionnées à l'écloserie avant de réaliser les préparations chromosomiques. En effet, afin d'augmenter l'indice mitotique (nombre de mitoses), les huîtres sont conditionnées pendant une période allant de 3 à 4 semaines dans des bacs où la température est augmentée progressivement jusqu'à 15 – 20°C selon la saison et où une quantité de nourriture supplémentaire est apportée par rapport à celle trouvée dans le milieu.

#### **1.2 Préparations chromosomiques**

Les préparations chromosomiques ont été réalisées à partir de tissu branchial et effectuées selon la méthode de suspension cellulaire de Thiriot-Quévieux et Ayraud (1982). Les branchies ont été choisies pour réaliser les préparations chromosomiques car c'est un tissu en permanente division. De plus, l'huître est un organisme filtreur et chez cette espèce, les cultures de tissus ne sont pas encore possibles, nous sommes donc dépendants de l'indice mitotique de chaque animal.

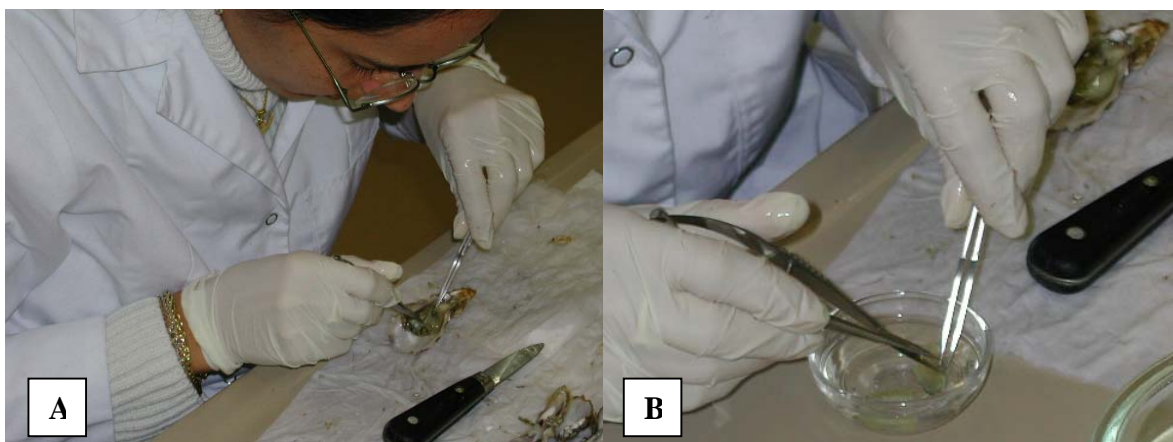
Les différentes étapes de la technique utilisée sont les suivantes :

### 1.2.1 Arrêt des cellules en métaphase

Afin d'étudier l'aneuploïdie, les animaux ont tout d'abord été placés dans une solution de colchicine diluée dans de l'eau de mer à 0,005% (Figure 8). La colchicine est un alcaloïde qui détruit la tubuline inhibant ainsi la formation des fibres du fuseau achromatique auxquelles se fixent les centromères de chaque chromosome et empêchant de cette façon l'ascension anaphasique. La colchicine induit donc le blocage en métaphase des mitoses. Ce stade permet une meilleure visualisation (et donc un meilleur comptage) des chromosomes. Le temps d'action de la colchicine a varié de 7 à 8 heures. Cette expérience s'est déroulée la nuit car les huîtres ont pendant cette période une plus grande activité mitotique, une plus grande filtration et donc une meilleure absorption de la colchicine. Les huîtres ont ensuite été disséquées afin de récupérer les branchies (Figure 9A) qui ont subi des micro-coupures pour permettre une meilleure pénétration des traitements suivants (Figure 9B).



**Figure 8 : Huîtres prêtes à filtrer une solution de colchicine pendant la nuit.**



**Figure 9 : (A) Dissection des branchies. (B) Réalisation des micro-coupures.**



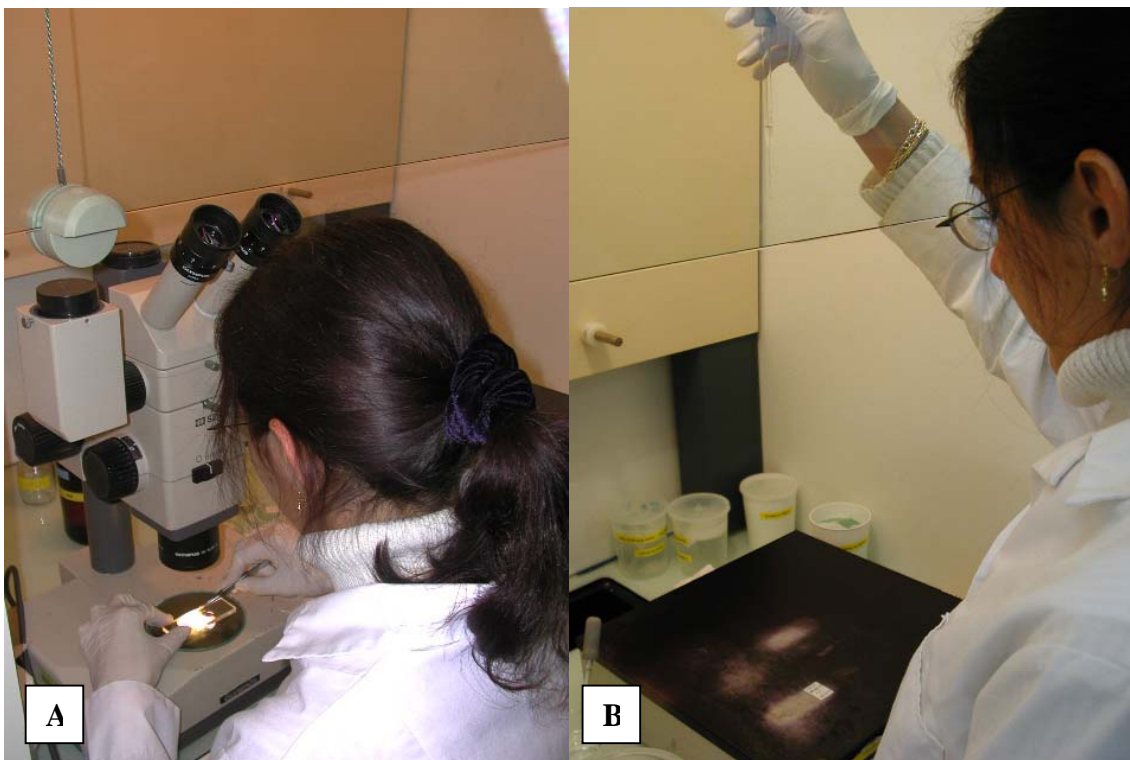
### 1.2.2 Choc hypotonique

Les branchies ont ensuite été soumises à un choc hypotonique entraînant une turgescence des cellules et permettant ainsi une bonne dispersion des chromosomes. Le choc hypotonique a été réalisé avec du citrate de sodium à 0,9% pendant 40 minutes.

### 1.2.3 Fixation

Les branchies ont ensuite été fixées par plusieurs bains successifs (10/10/20/20 min) d'éthanol absolu-acide acétique (3 : 1) pour préserver les structures internes des cellules.

### 1.2.4 Exécution des préparations chromosomiques



**Figure 10 : Exécution des préparations chromosomiques. (A) Libération des noyaux. (B) Etalement de la suspension cellulaire sur une lame microscopique préchauffée à 44°C.**

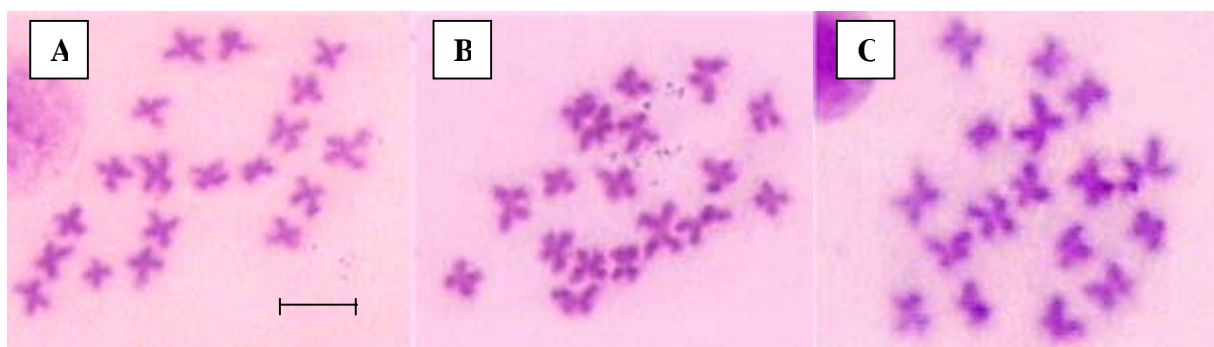
De l'eau acidifiée a été ajoutée à une branchie ou à un morceau de branchie selon la taille afin de faciliter la libération des noyaux (Figure 10A). La suspension cellulaire ainsi obtenue a été étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm environ sur une lame microscopique préchauffée à 44°C (Figure 10B). Puis, le mélange d'eau acidifiée a été aspiré. Grâce à la chaleur, seules les cellules vont rester « accrochées » à la lame. Ensuite, les lames obtenues ont été séchées à l'air.

### 1.2.5 Coloration

Afin d'observer au microscope optique les préparations chromosomiques, celles-ci ont été colorées avec une solution de Giemsa (4%) dans un tampon phosphate à pH=6,8 pendant 10 minutes.

## 1.3 Comptage chromosomique

Le pourcentage d'aneuploïdie a été estimé en comptant 30 cellules somatiques en métaphases (directement au microscope optique Olympus à l'objectif 40) choisies au hasard par individu mais montrant un étalement chromosomique similaire. Nous comptons le nombre de cellules diploïdes (cellules présentant  $2n=20$  chromosomes) et le nombre de cellules aneuploïdes (cellules présentant  $2n=19$  (Figure 11A), 18 (Figure 11B) ou 17 chromosomes (Figure 11C)). Le taux d'aneuploïdie d'une huître est un pourcentage de cellules aneuploïdes observées au sein de cet organisme. Pour chaque lot, 10 individus minimum ont été étudiés.

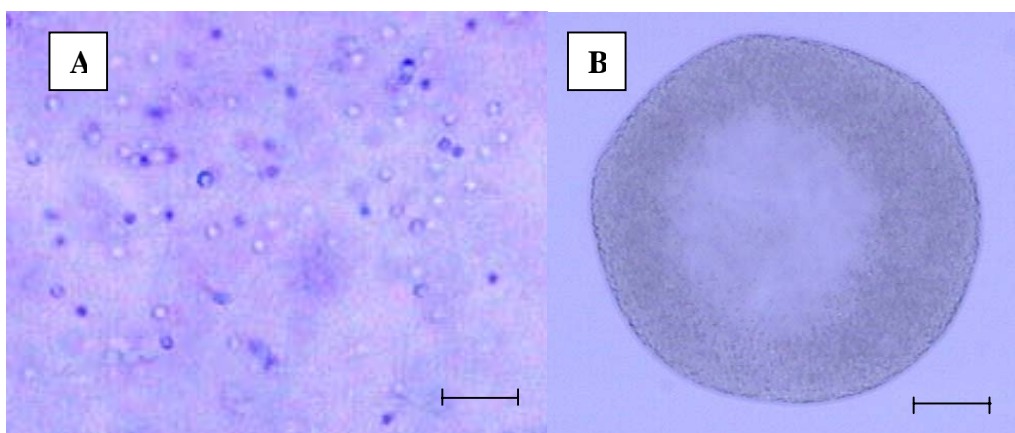


**Figure 11 : Métaphases aneuploïdes de *Crassostrea gigas* avec (A)  $2n=19$ , (B)  $2n=18$  et (C)  $2n=17$  chromosomes. Echelle = 7  $\mu$ m.**

Le taux d'aneuploïdie d'un lot d'huîtres est le pourcentage moyen de cellules aneuploïdes au sein de ce lot. 30 métaphases par individu représente le nombre statistique minimal accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981 ; Wenger *et al.*, 1984). Dans notre étude, la probabilité que les cellules aneuploïdes soient le résultat d'artefacts de la méthode de suspension cellulaire est réduite par le nombre élevé de métaphases analysées.

## 2 Croisements

Les croisements réalisés ont toujours eu lieu à partir d'un pool de gamètes provenant de 6 huîtres femelles et 6 huîtres mâles. Les gamètes de chaque animal mature 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 afin d'éliminer les débris. Les gamètes mâles ont été filtrés sur une maille de 25  $\mu\text{m}$  et les gamètes femelles sur une maille de 60  $\mu\text{m}$ . Les gamètes mâles (Figure 12A) ont été colorés à l'éosine et dilués, puis placés sur une cellule de Thoma avant d'être dénombrés. Les gamètes femelles (Figure 12B) ont également été dénombrés après avoir été disposés sur des cellules de Mallasez. Les dénombrements ont été réalisés par analyse d'images SAMBA. Les fécondations ont eu lieu dans des béchers en verre d'un litre contenant, pour chaque lot, de l'eau de mer filtrée, 3 millions d'ovocytes et 600 millions de spermatozoïdes. Le développement s'est poursuivi dans des jarres de 30 l en salle d'élevage larvaire (Figure 13). Vingt-quatre heures après la fécondation, le taux d'éclosion a été estimé par dénombrement du nombre de larves D normales (comptage sur lame quadrillée de trois prélèvements de 50  $\mu\text{l}$  chacun) (Figure 14).



**Figure 12 : Gamètes mâles et femelles d'huîtres *Crassostrea gigas*. (A) Spermatozoïdes. (B) Ovocyte. Echelle = 10  $\mu\text{m}$ .**



Figure 13 : Salle d'élevage larvaire avec 12 lots.

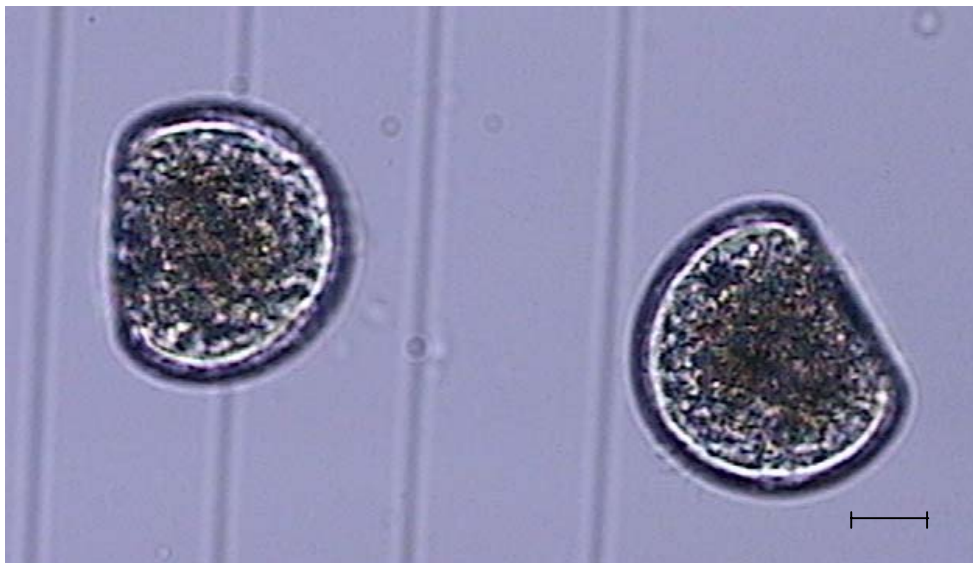


Figure 14 : Larves D de 24 heures d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 20  $\mu\text{m}$ .

### 3 Elevage larvaire

Chaque traitement a toujours un réplicat en élevage 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 en utilisant des lames quadrillées (trois prélèvements de 100  $\mu\text{l}$  chacun). Un suivi de la croissance a également été réalisé en mesurant



la taille de 50 larves par lot en moyenne à partir d'un programme d'analyse d'images SAMBA. Les densités sont réajustées à chaque comptage et diminuées au fur et à mesure du grossissement des larves (suivant une échelle zootechnique prédéfinie). A J1 (un jour après la fécondation), les larves sont remises en élevage à raison de 10 par ml soit un maximum de 300000 par jarre de 30 l. 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  $\mu\text{l}^{-1}$  respectivement (Figure 15). Cette ration alimentaire a été choisie suite à des travaux effectués à l'écloserie de La Tremblade (Lamouroux, 2001).



**Figure 15 : Salles de production du phytoplancton. (A) Ballons de 2 et 10 litres. (B) Cuves de 300 litres.**

Le mélange de ces 4 espèces favorise la croissance et augmente le taux de survie. Au bout de 22 ou 24 jours, les larves pédivéligères retenues sur un tamis de  $220\ \mu\text{m}$  ont été placées en micronurserie afin de permettre leur fixation (Figure 16). Les larves ont été disposées sur des tamis de  $150\ \mu\text{m}$  avec de la microbrisure de coquille (cette microbrisure a à peu près la taille des larves permettant ainsi la fixation d'une seule larve par microbrisure).



Figure 16 : Bacs contenant des larves de *Crassostrea gigas* placées en micronurserie sur des tamis de 150 µm.

#### 4 Quantification du cadmium

Les analyses de cadmium au sein des huîtres ont été effectuées au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins de l'Université de La Rochelle. Le Cd a été mesuré par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme avec concentrateur (Figure 17).



Figure 17 : Spectrophotomètre d'absorption atomique à la flamme.

Une lampe au deutérium a été utilisée pour correction de l'absorption non spécifique. Pendant toutes les manipulations, des précautions ont été prises pour éviter la contamination des échantillons. Tout le matériel utilisé a été soigneusement lavé, puis mis à tremper dans un bain d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (2 : 1) pendant au moins 24 heures et rincé à l'eau milli-Q. Les huîtres ont été débarrassées de leur coquille pour ne conserver que les parties molles (sans les branchies qui ont été utilisées pour réaliser les préparations chromosomiques).

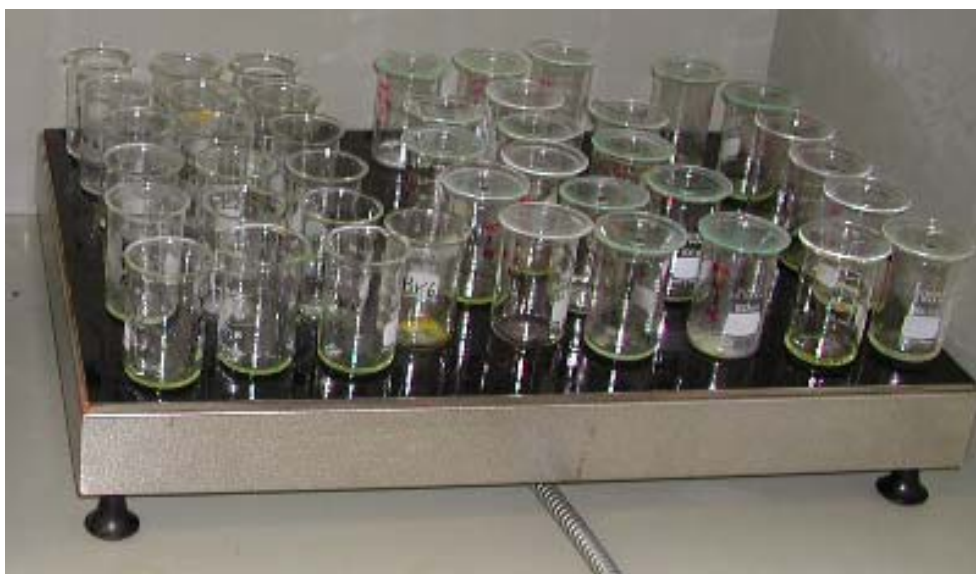
Des pools de chair d'huîtres ont été réalisés et conservés au congélateur (-20°C) jusqu'à leur utilisation dans des sacs de plastique hermétique. Pour les huîtres adultes exposées au cadmium et leurs descendants, 4 pools de 3 huîtres ont été réalisés alors que pour les huîtres juvéniles exposées au cadmium et les huîtres de la vasière de Brouage, 5 pools de 7 huîtres par lot ont été effectués. Cette différence de 12 ou 35 huîtres analysées vient du fait que nous avons décidé d'étudier dans un premier temps 10 ou 30 huîtres pour l'aneuploïdie et nous avons toujours un petit nombre supplémentaire d'huîtres au cas où de la mortalité apparaîtrait lors de nos expérimentations ou bien si des animaux ont un faible indice mitotique. Avant analyse, les tissus ont été séchés à l'étuve à 50°C pendant une semaine (huîtres adultes exposées au cadmium) jusqu'à obtention d'un poids constant ou lyophilisés (Figure 18) pendant 3 jours (autres échantillons).

Les tissus secs ont ensuite été broyés à l'aide d'un mortier en céramique à la main afin d'obtenir une fine poudre homogène. Le broyage permettant l'homogénéisation, il n'a pas été



**Figure 18 : Lyophilisateur contenant nos pools de chair d'huîtres dans des boîtes de Pétri.**

nécessaire pour des échantillons inférieurs à 500 mg. Des aliquotes de 500 mg sec ont été minéralisées par ajout de 5 ml d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  14 N) suprapur et de 300  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$  17 N) suprapur à  $80^\circ\text{C}$  dans des béchers recouverts d'un verre de montre (Figure 19). Après destruction de la matière organique, les verres de montre ont été enlevés pour permettre une évaporation complète. Les résidus secs ont été repris par 10 ml d' $\text{HNO}_3$  0,3 N pour analyse par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les échantillons ont été conservés dans des flacons à scintillation. Parallèlement aux échantillons, des blancs d'analyse ont été réalisés suivant le même protocole pour contrôler le bruit de fond de la contamination (métaux contenus dans les acides et/ou sur les parois de la verrerie, contamination par les poussières, etc...) et pour calculer la limite de détection de la méthode d'analyse. La qualité des attaques a été contrôlée par analyse de standards internationaux dont les concentrations sont certifiées. Nous avons utilisé comme standards : l'hépatopancréas de homard (TORT-2 avec une concentration certifiée en Cd de :  $26,7 \pm 1,8 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) et le foie de roussette (DOLT-3 avec une concentration certifiée en Cd de :  $19,4 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec). De plus, une mesure d'étalons certifiés a aussi été réalisée à chaque analyse.



**Figure 19 : Minéralisation de nos échantillons sur une plaque chauffante à  $150^\circ\text{C}$ .**

## **5 Analyses statistiques**

Comme le nombre de métaphases par individu est le même pour tout le matériel étudié, des analyses de variance à un, deux ou trois facteurs ont été réalisées sur SYSTAT 9.0



(Wilkinson, 1990). La mortalité des huîtres a été étudiée avec des tests  $t$  et  $G$  (Scherrer, 1984 ; Sokal et Rohlf, 1995) et les taux d'éclosion ont été analysés avec le test  $G$ . Le terme « sans réplicats » utilisé lors du test  $G$  signifie que le test a été réalisé sur la population non subdivisée en réplicats mais considérée toute entière, en d'autres termes, les réplicats pour chaque concentration ont été considérés comme un seul lot. Les croissances larvaires ont été étudiées statistiquement à l'aide d'un test  $F$  de Fisher-Snedecor (Legendre et Legendre, 1998) et/ou du calcul des coefficients de corrélation  $R$  entre courbes de croissance exponentielles.



# Partie III :

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



*Bacs contenant des huîtres Crassostrea gigas adultes et juvéniles exposées  
à différentes concentrations d'atrazine*



## **Partie III : Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez les huîtres *Crassostrea gigas***

### **1 Introduction**

Avant cette étude, aucune recherche n'avait été effectuée sur l'influence d'un polluant sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas*. Il était donc intéressant d'étudier la possibilité d'une cause environnementale pour l'aneuploïdie chez les huîtres *C. gigas*. Du fait de sa persistance dans le milieu et de sa présence dans le bassin de Marennes-Oléron, l'atrazine a été choisie car de nombreuses études avaient déjà montré des effets létaux ou sub-létaux sur des organismes aquatiques. De plus, des conséquences au niveau génétique ont aussi été observées chez plusieurs organismes.

Pour évaluer l'impact de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses *C. gigas*, il est impératif de travailler tout d'abord en milieu contrôlé, donc dans des conditions *in vivo*, ceci afin de contrôler différents paramètres. Dans un premier temps, nous exposerons à l'atrazine des huîtres à différents stades de développement, puis, dans un second temps, nous chercherons à savoir, dans le cas où un effet est observé, si celui-ci peut persister dans le temps (même après retour dans des conditions non polluées) et entre les générations. Enfin, dans un troisième temps, nous chercherons à identifier les chromosomes manquants.

### **2 Impact à différents stades de développement**

#### **2.1 Introduction**

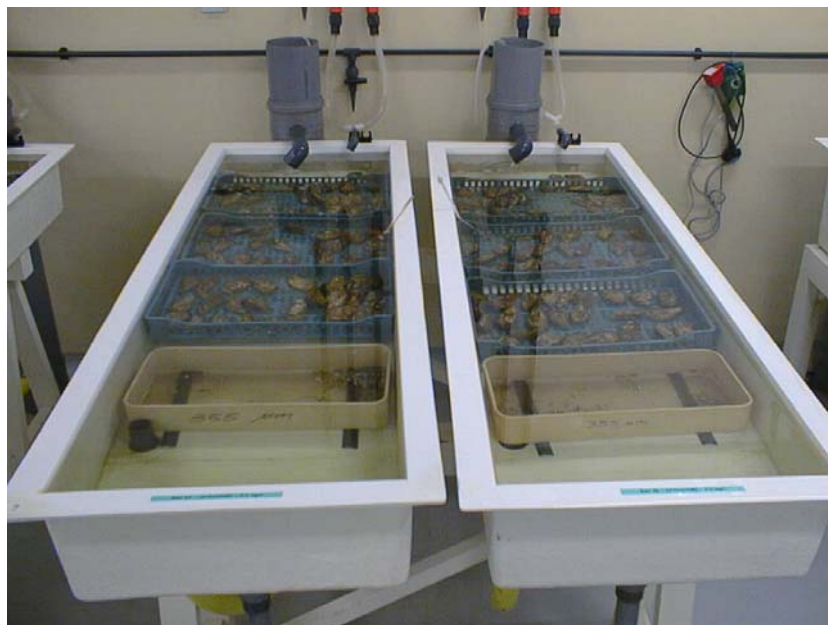
Afin d'évaluer l'effet de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, des études ont été réalisées en milieu contrôlé à différents stades de développement (adultes et juvéniles), ceci afin de savoir si les animaux sont plus ou moins sensibles à l'atrazine selon leur stade de développement. Nous souhaitons aussi évaluer l'impact de l'atrazine à un stade plus précoce, c'est-à-dire pendant le stade larvaire. Malheureusement, le protocole d'étude de l'aneuploïdie à ce stade n'était pas encore mis au point au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER de La Tremblade (Charente-Maritime,

France). Divers essais ont donc été réalisés afin de pouvoir étudier l'aneuploïdie aux stades embryonnaire ou larvaire. Cependant, le nombre de métaphases comptables était trop faible pour envisager une étude statistiquement correcte. Par conséquent, nous n'avons pu que réaliser une exposition à l'atrazine pendant un élevage larvaire et étudier l'aneuploïdie sur les juvéniles en résultant.

## **2.2 Matériels et méthodes**

### **2.2.1 Matériel biologique**

Des huîtres creuses japonaises, *Crassostrea gigas*, âgées de trois ans et demi (adultes), provenant de Bretagne et conservées en claire sur le bassin de Marennes-Oléron (France) ont été placées dans le conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade en mars 2001. Des huîtres juvéniles provenant d'un croisement réalisé au sein du laboratoire le 5 février 2001 ont été mises dans les mêmes conditions que les huîtres adultes (Figure 20). Le croisement qui a permis la production de ces huîtres juvéniles a été effectué à partir d'individus mûres (24 femelles et 6 mâles) provenant d'un captage réalisé dans la Seudre (Charente-Maritime, France).



**Figure 20 : Huîtres creuses *Crassostrea gigas* aux stades adulte et juvénile exposées à l'atrazine dans des bacs du conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade.**

### 2.2.2 Exposition à l'atrazine

Ces huîtres adultes et juvéniles ont été exposées à de l'atrazine diluée dans de l'eau de mer directement pompée à partir du bassin de Marennes-Oléron. La solution mère d'atrazine a été fournie par l'Institut National de la Recherche Agronomique INRA (Saint-Laurent-de-la-Prée, Charente-Maritime, France) sous la forme d'une solution commerciale : Techn'atral 50 liquide de concentration 500 g l<sup>-1</sup>. De l'eau de mer provenant du bassin de Marennes-Oléron a été utilisée comme contrôle (traitement 1). Les traitements d'atrazine appliqués représentent une valeur pic retrouvée dans un environnement très pollué (10 µg l<sup>-1</sup> ; traitement 2) (Munsch, 1995) et une valeur dix fois supérieure (100 µg l<sup>-1</sup> ; traitement 3). Pour chaque concentration et le contrôle, des réplicats (A et B) ont été réalisés. Chaque bac contenait 75 huîtres adultes (70 mm de longueur de coquille en moyenne) et une centaine de juvéniles (5 mm de longueur de coquille en moyenne). Les huîtres ont été acclimatées pendant 6 jours dans des bacs de dimension 1,65 x 0,50 x 0,30 m, en circuit ouvert, donc avec un renouvellement d'eau continue. Ces deux premières expérimentations ont été réalisées pendant deux mois pour les adultes jusqu'à leur maturation et trois mois et demi pour les juvéniles jusqu'à une taille de 30 – 40 mm, en circuit fermé, avec un système de circulation d'eau pour l'oxygénation. Chaque bac contenait 157 l d'eau de mer, avec ou sans atrazine, qui était changée chaque jour et maintenue à 19,5 ± 1°C. Un volume de 157 ml d'atrazine à 10 mg l<sup>-1</sup> pour le traitement 2 et 100 mg l<sup>-1</sup> pour le traitement 3 dilués dans 5 l d'eau de mer ont été rajoutés dans les bacs correspondants à chaque fois que l'eau était changée. Les huîtres ont été nourries quotidiennement avec 8 l d'*Isochrysis galbana* (6.10<sup>6</sup> cellules ml<sup>-1</sup>) et 3,5 l de *Tetraselmis suecica* (1,5.10<sup>6</sup> cellules ml<sup>-1</sup>) pour chaque bac. Chaque jour, le nombre d'individus morts par lot pour la population d'adultes était noté ainsi que la température.

Des échantillons d'eau ont été prélevés pour effectuer des analyses tout au long de la période de traitement afin de vérifier les concentrations d'atrazine et de ses produits de dégradation dans les différents bacs y compris le contrôle. Ces analyses ont été réalisées par l'Institut de Recherche pour l'Ingénierie de l'Agriculture et de l'Environnement CEMAGREF (Bordeaux, France). Pour chaque bac, un litre d'eau a été prélevé (à diverses périodes) et homogénéisé, le pH et la conductivité (salinité) 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 d'acétonitrile/eau (20/80), puis injecté pour analyse sur chromatographie liquide à haute performance munie d'un détecteur UV à barrettes de diodes. La détection des composés a été effectuée à 220 nm. Le premier échantillon a été prélevé juste après le premier ajout d'atrazine dans les bacs. Les concentrations étaient en accord avec celles espérées. Un second échantillon a été prélevé 24 h après l'ajout d'atrazine dans les bacs, juste avant le renouvellement d'eau dans les bacs. En 24 h, les concentrations d'atrazine ont diminué d'environ 20% et de nouveaux produits de dégradation tels que la simazine, la désisopropylatrazine DIA et la déséthylatrazine DEA sont apparues en faible concentration. Les échantillonnages ont été répétés tous les deux jours avec un échantillon d'eau pris au même point, 24 h après l'ajout d'atrazine. Les différents échantillons ont montré le même modèle de dégradation (Tableau 3).

### 2.2.3 Exposition pendant le stade larvaire

Le protocole pour la réalisation des fécondations et de l'élevage larvaire est présenté dans la Partie II. Les croisements ont eu lieu à la fin du mois de juin 2002. Les larves ont été exposées aux mêmes concentrations d'atrazine et à des concentrations plus faibles pouvant se retrouver dans le bassin de Marennes-Oléron : 0,1 ; 0,4 et 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Chaque traitement avait un réplicat et 12 lots ont donc été élaborés : lots témoins 1A et 1B, lots 2A et 2B (0,1  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 3A et 3B (0,4  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 4A et 4B (1  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 5A et 5B (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 6A et 6B (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

A chaque filtration, l'atrazine a été renouvelée. Le Tableau 4 présente les quantités d'atrazine diluée ajoutées à chaque jarre. L'exposition à l'atrazine s'est arrêtée dès la fin de l'élevage larvaire. Lorsque les huîtres juvéniles ont eu une taille suffisante (1 cm) pour les sortir de la salle de micronurserie, elles ont été placées en salle de maturation jusqu'en septembre 2002. Puis, elles ont été conservées en claire jusqu'à la mi-janvier 2003. Elles sont ensuite revenues à l'écloserie afin de les conditionner en serre.



**Tableau 3 : Résultats des analyses effectuées par Dominique Munaron (CEMAGREF de Bordeaux-Cestas). Concentrations des triazines exprimées en  $\mu\text{g l}^{-1}$ . "-" : 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 prélèvement	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

**Tableau 4 : Quantités d'atrazine diluée ajoutées à chaque jarre.**

Lot	Solution	Quantité
1A, 1B : 0 $\mu\text{g l}^{-1}$	-	-
2A, 2B : 0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$	0,1 $\text{mg l}^{-1}$	30 ml
3A, 3B : 0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$	0,1 $\text{mg l}^{-1}$	120 ml
4A, 4B : 1 $\mu\text{g l}^{-1}$	1 $\text{mg l}^{-1}$	30 ml
5A, 5B : 10 $\mu\text{g l}^{-1}$	10 $\text{mg l}^{-1}$	30 ml
6A, 6B : 100 $\mu\text{g l}^{-1}$	100 $\text{mg l}^{-1}$	30 ml

#### 2.2.4 Analyses statistiques

Comme le nombre de métaphases par individu est le même pour tout le matériel étudié, il est possible de tester les effets des lots en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (lots d'atrazine et réplicats) sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). Une analyse de variance à trois facteurs a aussi été utilisée afin de comparer les résultats entre les adultes et les juvéniles.

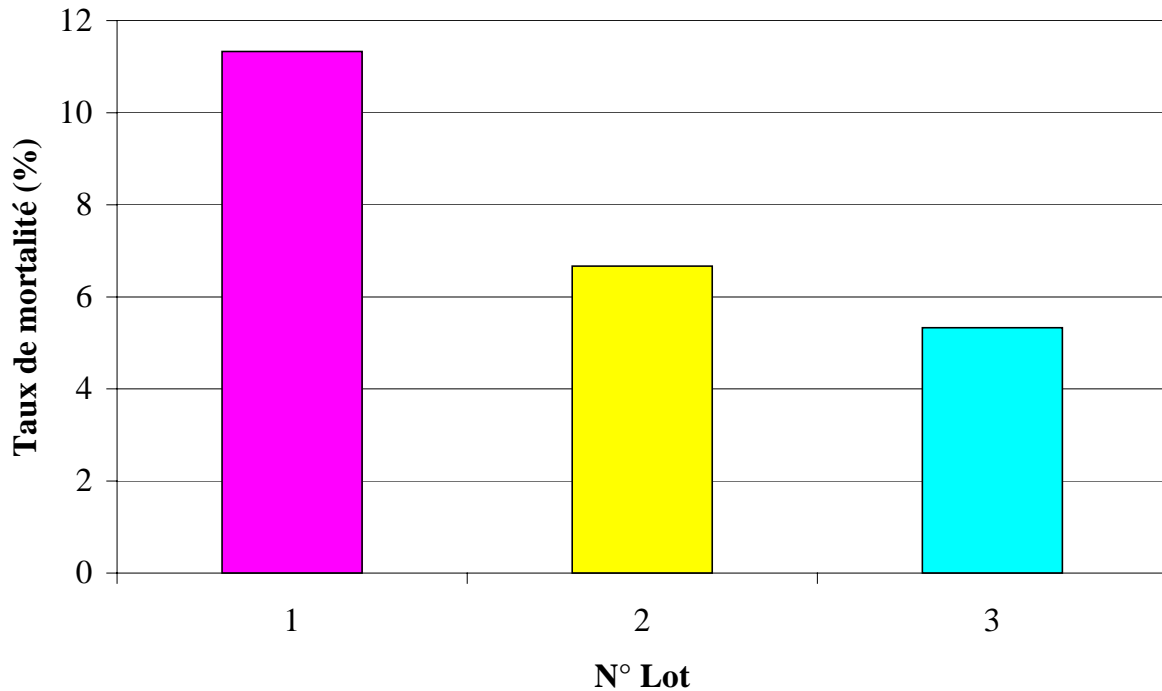
### 2.3 Résultats

#### 2.3.1 Huîtres *Crassostrea gigas* adultes

##### 2.3.1.1 Mortalité

Les mortalités ont été peu importantes tout au long de l'expérience (Figure 21). Le test  $t$  de comparaison de pourcentages a montré que la différence entre les pourcentages n'était pas significative entre chaque lot deux à deux ( $t=1,41$  ; 1,88 ; 0,49 entre les lots 1 et 2 ; 1 et 3 ; 2 et 3 respectivement). Ces valeurs sont toutes inférieures à la valeur critique (1,96) à un risque d'erreur de 5%. La différence observée peut donc être due au hasard. De plus, le test  $G$  a aussi permis de mettre en évidence que la différence entre lots n'était pas statistiquement significative ( $G=3,14$  sans réplicats). En effet, cette valeur est inférieure à la valeur critique

(5,99) pour un risque d'erreur de 5%. 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. Ainsi, l'atrazine n'a pas induit de mortalités différentielles aux concentrations testées.



**Figure 21 : Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine en fonction du lot : lot 1 (contrôle 0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 3 (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).**

### 2.3.1.2 Aneuploïdie

Les lots d'huîtres adultes qui ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins (Figure 22). Une analyse statistique a 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 ( $F=9,458$  ;  $p<0,001$ ). De plus, si nous comparons deux à deux chaque traitement, nous observons des différences significatives entre les lots 1 et 2 ( $F=12,935$  ;  $p=0,001$ ), entre les lots 1 et 3 ( $F=18,178$  ;  $p<0,001$ ), mais pas entre les lots 2 et 3 ( $F=1,441$  ;  $p=0,238$ ).

### 2.3.2 Huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles

Comme précédemment, le pourcentage de cellules aneuploïdes observé chez des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles a augmenté avec la concentration d'atrazine (Figure 22). Une analyse statistique a aussi révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F=0,000$  ;  $p=1,000$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F=34,878$  ;  $p<0,001$ ). De plus, si nous comparons deux à deux chaque traitement, nous observons des différences significatives entre les lots 1 et 2 ( $F=12,813$  ;  $p=0,001$ ), entre les lots 1 et 3 ( $F=61,298$  ;  $p<0,001$ ), mais aussi entre les lots 2 et 3 ( $F=22,902$  ;  $p<0,001$ ).

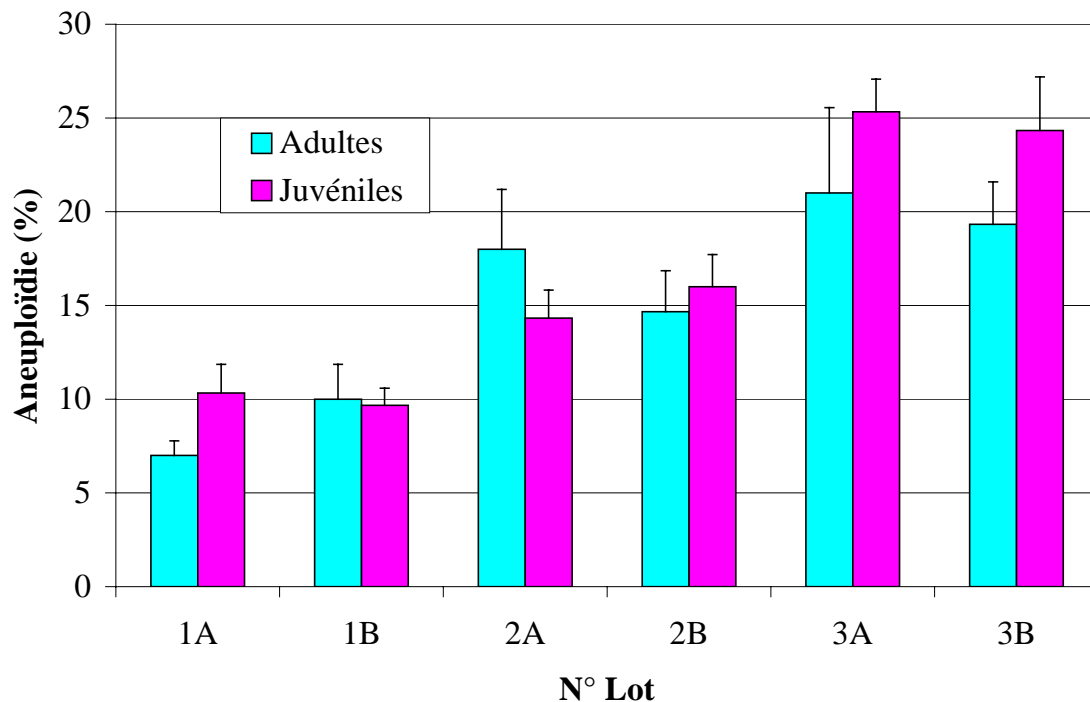


Figure 22 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes et juvéniles exposées à différentes concentrations d'atrazine : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

### 2.3.3 Comparaison des données obtenues chez *Crassostrea gigas* aux stades adulte et juvénile

Une augmentation du taux d'aneuploïdie avec la concentration d'atrazine a été observée quel que soit le stade de développement de l'huître (Figure 22). 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 les juvéniles ( $F=1,554$  ;  $p=0,215$ ). De plus, le taux d'aneuploïdie était significativement différent entre les deux doses d'atrazine testées ( $F=12,762$  ;  $p=0,001$ ), ce résultat suggérant un effet dose-réponse dans l'induction de l'aneuploïdie chez les huîtres.

### 2.3.4 Exposition pendant le stade larvaire

#### *2.3.4.1 Taux d'éclosion*

Les taux d'éclosion pour l'ensemble des lots étaient compris entre 87,3 et 95,4% (Figure 23). Un test  $G$  a permis de mettre en évidence que le hasard pouvait expliquer la différence existante entre les lots. Ainsi, les lots étudiés pourraient provenir d'une même population homogène car aucune différence significative en ce qui concerne leurs taux d'éclosion respectifs n'a été observée ( $G=0,4508$  sans réplicats). Cette valeur est inférieure à la valeur critique (11,07) pour un risque d'erreur de 5%.

#### *2.3.4.2 Croissance larvaire*

Les larves d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différentes concentrations d'atrazine n'ont pas montré de différences significatives au niveau de leur croissance (Figure 24). Les valeurs des coefficients de corrélation  $R$  ont été calculées entre chaque lot deux à deux et les 15 valeurs comprises entre 0,9997 et 1,0000 étaient toutes supérieures à la valeur critique de la distribution de Student ( $t=0,38$ ) pour un risque d'erreur de 5%.

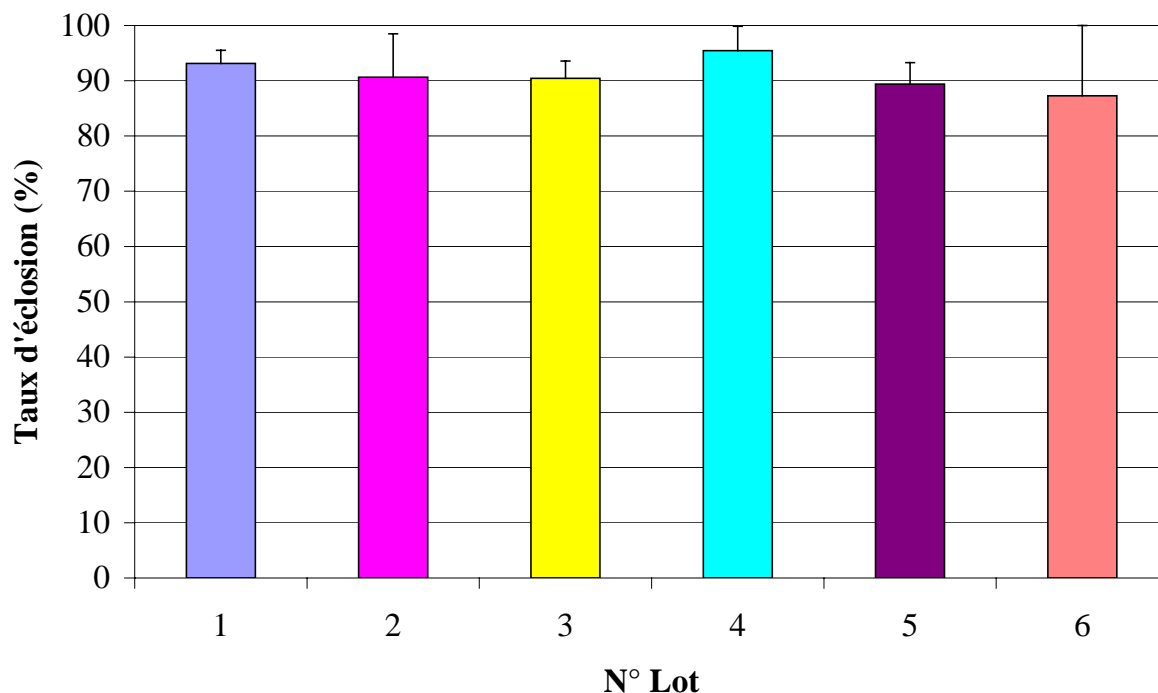


Figure 23 : Taux d'éclosion des huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différents traitements d'atrazine pendant leur développement larvaire : lot 1 ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 ( $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 3 ( $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 4 ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 5 ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 6 ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

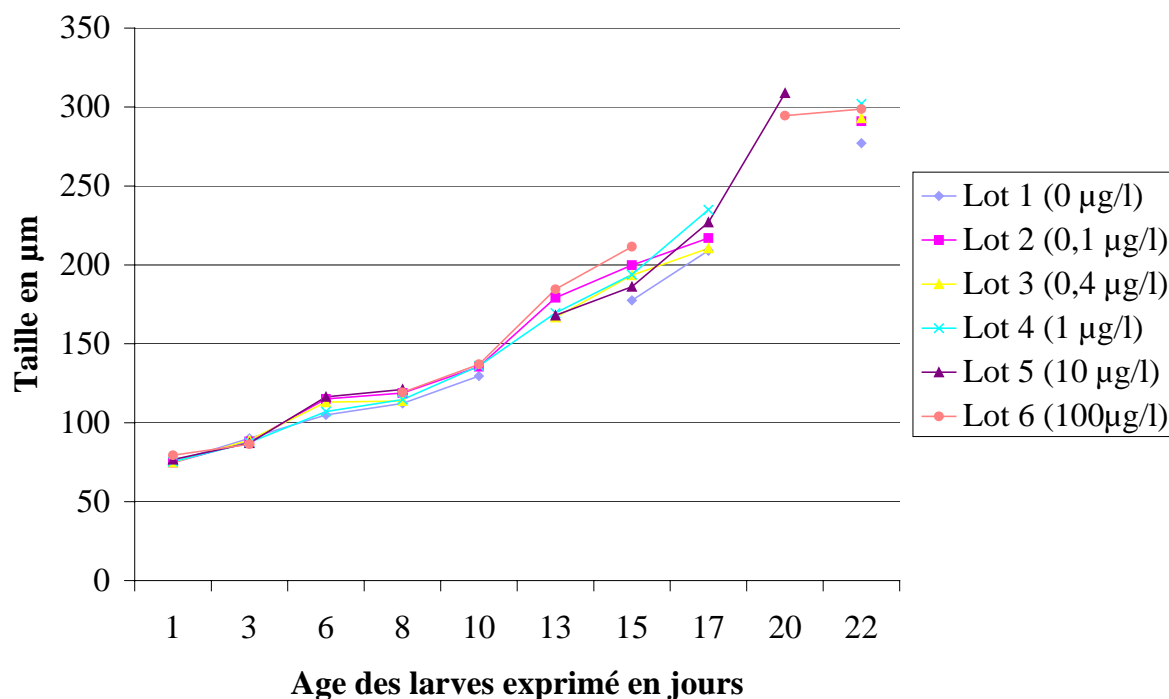
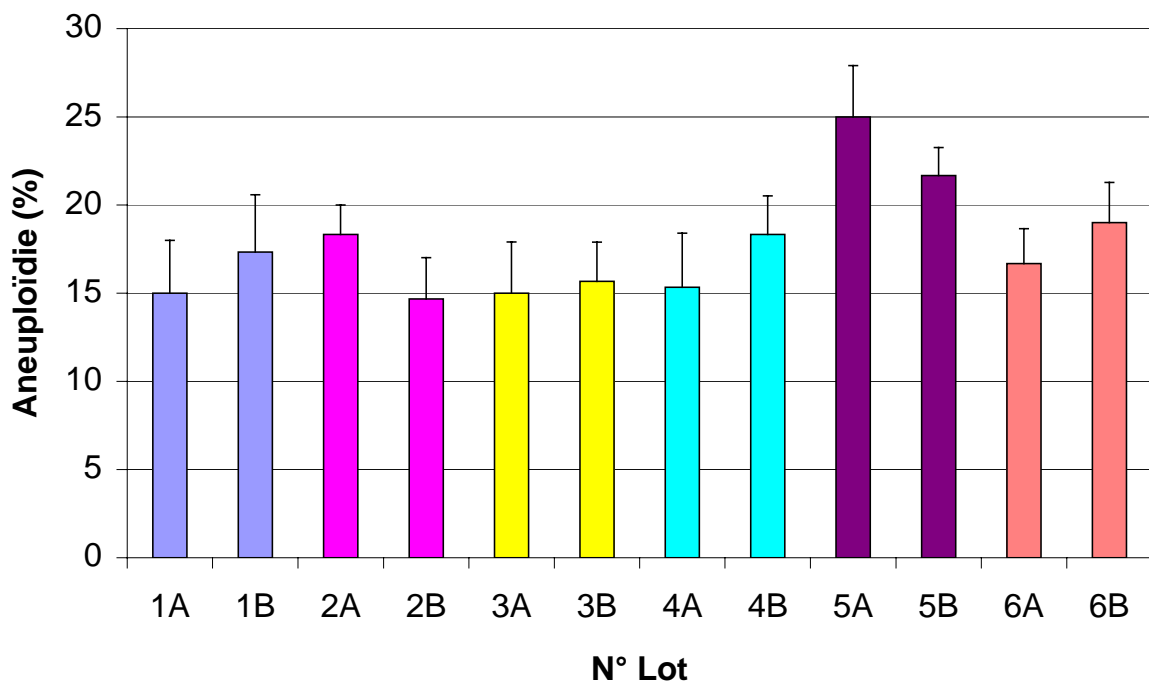


Figure 24 : Taille des larves (en  $\mu\text{m}$ ) d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différents traitements d'atrazine pendant leur développement larvaire en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.

## 2.3.4.3 Aneuploïdie

Les résultats d'aneuploïdie pour les huîtres juvéniles exposées à l'atrazine pendant leur développement larvaire sont présentés sur la Figure 25. Une analyse statistique a révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F=0,024$  ;  $p=0,878$ ) mais qu'il était significativement différent selon les traitements ( $F=2,663$  ;  $p=0,026$ ). De plus, il a été mis en évidence que le pourcentage d'aneuploïdie pour les témoins n'était pas statistiquement différent de celui des lots 2A et 2B ( $F=0,016$  ;  $p=0,900$ ), des lots 3A et 3B ( $F=0,084$  ;  $p=0,773$ ), des lots 4A et 4B ( $F=0,053$  ;  $p=0,820$ ) et des lots 6A et 6B de plus forte concentration ( $F=0,388$  ;  $p=0,537$ ). En revanche, une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les lots 5A et 5B et tous les autres lots, c'est-à-dire avec les témoins ( $F=6,735$  ;  $p=0,014$ ), les lots 2A et 2B ( $F=9,704$  ;  $p=0,004$ ), les lots 3A et 3B ( $F=10,494$  ;  $p=0,003$ ), les lots 4A et 4B ( $F=6,714$  ;  $p=0,014$ ) et les lots 6A et 6B ( $F=6,009$  ;  $p=0,019$ ) a été observée. Les taux d'aneuploïdie des lots 6A et 6B de plus forte concentration, quant à eux, n'étaient pas statistiquement différents de ceux des lots témoins ( $F=0,388$  ;  $p=0,537$ ), des lots 2A et 2B ( $F=0,409$  ;  $p=0,527$ ), des lots 3A et 3B ( $F=1,108$  ;  $p=0,299$ ) et des lots 4A et 4B ( $F=0,171$  ;  $p=0,681$ ).



**Figure 25 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine pendant le stade larvaire (3 semaines) puis replacées dans des conditions non polluées (6 mois) : lots 1A, 1B ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 3A, 3B ( $0,4 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 4A, 4B ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 5A, 5B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 6A, 6B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).**

## **2.4 Discussion**

Les causes de l'aneuploïdie ne sont pas encore très claires. Toutefois, chez les humains et chez les plantes, des facteurs génétiques sont impliqués dans l'origine de l'aneuploïdie (Bond et Chandley, 1983 ; Verma, 1990). L'hypothèse d'une base génétique pour le contrôle du taux d'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* a été émise car des différences significatives du taux d'aneuploïdie ont été observées parmi différentes familles ayant le même âge, élevées dans les mêmes conditions et où les individus échantillonnés avaient le même poids (Leitão *et al.*, 2001b). Pourtant, l'effet de l'environnement sur le taux d'aneuploïdie chez *C. gigas* restait à montrer. Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois l'influence d'un contaminant sur l'aneuploïdie chez les huîtres.

L'effet toxique de l'atrazine sur des chromosomes mammaliens a déjà été étudié. Sur des cultures de lymphocytes humains, l'atrazine n'a pas produit d'augmentations significatives dans les échanges de chromatides sœurs et les anomalies chromosomiques en dessous de 15 mg l<sup>-1</sup> (Ribas *et al.*, 1998) et 100 mg l<sup>-1</sup> respectivement (Kligerman *et al.*, 2000). Cependant, d'autres auteurs (Lioi *et al.*, 1998) en ont observé à des teneurs plus faibles variant de 1,83 à 10,97 mg l<sup>-1</sup>. De plus, l'atrazine a un potentiel clastogène dans les cellules ovariennes de hamster chinois à des concentrations saines pour l'eau potable par l'U.S. Environmental Protection Agency (Biradar et Rayburn, 1995) et dans les eaux les plus polluées de l'Illinois (Etats-Unis) (Taets *et al.*, 1998). Notre étude a permis de montrer un effet dose-dépendant de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie des huîtres creuses *C. gigas*. Selon nos données, une corrélation positive entre les concentrations en atrazine et le taux d'aneuploïdie a clairement été montrée. De plus, une augmentation significative du taux d'aneuploïdie a été observée à une concentration retrouvée dans des environnements très pollués (10 µg l<sup>-1</sup>) comparé aux témoins (sans atrazine). En parallèle, une étude immunologique a été menée et au bout de trois semaines d'exposition, aucun effet n'a été observé sur la viabilité des hémocytes, diverses activités enzymatiques, l'activité de phagocytose et le pourcentage de hyalinocytes (Gagnaire *et al.*, 2003). Les invertébrés marins accumulent l'atrazine essentiellement en filtrant l'eau (Moraga et Tanguy, 2000). Selon Solomon *et al.* (1996), ce composé n'est pas bioaccumulé sensiblement, toutefois, plusieurs auteurs ont déjà observé une bioconcentration de l'atrazine chez des poissons (Solomon *et al.*, 1996), des grenouilles (Allran et Karasov, 2001) et des algues (Shelton et Miller, 2002). Les



effets que nous avons observés pourraient donc être mis en relation avec un phénomène d'accumulation de l'atrazine par les huîtres, étant donné qu'elles ont été exposées à ce polluant pendant au moins deux mois.

Dans notre étude, l'atrazine n'a pas eu d'effet sur la mortalité des huîtres *C. gigas*. Les taux de mortalité étaient très bas, quel que soit le traitement. Ces faibles taux de mortalité sont normaux dans des conditions de culture en circuit fermé. Chez les adultes, les huîtres exposées à la plus forte concentration d'atrazine ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) ont montré le plus faible taux de mortalité (5,3%) en dépit d'une exposition pendant deux mois. Cependant, Moraga et Tanguy (2000) ont observé un taux de mortalité d'approximativement 60 – 70% à des concentrations d'atrazine de 100 et  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  après deux mois d'exposition. Ce fort taux de mortalité chez des huîtres adultes exposées seulement à 100 et  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine est aussi en contradiction avec les résultats de Robert *et al.* (1986) qui observaient des mortalités chez des larves (généralement plus sensibles aux polluants) seulement au dessus de  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Les résultats divergents entre l'étude de Moraga et Tanguy (2000) et la nôtre peuvent être dus aux différences de conditions biologiques des animaux. En effet, ces derniers n'avaient pas la même origine et ont été maintenus dans un volume d'eau de mer plus petit, renouvelé seulement toutes les 48 h.

Les résultats obtenus dans cette étude sont particulièrement importants pour les zones conchylicoles, telles que le bassin de Marennes-Oléron qui est le premier centre commercial de l'huître creuse *C. gigas* en France. Le fait que l'aneuploïdie soit liée à la croissance (Leitão *et al.*, 2001a) et que le taux d'aneuploïdie puisse être augmenté par l'atrazine est relativement important car une faible croissance des huîtres pourrait avoir un lien avec un environnement pollué. Ceci reste toutefois à prouver. La juxtaposition des activités agricoles et aquacoles qui partagent la même eau a inquiété les ostréiculteurs en particulier qui craignaient une dégradation de la qualité de l'eau. En juin 1993, une concentration de  $7,787 \mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine a été observée dans le canal de Grand-Garçon à Brouage (Charente-Maritime, France) (Munsch, 1995). Ce canal est une possible voie d'entrée de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron puisqu'il communique avec le bassin via le canal de Brouage. Cette concentration est proche de celle que nous avons testé dans notre traitement intermédiaire. Les concentrations d'atrazine sont plus élevées pendant les périodes d'épandages mais ce contaminant est aussi retrouvé en dehors des périodes d'application. Bien que nous ayons observé 20% de dégradation de l'atrazine au bout de 24 heures dans nos études en milieu contrôlé, cet herbicide et ses dérivés sont persistants. Par exemple, dans le canal de Grand-

Garçon, les concentrations d'atrazine étaient supérieures à  $2 \mu\text{g l}^{-1}$  de fin avril à début juillet (période d'épandage), mais une faible concentration était toujours présente en septembre ( $106 \text{ ng l}^{-1}$ ) (Munsch, 1995). L'atrazine est épandue pendant la période de reproduction des huîtres donc nous pensions que cela pourrait avoir un impact sur le recrutement larvaire. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé une exposition à l'atrazine pendant un élevage larvaire. Il aurait été intéressant d'étudier l'aneuploïdie au stade larvaire mais le protocole mis au point à ce stade de développement ne nous permettait pas l'analyse d'un nombre suffisant de métaphases. Une taille minimale étant nécessaire pour réaliser les analyses au stade juvénile, l'exposition à l'atrazine pendant trois semaines a donc été suivie d'une période en milieu non pollué pendant six mois. De plus forts taux d'aneuploïdie ont été observés seulement pour les lots exposés à  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine. Nous aurions pu penser que cette concentration était une dose seuil au-delà de laquelle un impact pouvait être observé. Or, nous n'avons pas observé cette hausse du taux d'aneuploïdie pour les lots de plus forte concentration ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Nous pouvons suggérer que les larves exposées à la plus forte concentration d'atrazine aient été plus aneuploïdes, les plus aneuploïdes étant mortes. Ceci est une supposition étant donné qu'à l'heure actuelle, aucune relation entre mortalité et aneuploïdie n'a été établie. Il serait très intéressant de savoir si au-delà d'un certain seuil d'aneuploïdie, les animaux meurent. Il est difficile de répondre à cette question vu que 1) nous ne pouvons analyser que du matériel vivant, en activité mitotique et 2) la technique étant létale, nous ne pouvons faire de suivi individuel dans le temps.

### **3 Persistance de l'effet observé**

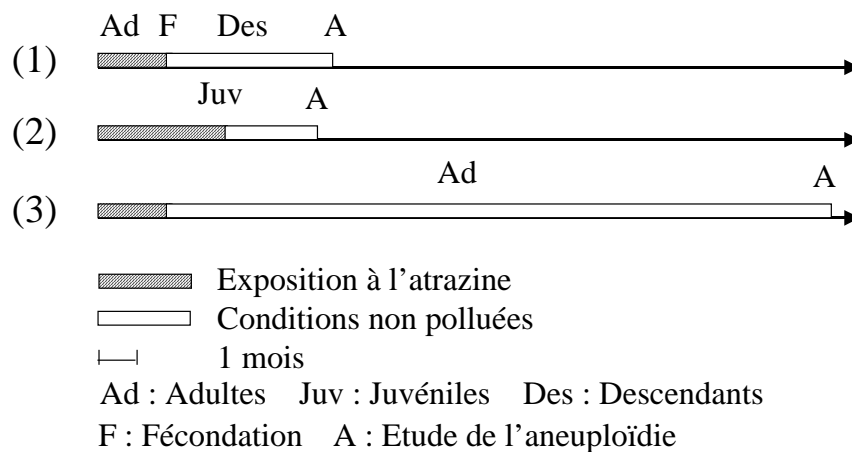
#### **3.1 Introduction**

L'effet de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes et juvéniles ayant été démontré précédemment, il était intéressant de voir si cet effet persistait entre les générations et dans le temps. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine. Ensuite, nous avons transféré le reste des huîtres adultes et juvéniles dans des conditions non polluées pendant des périodes plus ou moins longues afin d'observer ou non la réversibilité du phénomène.

## 3.2 Matériels et méthodes

### 3.2.1 Descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine

Des fécondations ont été réalisées pour chacun des 6 lots d'adultes selon la méthodologie présentée en Partie II. Les croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été dupliqués afin d'avoir un réplicat pour chaque lot et 12 lots ont donc été élaborés. Les huîtres juvéniles issues de ces croisements ont été conservées à l'écloserie jusqu'à la fixation des tissus réalisée 4 mois et demi après la fécondation (Figure 26).



**Figure 26 : Diagramme résumant différentes expériences : (1) Descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine. (2) Huîtres juvéniles exposées à l'atrazine puis transférées dans des conditions non polluées. (3) Huîtres adultes exposées à l'atrazine puis transférées dans des conditions non polluées.**

### 3.2.2 Transfert dans des conditions non polluées

#### *3.2.2.1 Juvéniles*

Le reste des huîtres juvéniles exposées aux différentes concentrations d'atrazine pendant trois mois et demi a été transféré dans des conditions non polluées au sein de l'écloserie pendant une période additionnelle de deux mois et demi (Figure 26).

### 3.2.2.2 *Adultes*

Le surplus d'huîtres adultes exposées à l'atrazine pendant deux mois a aussi été transféré dans des conditions non polluées pendant une période de temps plus longue d'un an et demi (Figure 26). Les huîtres ont été placées en mer, puis en claire, avant de revenir à l'écloserie. Ensuite, elles ont été conditionnées en salle de maturation pendant un mois et demi.

### 3.2.3 Comptages chromosomiques

Pour l'étude de la descendance, 30 individus par lot ont été comptabilisés. En ce qui concerne les juvéniles transférés dans des conditions non polluées, 14 individus par lot ont été étudiés. Pour les adultes transférés dans des conditions non polluées, seulement 10 individus par lot ont pu être examinés. Nous n'avons pas toujours étudié le même nombre d'individus par lot. En effet, 10 individus par lot est une base acceptable pour les études statistiques mais nous avons souhaité augmenter ce nombre pour augmenter notre effectif. Par contre, le fait d'étudier 30 individus par lot soit 180 individus pour une seule expérimentation représente un temps de lecture au microscope énorme donc, nous avons dû revenir ensuite à un nombre plus faible d'individus analysés par lot pour permettre la réalisation de toutes les études envisagées.

### 3.2.4 Analyses statistiques

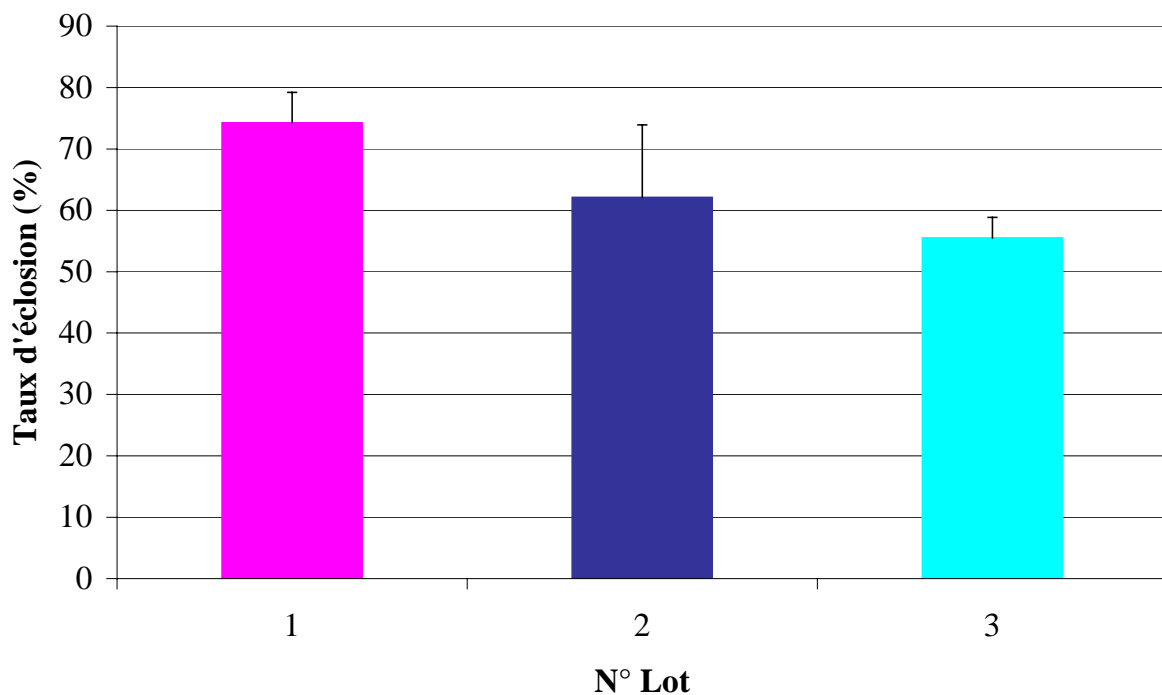
De même, les effets des lots ont été testés avec une analyse de variance à deux facteurs (lots et réplicats) sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). De plus, des analyses de variance à trois facteurs ont aussi été utilisées afin de comparer les résultats entre les parents et les descendants, entre les juvéniles exposés à l'atrazine et ceux transférés dans des conditions non polluées et entre les adultes exposés à l'atrazine et ceux transférés dans des conditions non polluées.

### **3.3 Résultats**

#### **3.3.1 Descendance d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à l'atrazine**

##### ***3.3.1.1 Taux d'éclosion***

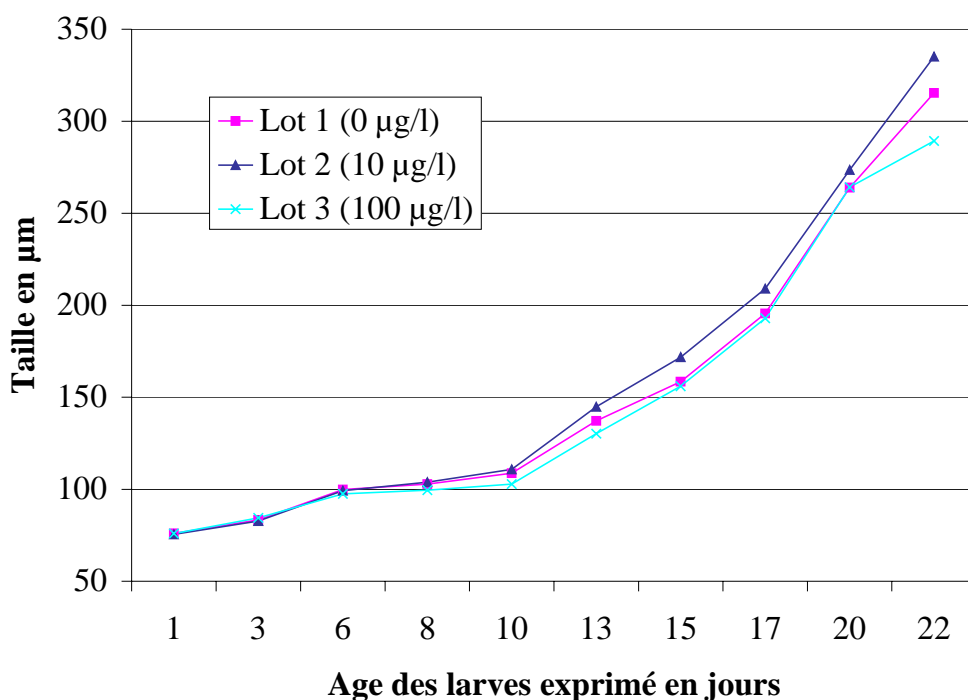
Les lots où les géniteurs ont été exposés à de l'atrazine ont montré un taux d'éclosion plus faible que les lots témoins (Figure 27). La présence d'atrazine dans le milieu où étaient les géniteurs a montré un effet négatif significatif sur le taux d'éclosion. En effet, les valeurs du test *G* entre les lots 1 et 2, 1 et 3, et 2 et 3 respectivement (123,35 ; 173,14 et 70,11) étaient toutes supérieures à la valeur critique (20,09) à un risque d'erreur de 5%.



**Figure 27 : Taux d'éclosion de la descendance d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différents traitements d'atrazine : lot 1 ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 3 ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).**

### 3.3.1.2 Croissance larvaire

Les descendances des huîtres *Crassostrea gigas* ayant été exposées aux différentes concentrations d'atrazine n'ont pas montré de différences significatives au niveau de leur croissance larvaire (Figure 28). Un test  $F$  de Fisher-Snedecor a permis d'établir que les différentes séries de croissance étaient corrélées et qu'elles obéissaient donc à une même loi de croissance. En effet, les valeurs du test  $F$  entre les lots 1 et 2, 1 et 3, et 2 et 3 respectivement (69,33 ; 17,25 et 11,97) étaient toutes supérieures à la valeur critique (9,38) à un risque d'erreur de 5%. De plus, les valeurs des coefficients de corrélation  $R$  (0,9920 ; 0,9968 et 0,9954) étaient toutes supérieures à la valeur critique de la distribution de Student ( $t=0,38$ ) pour un risque d'erreur de 5%.

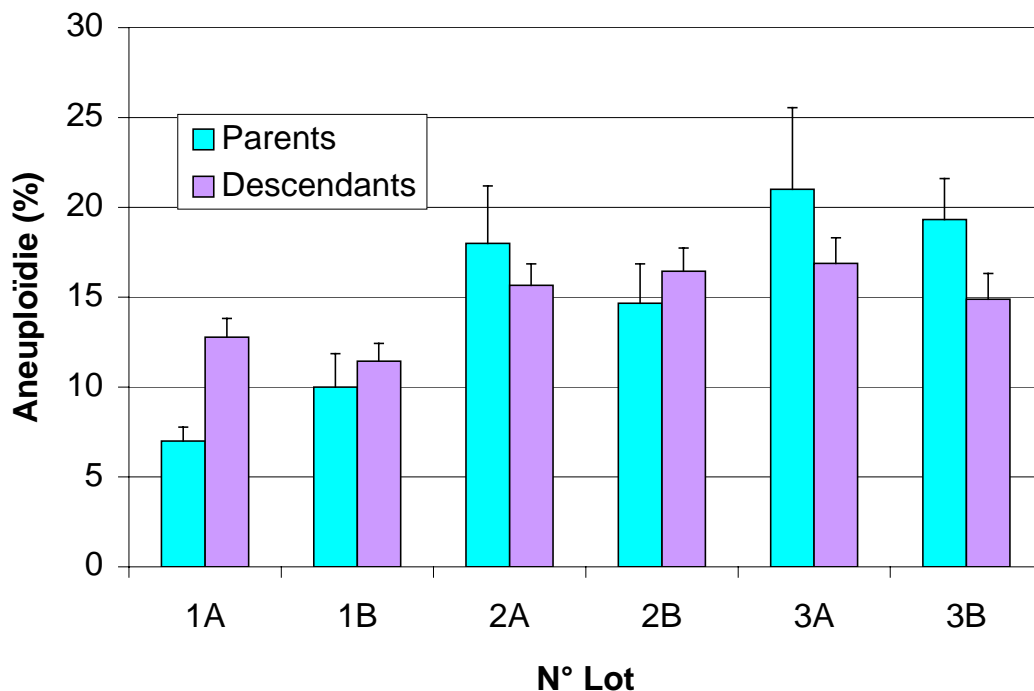


**Figure 28 : Taille des larves (en  $\mu\text{m}$ ) descendantes d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à de l'atrazine en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.**

### 3.3.1.3 Aneuploïdie

Les résultats d'aneuploïdie pour la descendance d'huîtres exposées à l'atrazine sont présentés sur la Figure 29. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de

différence significative entre les réplicats ( $F=0,711$  ;  $p=0,400$ ) mais que des différences significatives existaient selon les traitements reçus par les parents ( $F=6,503$  ;  $p=0,002$ ). Le taux d'aneuploïdie des descendants a augmenté en fonction du traitement d'atrazine reçu par les parents. En réalité, des différences significatives ont été observées entre les témoins et les lots exposés à  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine ( $F=12,071$  ;  $p=0,001$ ) ou  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  d'atrazine ( $F=9,373$  ;  $p=0,003$ ) mais pas entre les lots exposés à différentes concentrations d'atrazine ( $F=0,016$  ;  $p=0,901$ ).



**Figure 29 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* exposées à l'atrazine (parents) et de leurs descendants en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).**

### 3.3.2 Comparaison entre les parents exposés à l'atrazine et leurs descendants

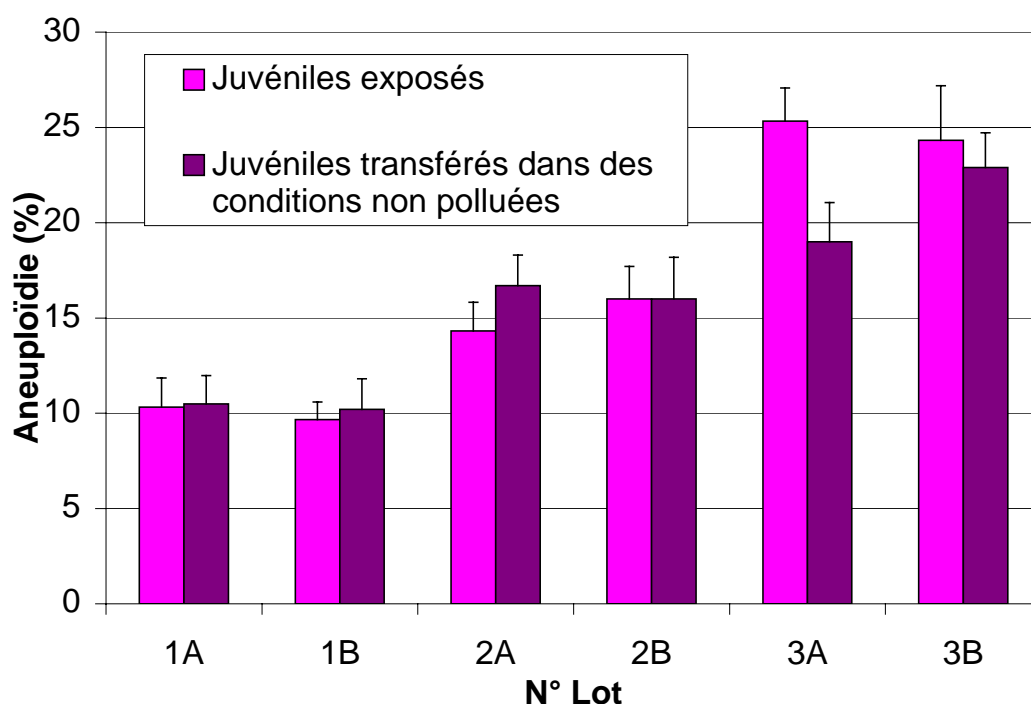
Les taux d'aneuploïdie des parents ont été comparés à ceux des descendants (Figure 29). Une analyse statistique a montré aucune différence significative entre les réplicats ( $F=0,492$  ;  $p=0,484$ ), des différences significatives entre les traitements ( $F=18,516$  ;  $p<0,001$ ) et aucune différence significative entre les parents et leurs descendants ( $F=0,085$  ;  $p=0,771$ ). Si nous comparons deux à deux chaque traitement, nous observons bien des différences

significatives entre les lots 1 et 2 ( $F=25,533$  ;  $p<0,001$ ) et entre les lots 1 et 3 ( $F=34,016$  ;  $p<0,001$ ) mais pas entre les lots 2 et 3 exposés à différentes concentrations d'atrazine ( $F=1,553$  ;  $p=0,215$ ).

### 3.3.3 Transfert dans des conditions non polluées

#### 3.3.3.1 *Huîtres juvéniles*

Les résultats d'aneuploïdie pour les huîtres juvéniles exposées à l'atrazine pendant trois mois et demi puis transférées dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi sont présentés sur la Figure 30. Les lots qui ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine précédemment ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins.



**Figure 30 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).**



Des analyses statistiques ont révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F=0,416$  ;  $p=0,521$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F=17,242$  ;  $p<0,001$ ). Si nous comparons chaque lot deux à deux, nous observons des différences significatives entre les lots 1 et 2 ( $F=11,665$  ;  $p=0,001$ ), 2 et 3 ( $F=36,554$  ;  $p<0,001$ ) et 1 et 3 ( $F=5,814$  ;  $p=0,019$ ).

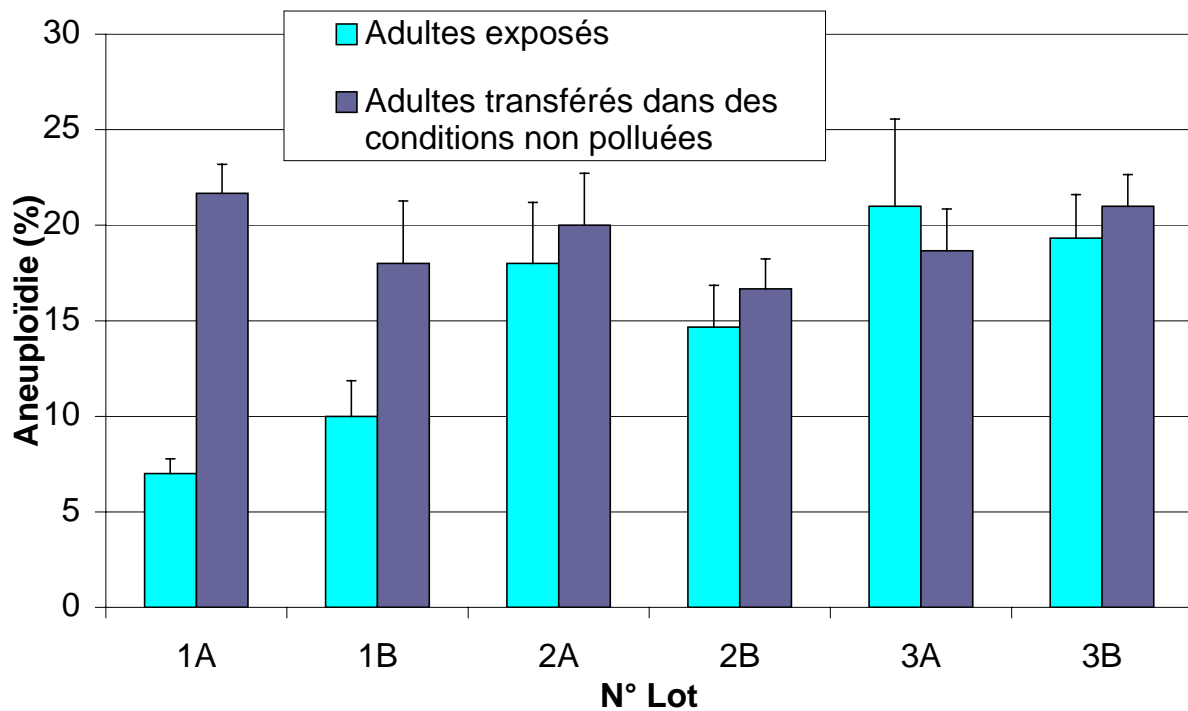
Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les juvéniles exposés à l'atrazine pendant trois mois et demi (Figure 30). Une analyse statistique a montré qu'il n'existait aucune différence significative entre ces deux groupes de juvéniles ( $F=0,546$  ;  $p=0,461$ ), qu'il existait bien des différences significatives entre les traitements ( $F=46,964$  ;  $p<0,001$ ) et qu'il n'y avait aucune différence significative entre les réplicats ( $F=0,197$  ;  $p=0,658$ ). Si nous comparons chaque lot deux à deux, nous observons aussi des différences significatives entre les lots 1 et 2 ( $F=21,433$  ;  $p<0,001$ ), 2 et 3 ( $F=94,085$  ;  $p<0,001$ ) et 1 et 3 ( $F=25,218$  ;  $p<0,001$ ).

### 3.3.3.2 Huîtres adultes

Les résultats d'aneuploïdie pour les huîtres adultes exposées à l'atrazine pendant deux mois puis transférées dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi sont présentés sur la Figure 31. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,719$  ;  $p=0,400$ ) ni entre les traitements ( $F=0,297$  ;  $p=0,744$ ). De plus, si nous comparons deux à deux chaque lot, nous n'observons aucune différence significative ni entre les réplicats ni entre les traitements.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les adultes exposés à l'atrazine pendant deux mois (Figure 31). L'analyse statistique nous a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les réplicats ( $F=0,591$  ;  $p=0,444$ ) et qu'il existait une différence significative à la fois entre les traitements ( $F=5,446$  ;  $p=0,006$ ) et entre les deux groupes d'adultes ( $F=8,994$  ;  $p=0,003$ ). Entre les lots 1 et 2, des différences significatives ont été observées entre les deux groupes d'adultes ( $F=17,011$  ;  $p<0,001$ ) mais pas entre les traitements ( $F=3,838$  ;  $p=0,054$ ). Entre les lots 1 et 3, des différences significatives ont été observées à la fois entre les deux groupes d'adultes ( $F=9,609$  ;  $p=0,003$ ) et entre les traitements ( $F=10,809$  ;  $p=0,002$ ). Par contre, entre les lots 2 et 3, aucune différence

significative n'a été observée ni entre les deux groupes d'adultes ( $F=0,191$  ;  $p=0,663$ ) ni entre les traitements ( $F=1,957$  ;  $p=0,166$ ).



**Figure 31 :** Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

### 3.4 Discussion

Nous avons établi précédemment qu'un polluant (l'atrazine) pouvait augmenter le taux d'aneuploïdie chez des huîtres creuses *Crassostrea gigas*. L'étude de la persistance de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez *C. gigas* est d'une importance particulière car l'atrazine peut causer des dommages irréversibles sur le matériel génétique.

L'atrazine est retrouvé tout au long de l'année dans les zones adjacentes aux terrains agricoles et en particulier pendant la période d'épandage, donc cela peut avoir un impact négatif sur les organismes aquatiques pendant leurs périodes de reproduction. Notre première expérimentation était par conséquent particulièrement importante puisque la maturation des parents a eu lieu pendant une exposition à l'atrazine. Nous avons examiné la descendance de cette population d'huîtres exposées à l'atrazine pendant deux mois et nous

avons observé une augmentation significative du taux d'aneuploïdie aux deux concentrations testées par rapport aux témoins. De plus, une analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives entre les parents et les descendants. En effet, la descendance issue de parents exposés à l'atrazine a aussi montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que la descendance issue des témoins. Ce résultat montre clairement que l'impact observé de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez *C. gigas* persiste à la génération suivante. Deux hypothèses peuvent être suggérées : il s'agit d'un effet héréditaire induit, ou bien cet effet négatif a été transmis via les réserves maternelles pendant le développement larvaire. Il aurait été intéressant d'étudier l'aneuploïdie à un stade plus précoce, en particulier au stade larvaire, afin de savoir à quel moment ce phénomène apparaît. Nos résultats supportent l'hypothèse d'une base génétique pour le contrôle de l'aneuploïdie chez l'huître creuse *C. gigas* émise par Leitão *et al.* (2001b). En effet, les parents ayant le plus fort taux d'aneuploïdie ont une descendance avec un taux d'aneuploïdie plus élevé.

Dans notre étude, la présence d'atrazine dans l'environnement des parents a eu un effet sur le taux d'éclosion de leur descendance, mais pas sur la croissance larvaire. Robert *et al.* (1986) ont étudié la toxicité de l'atrazine sur la formation et la croissance de jeunes larves de *C. gigas*. Ils ont observé une croissance larvaire anormale au delà de 0,5 mg l<sup>-1</sup> et des mortalités au delà de 1 mg l<sup>-1</sup>. Ce résultat positif comparé au nôtre a probablement été observé parce que les larves elles-mêmes ont été directement exposées à l'atrazine et parce que les concentrations utilisées étaient beaucoup plus élevées. Si les parents avaient été exposés plus longtemps à l'atrazine dans notre étude, peut-être cela aurait-il pu avoir une influence sur la croissance des larves ou des juvéniles.

Cette étude nous a aussi permis de montrer que les effets de l'atrazine persistaient après un retour dans des conditions non polluées de deux mois et demi. En effet, les taux d'aneuploïdie d'un échantillon de la population de juvéniles précédemment exposés à l'atrazine puis transférés dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi sont restés significativement différents selon les traitements appliqués. Ce résultat pourrait indiquer que les dommages génétiques causés par l'exposition à l'atrazine sont irréversibles. Cependant, nous avons seulement laissé les huîtres juvéniles dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi, une période plus longue dans un environnement « propre » pourrait peut-être nous montrer si la réversibilité de l'aneuploïdie augmente étant donné que les cellules sont renouvelées. Cependant, si les huîtres bioaccumulent l'atrazine mais ne possèdent pas de mécanismes de détoxification, il se

pourrait que les dommages génétiques ne puissent pas être réparés même si les cellules sont renouvelées. Très peu de données existent sur l'accumulation de l'atrazine par les huîtres. Lehotay *et al.* (1998) n'ont pas détecté d'atrazine au sein des huîtres de Chesapeake Bay, même si les concentrations dans l'eau étaient de  $0,432 \mu\text{g l}^{-1}$ , cependant, cette concentration est beaucoup plus basse que celles que nous avons testé. A notre connaissance, aucun mécanisme de détoxification pour ce composé n'a encore été identifié. Nous pourrions aussi avoir des dommages génétiques irréversibles via l'expression des gènes. En effet, étant donné que des substances toxiques ont le potentiel d'endommager l'ADN de bivalves (Steinert *et al.*, 1998 ; Dixon et Wilson, 2000), elles pourraient par conséquent endommager les gènes et leur expression.

Au vu des résultats obtenus après retour dans des conditions non polluées pendant un an et demi des huîtres adultes, nous pourrions penser que l'impact observé au bout de deux mois d'exposition à l'atrazine n'a pas persisté dans le temps et qu'il existerait donc des mécanismes de détoxification. Or, les taux d'aneuploïdie observés après retour dans des conditions non polluées sont aussi élevés que ceux observés dans le lot ayant reçu la plus forte concentration d'atrazine donc nous ne pouvons pas conclure sur une persistance de l'effet observé ou non. Ce fort taux d'aneuploïdie retrouvé même chez les témoins est-il dû à des conditions environnementales particulières? Il est difficile de statuer sur les conditions d'un environnement naturel car de nombreux polluants peuvent y être présents en quantité plus ou moins faible. Le groupe d'adultes qui avait été remis normalement dans des conditions supposées non polluées avait aussi un indice mitotique plus faible que lors de la première expérience. En effet, pour certains individus, plusieurs lames ont été requises pour trouver 30 métaphases comptables. Cette faible activité mitotique a-t-elle pu avoir une influence sur la fragilité chromosomique (aneuploïdie) observée ou bien y a-t-il eu un problème avec ces animaux qui pourrait expliquer l'observation de taux d'aneuploïdie élevés et que l'indice mitotique ne soit pas bon ?

## **4 Identification des chromosomes manquants par digestion enzymatique**

### **4.1 Introduction**

Une perte préférentielle de certains chromosomes dans les cellules aneuploïdes d'huîtres *Crassostrea gigas* a déjà été montrée par Leitão *et al.* (2001c) par la technique de marquage en bandes G. En effet, seulement 4 parmi les 10 paires de chromosomes de *C. gigas* (1, 5, 9 et 10 avec des pourcentages de 56, 19, 33 et 43 respectivement) sont affectées par la perte d'un des deux homologues. Nous souhaitons savoir si les mêmes chromosomes sont affectés lorsqu'un facteur environnemental précis intervient. En d'autres termes, nous voulons savoir si l'aneuploïdie agit toujours sur les mêmes chromosomes ou bien si certains facteurs agissent sur différents chromosomes cibles. Pour cela, les chromosomes manquants dans des caryotypes aneuploïdes, obtenus à partir d'une expérience où l'atrazine a induit le phénomène de l'aneuploïdie, ont été déterminés et comparés aux chromosomes manquants dans des caryotypes aneuploïdes observés sans action de l'atrazine. Les lames des huîtres adultes ou juvéniles ayant subi une exposition à l'atrazine n'étant pas utilisables (trop peu de métaphases allongées), les lames des descendants des huîtres exposées à l'atrazine ont été utilisées pour déterminer si une induction même indirecte de l'aneuploïdie par l'atrazine touche les mêmes chromosomes. Grâce à une collaboration franco-portugaise, ces analyses ont pu avoir lieu au Centro de Genética e Biotecnologia de l'Universidade de Trás-os-Montes et Alto Douro CGB-UTAD à Vila Real (Portugal) en utilisant la technique de marquage avec des enzymes de restriction. Cette technique a déjà eu du succès chez quelques espèces de bivalves comme les moules (Martínez-Lage *et al.*, 1994), les peignes (Gajardo *et al.*, 2002) et les huîtres (Leitão *et al.*, sous presse).

## **4.2 Matériels et méthodes**

### **4.2.1 Matériel biologique**

Les lames des descendants des huîtres exposées à l'atrazine ont été utilisées afin d'identifier les chromosomes manquants par la méthode de marquage par digestion d'enzymes de restriction car nous avons plus de matériel à disposition pour ces lots et elles étaient plus récentes. De plus, au fil du temps, l'ADN peut se dégrader donc il était préférable d'utiliser le matériel le plus récent possible. Cette technique utilisant des enzymes de restriction permet de réaliser un marquage sur les chromosomes (différent selon la paire chromosomique) et donc d'identifier chaque paire chromosomique.

### **4.2.2 Digestion enzymatique**

Les lames ont tout d'abord été décolorées dans deux bains successifs de méthanol-acide acétique (3 : 1). Les lames ont ensuite été vieillies dans une étuve sèche à 65°C pendant 6 h. Puis, les lames ont été soumises toute la nuit à la digestion enzymatique. Nous avons utilisé l'enzyme de restriction *Hae* III. L'enzyme a été diluée dans le tampon indiqué par le fournisseur (Invitrogen, Life Technologies) de façon à obtenir une concentration finale de 30 U pour 100 µl. La solution avec l'enzyme de restriction ainsi préparée (100 µl) a été dispersée sur chaque préparation chromosomique en utilisant une lamelle. La digestion s'est déroulée la nuit dans une chambre humide placée dans une étuve à 37°C. Après l'incubation, les lames ont été lavées 2 fois avec de l'eau ultra pure, à température ambiante, puis séchées. Les préparations ont ensuite été colorées pendant 20 min au Giemsa (1%).

### **4.2.3 Analyse des métaphases aneuploïdes**

Un microscope optique Zeiss Axioplan 2 Imaging, une caméra digitale AxioCam et le logiciel Axio Vision ont été utilisés afin de visualiser les métaphases aneuploïdes sur un ordinateur. Les caryotypes ont été réalisés à partir d'Adobe Photoshop (version 5.0). Seules

les fonctions de contraste, couche et optimisation des couleurs affectant l'image entière ont été utilisées.

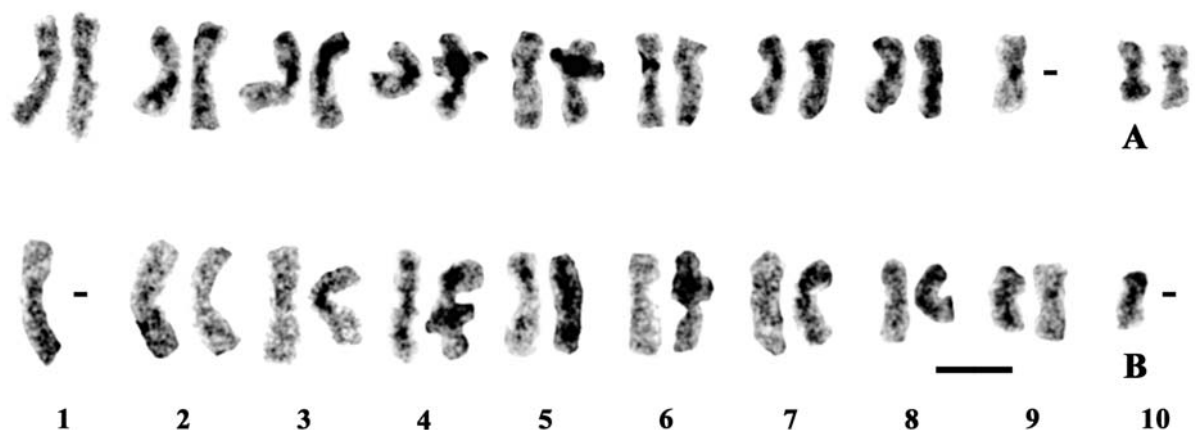
Nous avons analysé 26 caryotypes marqués avec l'enzyme *Hae* III mais aussi 26 caryotypes standards, c'est-à-dire réalisés en mesurant uniquement la taille des paires chromosomiques.

#### 4.2.4 Analyse statistique

Le test du  $\chi^2$  a été utilisé afin de comparer le pourcentage de perte de chromosomes d'une population d'huîtres où de l'aneuploïdie a été observée naturellement à notre population où l'aneuploïdie a été induite chimiquement.

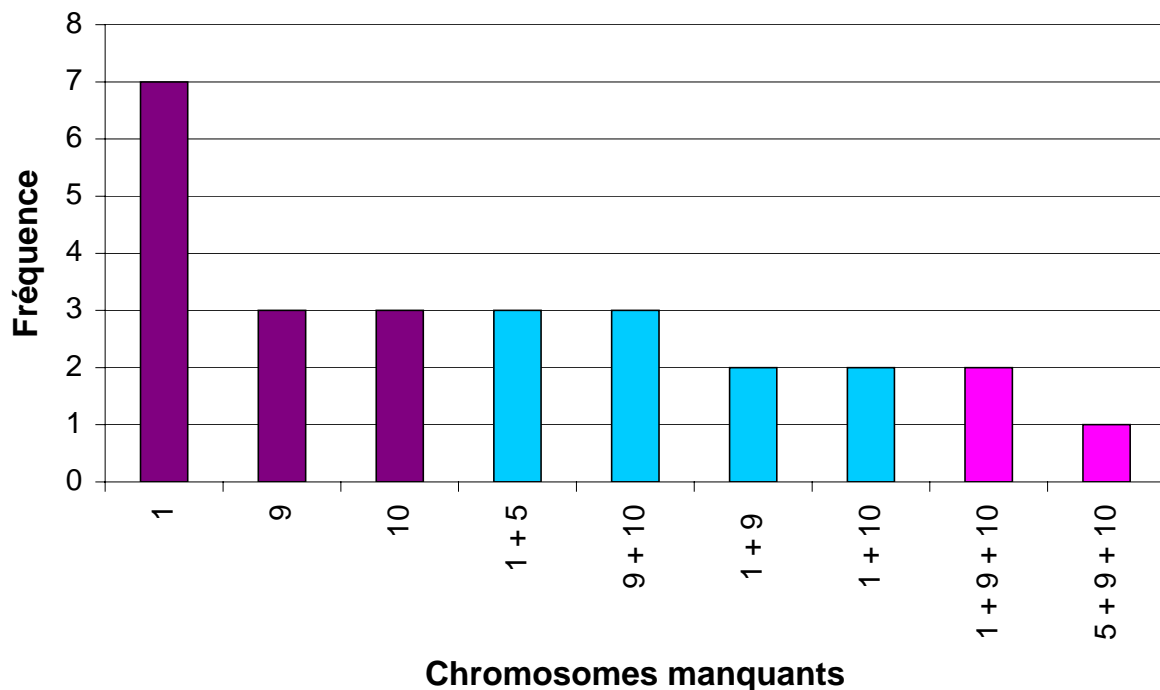
### 4.3 Résultats

L'analyse de tous les caryotypes aneuploïdes des huîtres étudiées a montré que seulement 4 des 10 paires de chromosomes (1, 5, 9 et 10) étaient affectées par la perte d'un chromosome. L'absence des deux chromosomes homologues dans une paire chromosomique n'a jamais été observée. Ainsi, une, deux ou trois paires peuvent être affectées par la perte d'un chromosome dans un caryotype (Figure 32).



**Figure 32 : Caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III chez des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées indirectement par l'atrazine. (A) Perte d'un chromosome dans la paire 9. (B) Perte de deux chromosomes dans les paires 1 et 10. Echelle = 5  $\mu$ m.**

Les pourcentages de perte de chromosomes, indépendamment calculés pour chaque paire dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III sont présentés dans le Tableau 5. Parmi les 26 métaphases observées, 42 chromosomes étaient manquants étant donné que 13, 10 et 3 métaphases avec  $2n=19$ , 18 et 17 chromosomes respectivement ont été analysées. Différentes combinaisons de chromosomes perdus ont été observées (Figure 33). Il est intéressant de noter que la paire de chromosome 1 a été préférentiellement perdue seule en comparaison avec les paires 9 et 10, et que la perte de chromosome 5 n'a jamais été perdue seule.



**Figure 33 : Fréquence de chromosomes manquants dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III réalisés à partir de la descendance d'huîtres exposées à l'atrazine.**

En parallèle, le même nombre de métaphases non marquées a été étudié afin de compléter cette étude. Ainsi, 26 caryotypes standards ont été réalisés en se basant uniquement sur la taille des chromosomes pour différencier les paires chromosomiques. Les pourcentages de perte de chromosomes étaient respectivement de 46, 4, 15 et 46% pour les paires 1, 5, 9 et 10 (Tableau 5). Cependant, l'identification de ces paires n'est pas aussi précise qu'avec le marquage, en particulier pour la paire 5, une paire de taille moyenne, et pour les paires 9 et 10



qui sont difficiles à différencier avec précision. Les résultats obtenus avec le marquage par digestion enzymatique sont en accord avec ceux de Leitão *et al.* (2001c) qui ont observé, à partir de 95 caryotypes aneuploïdes marqués avec des bandes G, issus d'huîtres du milieu naturel, 56, 19, 33 et 43% de perte de chromosomes dans les paires 1, 5, 9 et 10 respectivement (Tableau 5). Un test de  $\chi^2$  a révélé qu'il n'existait pas de différences significatives entre la perte chromosomique induite chimiquement et la perte chromosomique naturelle. En effet, les valeurs calculées de  $\chi^2$  étaient de 0,28 ; 0,17 ; 0,84 et 0,01 pour les paires 1, 5, 9 et 10 respectivement. Ces valeurs sont toutes inférieures à la valeur critique (3,84) pour un risque d'erreur de 5%.

**Tableau 5 : Pourcentage de perte de chromosomes dans des cellules en métaphase de *Crassostrea gigas* pour chaque paire perdue avec trois méthodes d'analyse de caryotypes (Marquage avec enzyme de restriction *Hae* III, pas de marquage et marquage avec bandes G).**

Technique	Nombre de métaphases	Nombre de chromosomes manquants	Pourcentage de perte de chromosomes dans la paire :			
			1	5	9	10
Marquage avec enzyme de restriction <i>Hae</i> III	26	42	61	15	42	42
Pas de marquage (Méthode standard)	26	29	46	4	15	46
Marquage avec bandes G (Leitão <i>et al.</i> 2001c)	95	143	56	19	33	43

#### **4.4 Discussion**

Le marquage par digestion enzymatique a révélé des bandes claires et caractéristiques, permettant d'identifier individuellement chaque paire chromosomique. En ce qui concerne les caryotypes standards, l'identification des chromosomes homologues, réalisée seulement par mesure de la taille et de l'index centromérique, est moins évidente car cela dépend principalement du degré de condensation de la chromatine. Le modèle de marquage obtenu avec l'enzyme de restriction *Hae* III était uniforme entre les paires de chromosomes homologues, confirmant que cette technique est fiable pour des études de marquage

chromosomique chez les huîtres comme démontré dans Leitão *et al.* (sous presse). Le pourcentage de perte de chromosome observé pour la paire 5 est significativement plus faible que ceux des paires 1, 9 et 10. Par conséquent, les paires 1, 9 et 10 peuvent être considérées comme celles affectées de manière prédominante dans les cas d'aneuploïdie induite par l'exposition à un polluant comme l'atrazine. Ce résultat est identique à celui observé par Leitão *et al.* (2001c) dans un cas d'aneuploïdie « naturelle » à partir de 95 caryotypes marqués avec des bandes G. Par conséquent, aucun effet spécifique de l'atrazine sur la perte chromosomique n'a été observé. Le marquage par digestion enzymatique est plus fiable que le marquage en bandes G car cette dernière technique de marquage classique présente quelques inconvénients tels que : répétitivité limitée, investissement lourd en terme de temps et perte de marquage parfois pendant la procédure d'hybridation par fluorescence *in situ* (Leitão *et al.*, sous presse). De plus, le marquage par digestion enzymatique permet une meilleure préservation de la morphologie des chromosomes représentant un avantage supplémentaire pour l'identification des chromosomes chez les huîtres étant donné qu'il est toujours impossible de réaliser des cultures de tissus chez cette espèce. En effet, nos chromosomes sont préparés directement à partir des animaux, par conséquent, ils ont une morphologie assez pauvre par comparaison avec des chromosomes issus de cultures de tissus (Leitão *et al.*, sous presse).

Un tel phénomène de perte préférentielle de chromosomes a déjà été observé chez d'autres espèces. Cieplinski *et al.* (1983) ont montré une dépendance statistiquement significative parmi les modèles de perte de chromosomes spécifiques au sein de cultures cellulaires de myélomes issus d'hybrides homme-souris, avec certains chromosomes préférentiellement retenus et d'autres perdus plus souvent que nous pourrions l'espérer sous l'hypothèse du hasard de la ségrégation. Bien que plusieurs études aient déjà montré que l'aneuploïdie pouvait être induite par des produits chimiques, en particulier chez l'homme et les rongeurs (ex : Leopardi *et al.*, 1993, Güerci *et al.*, 2000 ; Parry et Sors, 1993 ; Bourner *et al.*, 1998), très peu d'études existent sur l'identification des chromosomes perdus suite à une exposition à des produits chimiques. Chez les humains, les métabolites du benzène ont induit la perte d'une partie ou d'un chromosome entier des paires 5 et/ou 7 qui sont impliqués dans le développement de la leucémie myéloïde (Stillman *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998). Chez les invertébrés, aucune étude n'a encore été rapportée sur l'identification de chromosomes perdus suite à une pollution environnementale. De plus, très peu d'études ont porté sur

l'identification de chromosomes dans des caryotypes aneuploïdes au sein de ce groupe d'animaux (Leitão *et al.*, 2001c).

## **5 Conclusion**

Pour la première fois, une cause environnementale pour l'aneuploïdie chez les huîtres a pu être établie. En effet, nos études ont montré une corrélation positive entre la présence d'atrazine et le taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* à des stades juvénile et adulte. Au stade larvaire, l'étude n'a malheureusement pas pu être réalisée. De plus, l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie persiste à la génération suivante, ce qui semble confirmer l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce phénomène. Après une courte période de deux mois et demi dans des conditions non polluées, les huîtres juvéniles qui avaient été exposées à l'atrazine ont continué à montrer un taux d'aneuploïdie significativement différent selon les traitements. Ainsi, l'impact observé persisterait dans le temps. Une période de « décontamination » plus longue d'un an et demi n'a malheureusement pas pu confirmer cet effet à cause d'un fort taux d'aneuploïdie retrouvé même chez les témoins. Par contre, l'atrazine n'a pas eu d'effet spécifique sur l'identité des paires de chromosomes absentes dans les cellules aneuploïdes.

De fortes quantités d'atrazine sont donc susceptibles d'influencer le taux d'aneuploïdie chez *C. gigas*, mais la concentration intermédiaire testée dans notre étude est tout de même très rare dans les environnements marins et estuariens. L'effet de l'atrazine n'est pas à négliger mais il n'est probablement pas le seul contaminant à pouvoir intervenir dans les variations du taux d'aneuploïdie rencontrées dans le milieu naturel.

Ainsi, nous venons de montrer que cet herbicide pouvait causer des dommages génétiques importants chez l'huître creuse *C. gigas*. Nos résultats supportent donc la législation qui a interdit l'utilisation en France de l'atrazine depuis le 30 septembre 2003.



**Partie IV :**  
**Impact du cadmium sur l'aneuploïdie**  
**chez les huîtres *Crassostrea gigas***



*Huîtres Crassostrea gigas juvéniles, descendantes d'huîtres exposées  
au cadmium en phase de grossissement*



## **Partie IV : Impact du cadmium sur l'aneuploïdie chez les huîtres *Crassostrea gigas***

### **1 Introduction**

L'atrazine est un facteur environnemental qui a un effet sur le taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* mais d'autres polluants pourraient également intervenir. Nous avons choisi d'étudier un métal lourd, le cadmium car il est très présent dans le bassin de Marennes-Oléron à cause des apports des eaux girondines. Toutefois, le cadmium est un polluant rémanent présent naturellement dans notre environnement. Par le jeu des flux géochimiques, le cadmium atteint le milieu marin où il est bioaccumulé par les organismes vivants. Une étude réalisée sur 110 espèces dans le bassin de Marennes-Oléron a montré que seules certaines espèces appartenant toutes à l'embranchement des Mollusques concentrent fortement ce métal (Miramand *et al.*, 2000). De nombreuses études ont évalué la toxicité du cadmium, et en particulier chez les huîtres (ex : Robert et His, 1985 ; Amiard-Triquet *et al.*, 1998 ; Gagnaire *et al.*, 2004). De plus, le chlorure de cadmium est capable d'induire des dommages chromosomiques (ex : Natarajan, 1993), mais a aussi des propriétés aneugènes (ex : Seoane *et al.*, 2000). Ce sont toutes ces raisons qui nous ont amené à choisir le cadmium pour continuer notre approche environnementale en milieu contrôlé.

Pour évaluer l'impact du cadmium sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas*, nous exposerons au cadmium tout d'abord des huîtres à différents stades de développement, puis, si un effet est observé sur les huîtres adultes, nous chercherons à savoir si cet effet persiste à la génération suivante.

### **2 Impact à différents stades de développement**

#### **2.1 Introduction**

Afin d'évaluer l'impact du cadmium sur le taux d'aneuploïdie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des huîtres adultes et juvéniles ont été exposées à différentes concentrations de cadmium en milieu contrôlé.

## 2.2 Matériels et méthodes

### 2.2.1 Matériel biologique

Des huîtres creuses japonaises adultes, *Crassostrea gigas*, âgées de trois ans ont été placées en quarantaine au laboratoire IFREMER de La Tremblade en mars 2002. Des huîtres juvéniles provenant d'un croisement réalisé au sein du laboratoire fin mars 2002 ont été mises dans la salle de maturation selon les mêmes conditions que les adultes (Figure 34). Ces huîtres juvéniles étaient issues du lot 10 de la sélection divergente haute du programme MOREST sur l'étude des mortalités estivales.



**Figure 34 : Huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium dans des aquariums.**

### 2.2.2 Exposition au cadmium

Ces huîtres adultes et juvéniles ont été exposées à du cadmium dilué dans de l'eau de mer directement pompée à partir du bassin de Marennes-Oléron. Le chlorure de cadmium a été choisi pour réaliser cette étude car en milieu marin, le Cd est majoritairement sous forme dissous  $\text{CdCl}_2$  (Miramand *et al.*, 2000). Une forme solide de  $\text{CdCl}_2$  (Sigma) a été utilisée afin



de réaliser différentes solutions de cadmium. De l'eau de mer provenant du bassin de Marennes-Oléron a été utilisée comme témoin (traitement 1). Les traitements de cadmium appliqués représentent la valeur pic retrouvée au nord du bassin de Marennes-Oléron en 1991 par Boutier *et al.* (2000) (50 ng l<sup>-1</sup> ; traitement 2) et une valeur dix fois supérieure (500 ng l<sup>-1</sup> ; traitement 3). Pour chaque concentration et le contrôle, des répliquats (A et B) ont été réalisés. Chaque bac contenait 70 huîtres adultes (environ 70 mm de longueur de coquille). L'expérimentation avec les juvéniles a été réalisée séparément car nous ne possédions pas de jeunes huîtres au début de l'exposition au cadmium des adultes. Les juvéniles (environ 5 mm de longueur de coquille) ont été placés dans des aquariums. Chaque aquarium contenait 150 huîtres juvéniles. Les huîtres adultes ont été acclimatées pendant 2 semaines dans des bacs, en circuit ouvert. Les huîtres juvéniles n'ont pas eu besoin de subir une période d'acclimatation étant donné qu'elles étaient déjà à l'écloserie. Ces expérimentations ont été réalisées pendant deux mois pour les adultes jusqu'à leur maturation et trois mois et demi pour les juvéniles jusqu'à une taille de 30 – 40 mm), en circuit fermé, avec un système de circulation d'eau pour l'oxygénation. Pour les huîtres adultes, chaque bac contenait 125 l d'eau de mer enrichie en *Skeletonema costatum*, avec ou sans cadmium, qui était changée chaque jour et maintenue à 19,5 ± 1°C. Un volume de 125 ml de cadmium à 50 µg l<sup>-1</sup> pour le traitement 2 et 500 µg l<sup>-1</sup> pour le traitement 3 dilués dans 5 l d'eau de mer ont été rajoutés dans les bacs correspondants à chaque fois que l'eau était changée. En plus de *Skeletonema costatum*, les huîtres adultes ont été nourries quotidiennement avec un mélange équitable (15 l) de trois espèces d'algues *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans* pour chaque bac. Pour les huîtres juvéniles, chaque aquarium contenait 16 l d'eau de mer. Celle-ci a aussi été renouvelée chaque jour, tout comme pour les adultes. Un volume de 16 ml de cadmium à 50 µg l<sup>-1</sup> pour le traitement 2 et 500 µg l<sup>-1</sup> pour le traitement 3 ont été rajoutés dans les aquariums correspondants à chaque fois que l'eau était changée. Les huîtres juvéniles ont été nourries quotidiennement avec 1 l d'*Isochrysis galbana*. La mortalité a été comptabilisée chaque jour pour les deux populations.

### 2.2.3 Analyses statistiques

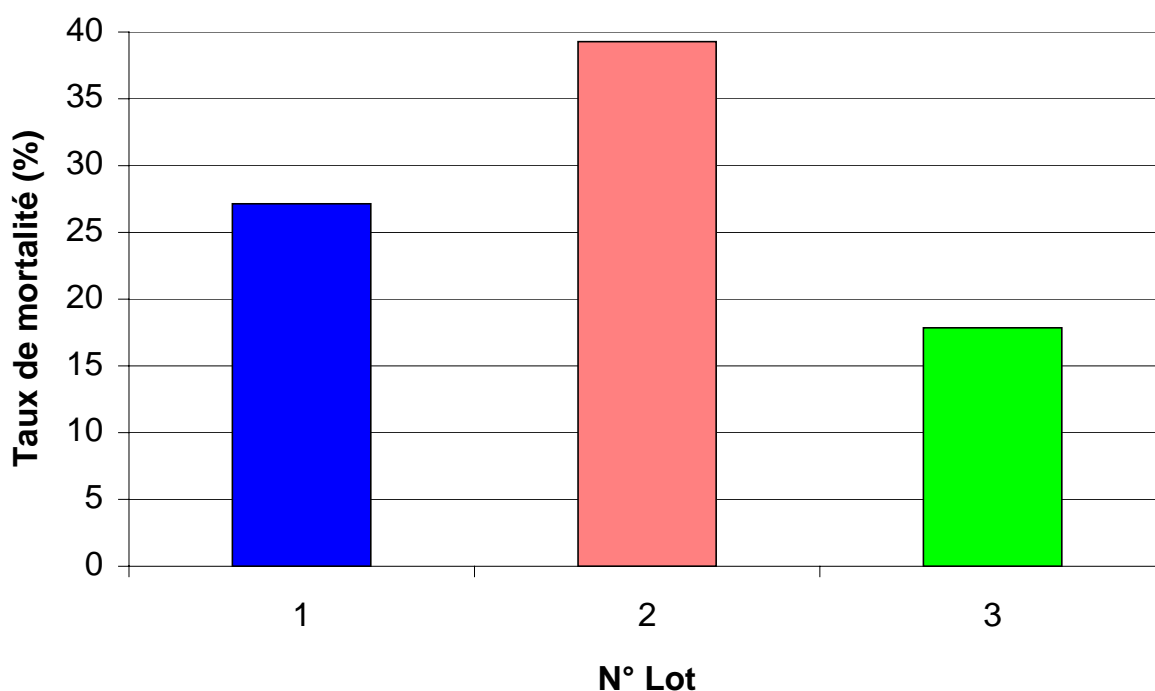
Des analyses de variance à deux facteurs (lots de cadmium et répliquats) ont été réalisées sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). De plus, une analyse de variance à trois facteurs a aussi été utilisée afin de comparer les résultats entre les adultes et les juvéniles.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Huîtres *Crassostrea gigas* adultes

#### 2.3.1.1 Mortalité

Les taux de mortalité des huîtres adultes ont varié de 17,9 à 39,3% (Figure 35). Le test  $t$  de comparaison de pourcentages a montré que la différence entre les pourcentages était significative entre les lots 1 et 2 ( $t=2,16$ ) et les lots 2 et 3 ( $t=3,97$ ). La différence observée ne peut donc être due au hasard. Par contre, entre les lots 1 et 3, la différence entre les pourcentages n'était pas significative ( $t=1,86$ ) et peut donc avoir comme origine le hasard de l'échantillonnage. Un test  $G$  a permis de mettre en évidence que la différence entre traitements était statistiquement significative. Les lots étudiés ne font donc pas partie d'une même population homogène car des différences significatives en ce qui concerne leurs taux respectifs de mortalité ont été observées ( $G=11,5979$  sans réplicats). Cette valeur est supérieure à la valeur critique (5,99) pour un risque d'erreur de 5%.



**Figure 35 : Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au cadmium en fonction du lot : lot 1 (contrôle 0 ng l<sup>-1</sup>), lot 2 (50 ng l<sup>-1</sup>) et lot 3 (500 ng l<sup>-1</sup>).**

## 2.3.1.2 Quantification du cadmium

La quantification du cadmium au sein des huîtres adultes exposées au cadmium pendant deux mois est présentée sur la Figure 36. Une analyse statistique a permis de montrer qu'il existait des différences significatives entre les lots ( $F=58,975$  ;  $p<0,001$ ) mais pas entre les réplicats ( $F=0,003$  ;  $p=0,959$ ). En effet, avec une exposition au cadmium de  $500 \text{ ng l}^{-1}$  pendant deux mois, les huîtres ont une teneur en cadmium qui a doublé par rapport au lot témoin. Par contre, le lot témoin et le lot ayant été exposé à une concentration de cadmium de  $50 \text{ ng l}^{-1}$  ont montré la même teneur de cadmium au sein des huîtres. Si nous comparons chaque traitement deux à deux, nous observons effectivement des différences significatives entre les lots 2 et 3 ( $F=75,639$  ;  $p<0,001$ ), entre les lots 1 et 3 ( $F=63,570$  ;  $p<0,001$ ), mais aucune différence significative entre les lots 1 et 2 ( $F=0,578$  ;  $p=0,462$ ).

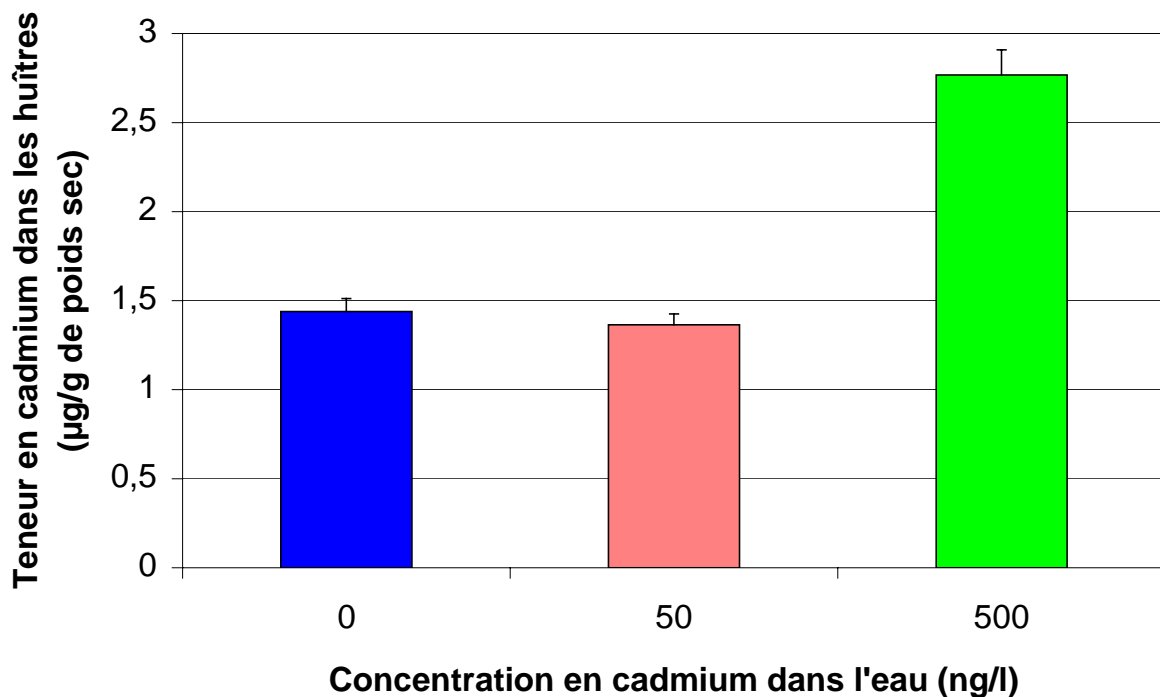


Figure 36 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au cadmium pendant deux mois (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en  $\text{ng l}^{-1}$ ).

## 2.3.1.3 Aneuploïdie

Certaines huîtres avaient un faible indice mitotique et il a malheureusement été impossible de compter 30 métaphases dans certains individus. Donc, tous les lots avaient un effectif de 10 huîtres analysées sauf les lots 1B (6 huîtres analysées car un problème d'huîtres triploïdes s'est ajouté) et 3A (8 huîtres analysées). Les pourcentages d'aneuploïdie des lots exposés au cadmium sont un peu plus élevés que ceux des lots témoins (Figure 37). Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les réplicats ( $F=0,111$  ;  $p=0,740$ ) mais que des différences significatives existaient selon les traitements ( $F=9,929$  ;  $p<0,001$ ). Si nous comparons les lots témoins avec ceux ayant reçu un traitement au cadmium de  $50 \text{ ng l}^{-1}$  nous observons une différence significative entre les lots ( $F=8,215$  ;  $p=0,007$ ), de même si nous comparons les lots témoins avec ceux ayant reçu un traitement au cadmium de  $500 \text{ ng l}^{-1}$  ( $F=19,962$  ;  $p<0,001$ ). Par contre, il n'a pas été observé de différence significative entre les lots ayant reçu des traitements au cadmium différents ( $F=3,161$  ;  $p=0,084$ ).

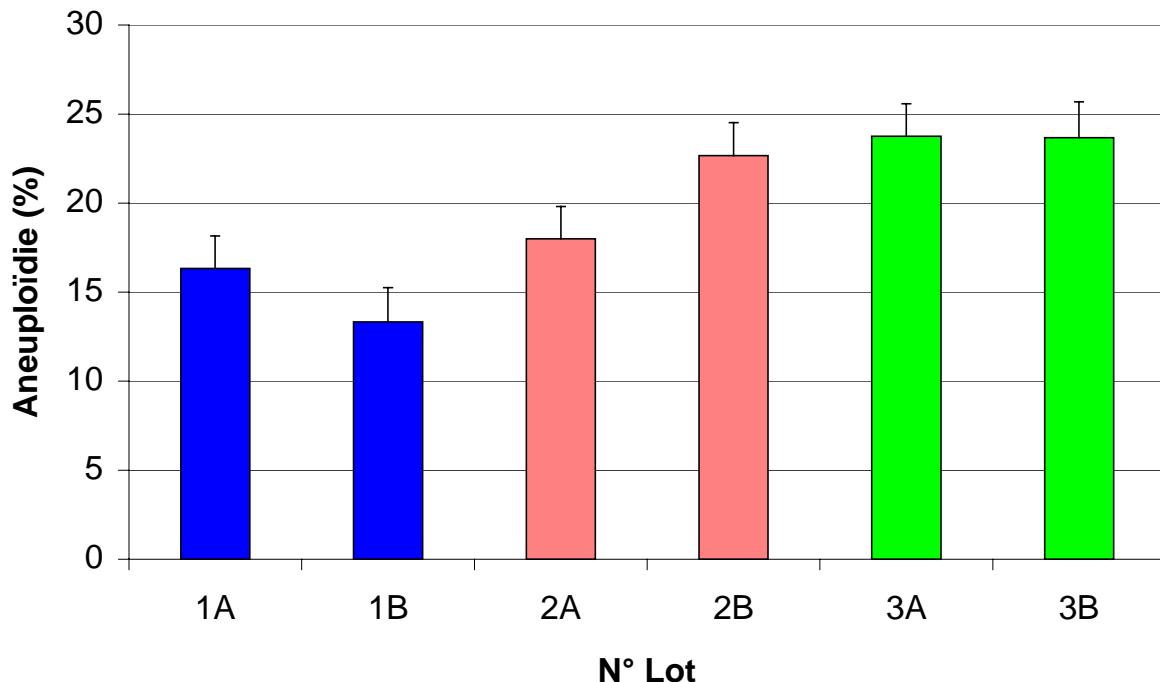


Figure 37 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \text{ ng l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $50 \text{ ng l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $500 \text{ ng l}^{-1}$ ).

### 2.3.2 Huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles

#### 2.3.2.1 Mortalité

Les taux de mortalité des huîtres juvéniles ont varié de 15,7 à 33% (Figure 38). Le test *t* de comparaison de pourcentages a montré que la différence entre les pourcentages était significative entre chaque lot deux à deux ( $t=2,64$  ; 2,35 ; 4,94 entre les lots 1 et 2 ; 1 et 3 ; 2 et 3 respectivement). La différence observée ne peut donc être due au hasard. Un test *G* a permis de mettre en évidence que la différence entre traitements était statistiquement significative. Les lots étudiés ne font donc pas partie d'une même population homogène car des différences significatives en ce qui concerne leurs taux respectifs de mortalité ont été observées ( $G=19,0172$  sans réplicats). Cette valeur est supérieure à la valeur critique (5,99) pour un risque d'erreur de 5%.

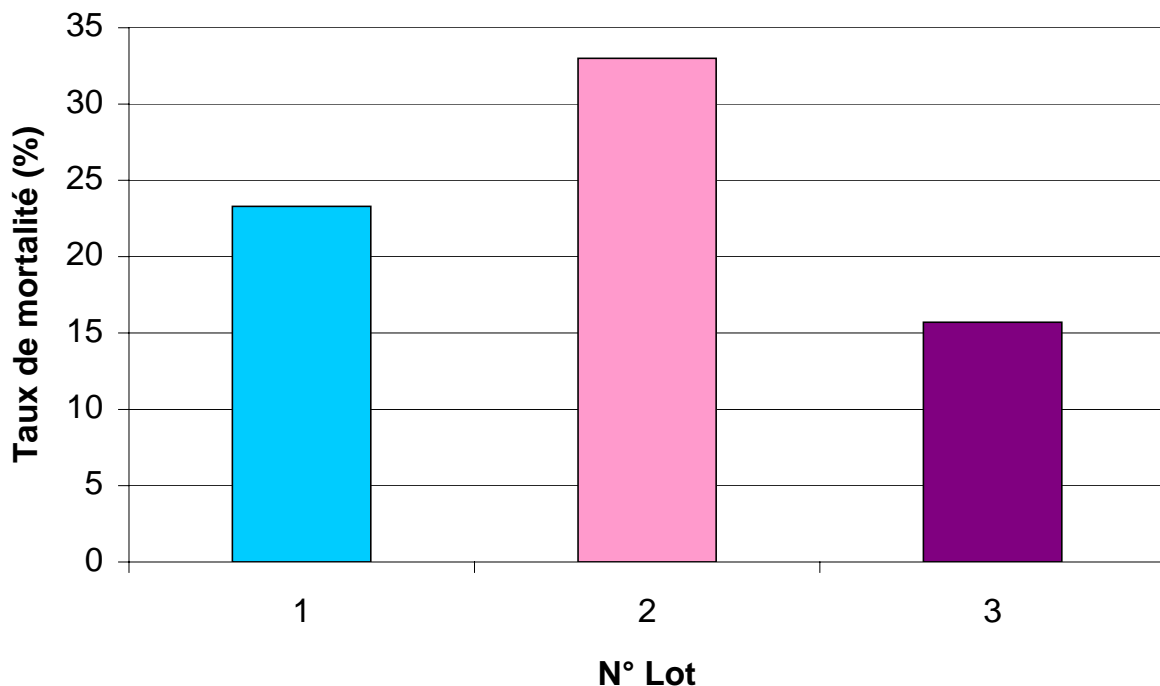


Figure 38 : Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium en fonction du lot : lot 1 (contrôle 0 ng l<sup>-1</sup>), lot 2 (50 ng l<sup>-1</sup>) et lot 3 (500 ng l<sup>-1</sup>).

## 2.3.2.2 Quantification du cadmium

La quantification du cadmium au sein des huîtres juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi est présentée sur la Figure 39. Avec une exposition au cadmium de 500 ng l<sup>-1</sup> pendant trois mois et demi, les huîtres juvéniles ont une teneur en cadmium qui a plus que triplé par rapport au lot témoin. Par contre, le lot témoin et le lot ayant été exposé à une concentration de cadmium de 50 ng l<sup>-1</sup> ont montré la même teneur de cadmium au sein des huîtres. Une analyse statistique a effectivement permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative entre les réplicats ( $F=1,213$  ;  $p=0,282$ ) mais que des différences significatives existaient selon les traitements ( $F=271,393$  ;  $p<0,001$ ). Les teneurs en cadmium des huîtres témoins et de celles exposées à 50 ng l<sup>-1</sup> ne sont pas statistiquement différentes ( $F=3,494$  ;  $p=0,080$ ). Par contre, les teneurs en cadmium des huîtres exposées à la plus forte concentration sont statistiquement différentes de celles des lots témoins ( $F=300,320$  ;  $p<0,001$ ) et de celles de concentration intermédiaire ( $F=298,220$  ;  $p<0,001$ ).

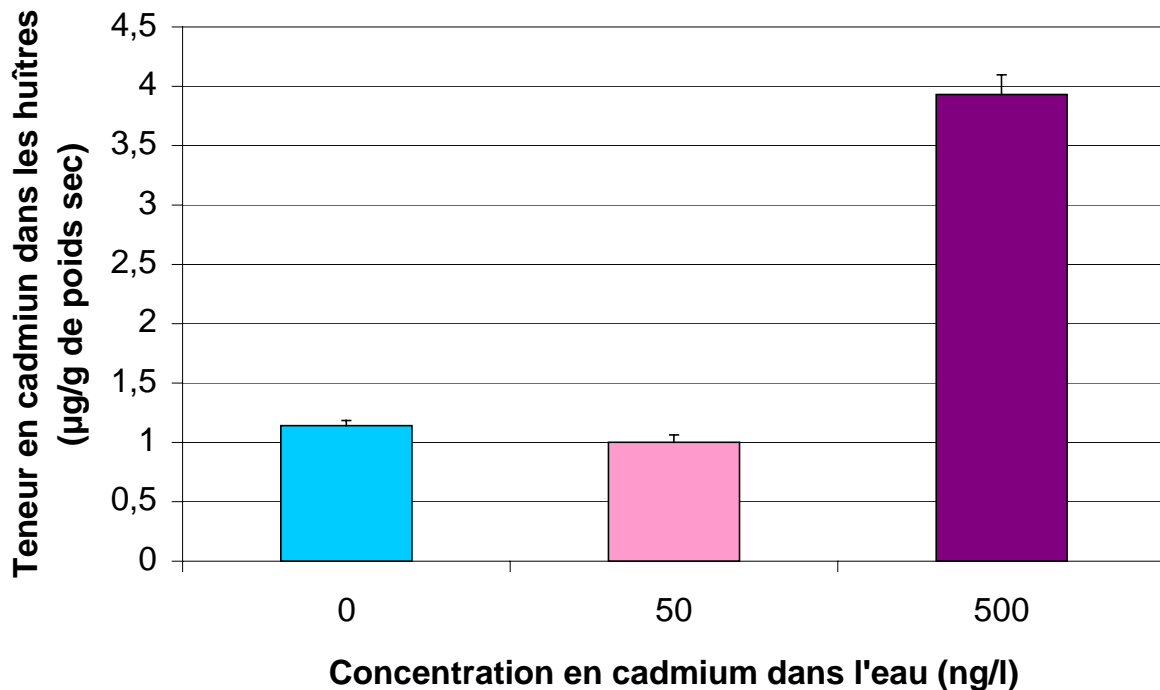
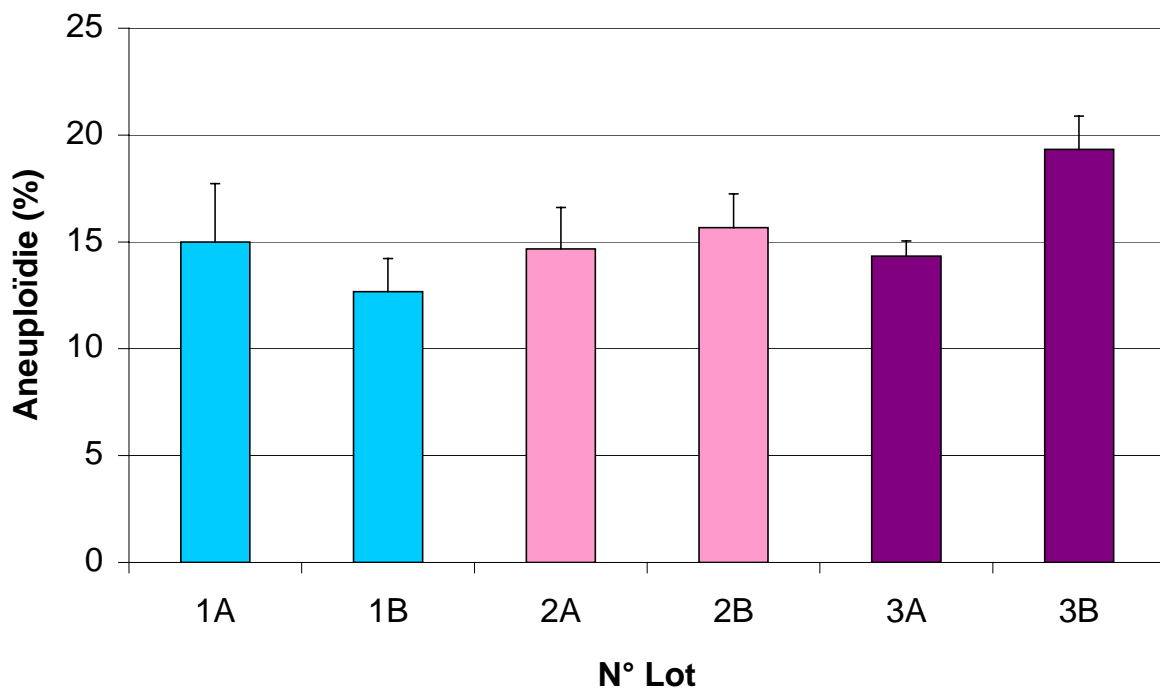


Figure 39 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi (en µg g<sup>-1</sup> de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en ng l<sup>-1</sup>).

### 2.3.2.3 Aneuploïdie

Les pourcentages d'aneuploïdie de chaque traitement ne diffèrent pas (Figure 40). En effet, une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,706$  ;  $p=0,405$ ) ni entre les traitements ( $F=1,423$  ;  $p=0,250$ ).



**Figure 40 :** Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \text{ ng l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $50 \text{ ng l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $500 \text{ ng l}^{-1}$ ).

### 2.3.3 Comparaison des données obtenues chez *Crassostrea gigas* aux stades adulte et juvénile

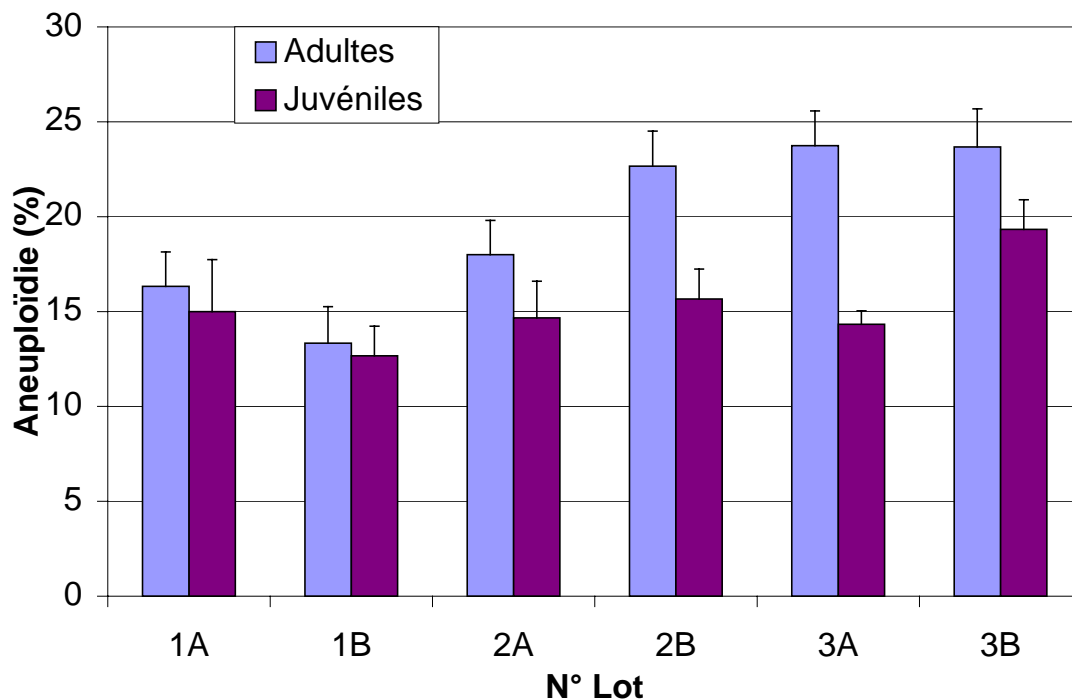
#### 2.3.3.1 Quantification du cadmium

Une analyse de variance à trois facteurs a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre le groupe d'adultes et celui de juvéniles ( $F=4,004$  ;  $p=0,052$ ) et qu'il

existait bien une différence significative entre les traitements ( $F=282,778$  ;  $p<0,001$ ). Par contre, si nous comparons deux à deux chaque traitement, nous observons des différences significatives entre les deux groupes d'huîtres. En effet, il n'y a pas de différences significatives entre les traitements 1 et 2 ( $F=3,153$  ;  $p=0,087$ ) mais bien entre les adultes et les juvéniles ( $F=29,698$  ;  $p<0,001$ ). De plus, des différences significatives ont été observées entre les traitements 1 et 3 ( $F=309,862$  ;  $p<0,001$ ) et entre les traitements 2 et 3 ( $F=328,889$  ;  $p<0,001$ ) mais également entre les adultes et les juvéniles ( $F=13,738$  ;  $p=0,001$  ;  $F=11,228$  ;  $p=0,002$  respectivement).

### 2.3.3.2 Aneuploïdie

Les taux d'aneuploïdie chez les huîtres juvéniles exposées au cadmium sont plus faibles que ceux des adultes exposés au cadmium (Figure 41).



**Figure 41 : Comparaison entre le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes et juvéniles exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l<sup>-1</sup>), lots 2A, 2B (50 ng l<sup>-1</sup>) et lots 3A, 3B (500 ng l<sup>-1</sup>).**



En effet, une analyse de variance a permis de tester l'effet du facteur : stade de développement et a montré qu'il existait des différences significatives entre les adultes et les juvéniles ( $F=16,392$  ;  $p<0,001$ ). Si nous comparons deux à deux chaque traitement, nous observons à chaque fois des différences significatives entre les traitements ( $F=5,955$  ;  $p=0,017$  ;  $F=19,534$  ;  $p<0,001$  ;  $F=4,363$  ;  $p=0,040$ ) et entre les huîtres adultes et les juvéniles ( $F=4,849$  ;  $p=0,031$  ;  $F=8,529$  ;  $p=0,005$  ;  $F=24,886$  ;  $p<0,001$ ) pour les lots 1 et 2, 1 et 3, et 2 et 3 respectivement.

## **2.4** **Discussion**

Dans l'environnement marin, les zones littorales proches d'estuaires ou de rivières sont soumises à une contamination anthropique périodique par les métaux lourds. Dans les zones où se pratique l'ostréiculture, cette situation peut avoir un impact socio-économique étant donné que les huîtres sont connues pour leur capacité à concentrer des métaux et en particulier le cadmium, contaminant très toxique (Miramand *et al.*, 2000). L'eau utilisée pour alimenter tous nos bacs provenait du bassin de Marennes-Oléron. Les huîtres, avant leur utilisation pour la réalisation de cette expérience, provenaient aussi du milieu naturel donc il est normal de retrouver une teneur de 1,14 ou 1,44  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec dans les lots témoins des juvéniles ou des adultes respectivement. Vu que la teneur en cadmium de 50  $\text{ng l}^{-1}$  est une valeur pic retrouvée dans le bassin et que nous avons utilisé l'eau du bassin pour la réalisation de cette expérience au sein de l'écloserie, il est normal de retrouver une teneur en cadmium au sein des huîtres exposées à 50  $\text{ng l}^{-1}$  significativement non différente de celle du lot témoin. En effet, la teneur moyenne en Cd dissous dans le bassin de Marennes-Oléron est de 22  $\text{ng l}^{-1}$  (Boutier, com. pers., 2000 *in* Pigeot, 2001). Les huîtres exposées à une forte teneur en cadmium (500  $\text{ng l}^{-1}$ ) ont faiblement bioaccumulé ce métal lourd étant donné qu'un facteur de concentration de seulement 2 ou 3 a été observé par rapport au traitement témoin. Ainsi, les huîtres exposées à 500  $\text{ng l}^{-1}$  de cadmium n'ont pas concentré dix fois plus de cadmium que celles exposées à 50  $\text{ng l}^{-1}$  de cadmium et donc il n'existe pas de corrélation entre la bioaccumulation du cadmium par les huîtres et la teneur en cadmium du milieu. Vicente *et al.* (1988) ont observé le même résultat chez des coques *Cerastoderma glaucum* exposées à des concentrations de 20 et 40  $\mu\text{g l}^{-1}$  et qui présentaient des teneurs en cadmium de 12 et 18  $\text{mg kg}^{-1}$  respectivement dans leurs tissus au bout de 21 jours d'exposition.

Le cadmium n'a pas affecté le comportement des huîtres pendant leur durée d'exposition. En effet, les huîtres ont filtré normalement l'eau des bacs. Les taux de mortalité étaient tout de même différents entre les lots. Une augmentation de la mortalité a été observée dans les bacs contenant 50 ng l<sup>-1</sup> de cadmium mais pas dans les bacs ayant une quantité de cadmium dix fois plus importante. Ce résultat a été observé à deux reprises à la fois pour les adultes et pour les juvéniles dont les expérimentations ont eu lieu séparément. Il se pourrait que ce résultat soit dû à une différence de bactéries dans le milieu. En effet, si la cause de la mortalité à 50 ng l<sup>-1</sup> est une bactérie, peut-être qu'à 500 ng l<sup>-1</sup>, cette bactérie ne peut pas se développer. Les bactéries tolèrent plus ou moins le cadmium et certaines peuvent développer des mécanismes de détoxification (Ivanova *et al.*, 2002). Certains polluants à faibles doses ont parfois un effet stimulateur, ce phénomène est connu sous le nom d'hormèse. C'est surtout au niveau de la croissance que ce phénomène est observé (Stebbing, 1982). Par exemple, de faibles concentrations de cadmium peuvent stimuler la croissance de microalgues (Vocke *et al.*, 1980 ; Strömngren, 1980). D'autres métaux lourds ont montré des effets stimulateurs de croissance sur les bactéries (revue : Stebbing, 1982). Si à 50 ng l<sup>-1</sup> la croissance d'une bactérie potentiellement responsable de la mort des huîtres est plus importante qu'à 500 ng l<sup>-1</sup> peut-être que le plus faible taux de mortalité observé à 500 ng l<sup>-1</sup> serait dû à une densité plus faible en bactéries. Malheureusement, aucune étude bactériologique n'a été réalisée au cours de nos expérimentations et nous ne pouvons donc pas connaître la cause exacte de la mortalité observée.

Au vu des premiers résultats obtenus, il semblerait que le cadmium ait eu un impact sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses adultes. L'impact du cadmium sur l'aneuploïdie est apparu dès la concentration de 50 ng l<sup>-1</sup>. Cependant, cet impact n'a pas été observé au stade juvénile qui a pourtant été exposé plus longtemps au cadmium et donc où la bioaccumulation du cadmium dans les tissus était plus importante. Ce résultat contradictoire montrerait que les huîtres juvéniles sont moins sensibles au cadmium que les huîtres adultes. Généralement, c'est plutôt l'inverse qui est observé. En effet, Vicente *et al.* (1988) ont montré que les stades plus précoces (œufs et stades larvaires) étaient plus sensibles au cadmium. Toutefois, de nombreux auteurs ont étudié la toxicité du cadmium chez les huîtres au stade larvaire mais n'ont observé des effets sur le développement qu'à des teneurs en cadmium allant de 5 à 20 µg l<sup>-1</sup> (Zarogian et Morrison, 1981 ; Watling, 1978, 1982). De plus, Robert et His (1985) n'ont constaté aucun effet sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* pour des teneurs en cadmium aussi élevées que 50 µg l<sup>-1</sup>.

Cross et Rebordinos (2003) ont montré qu'une contamination marine par le cadmium, fer et zinc avait des conséquences génétiques sur une population d'huîtres portugaises *Crassostrea angulata*. En effet, un nombre d'allèles par locus plus élevé et une hétérozygotie plus faibles ont été observés dans la population la plus contaminée. Le cadmium est aussi capable d'induire des dommages chromosomiques structuraux et numériques. En effet, de nombreux auteurs ont montré l'évidence de la clastogénicité du cadmium. Celui-ci induirait des ruptures de brins d'ADN, des anomalies chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs dans des cellules mammaliennes variées *in vitro* (Ochi *et al.*, 1984 ; Howard *et al.*, 1991 ; Coogan *et al.*, 1992) mais à des concentrations supérieures à 1 mg l<sup>-1</sup> donc beaucoup plus élevées que celles que nous avons testé *in vivo*.

Il aurait été intéressant de transférer les huîtres adultes exposées au cadmium en milieu non pollué afin de constater si le phénomène cytogénotoxique observé précédemment était réversible. Malheureusement, cette expérimentation n'a pas pu être réalisée à cause du taux de mortalité plus élevé qu'attendu.

Cette expérience de contamination directe pourrait être complétée par d'autres expériences de contamination induite par une souche phytoplanctonique, elle même contaminée par le cadmium par exemple.

### **3 Effet sur la descendance de la population adulte**

#### **3.1 Introduction**

Un effet du cadmium sur l'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes ayant été observé précédemment, il semblait intéressant de voir si cet effet persistait à la génération suivante. Pour cela, nous avons étudié la descendance des huîtres adultes exposées au cadmium.

## **3.2 Matériels et Méthodes**

### **3.2.1 Fécondations**

Pour chacun des 6 lots d'adultes, des fécondations ont été réalisées fin mai 2002. Les croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été dupliqués afin d'avoir un réplicat pour chaque lot et 12 lots ont donc été élaborés.

### **3.2.2 Développement**

Lorsque les huîtres juvéniles ont eu une taille de 1 cm, elles ont été transférées en salle de maturation jusqu'en septembre 2002. Puis, elles ont été conservées en claire jusqu'à la mi-janvier 2003. Elles sont revenues en écloserie à cette date et elles ont été conditionnées en serre.

### **3.2.3 Analyses statistiques**

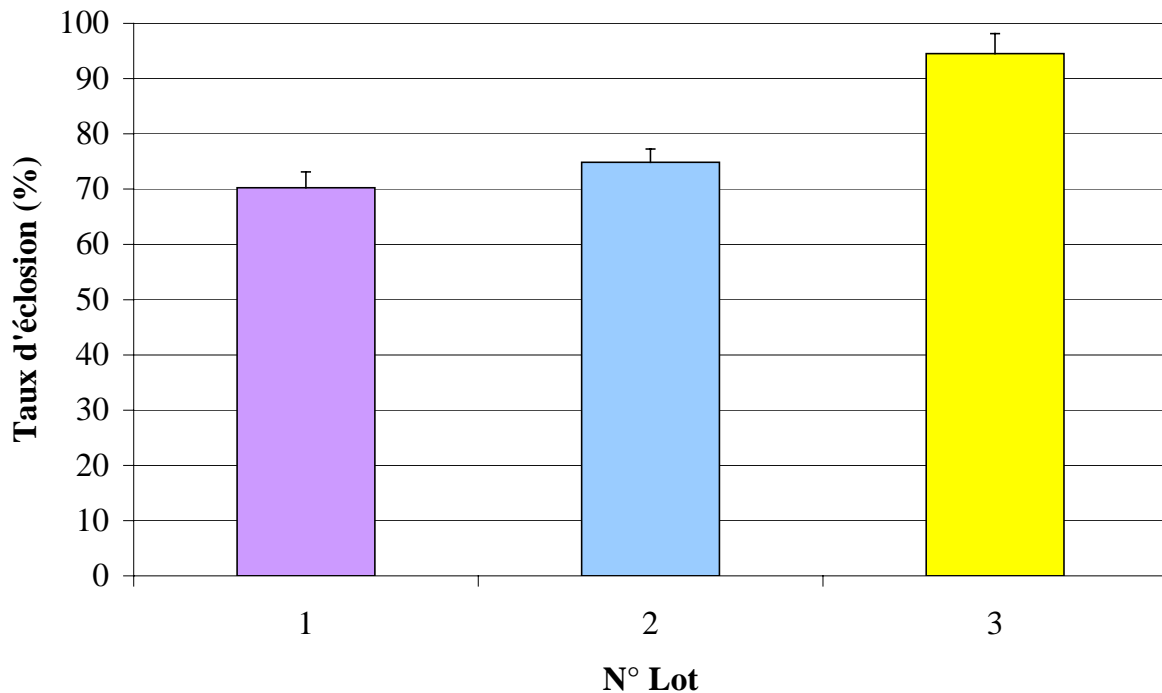
Une analyse de variance à deux facteurs (lots de cadmium et réplicats) a été réalisée sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). De plus, une analyse de variance à trois facteurs a aussi été utilisée afin de comparer les résultats entre les parents et les descendants.

## **3.3 Résultats**

### **3.3.1 Taux d'éclosion**

La jarre 1 de l'élevage larvaire a eu un problème technique le premier jour. Le système d'oxygénation ne fonctionnait pas et un faible taux d'éclosion (41%) a été observé par rapport aux autres jarres. Ce résultat n'a donc pas été pris en compte pour le calcul des taux d'éclosion pour les trois traitements. Les taux d'éclosion pour l'ensemble des lots étaient compris entre 70,3 et 94,5% (Figure 42). Un test *G* a permis de mettre en évidence que le

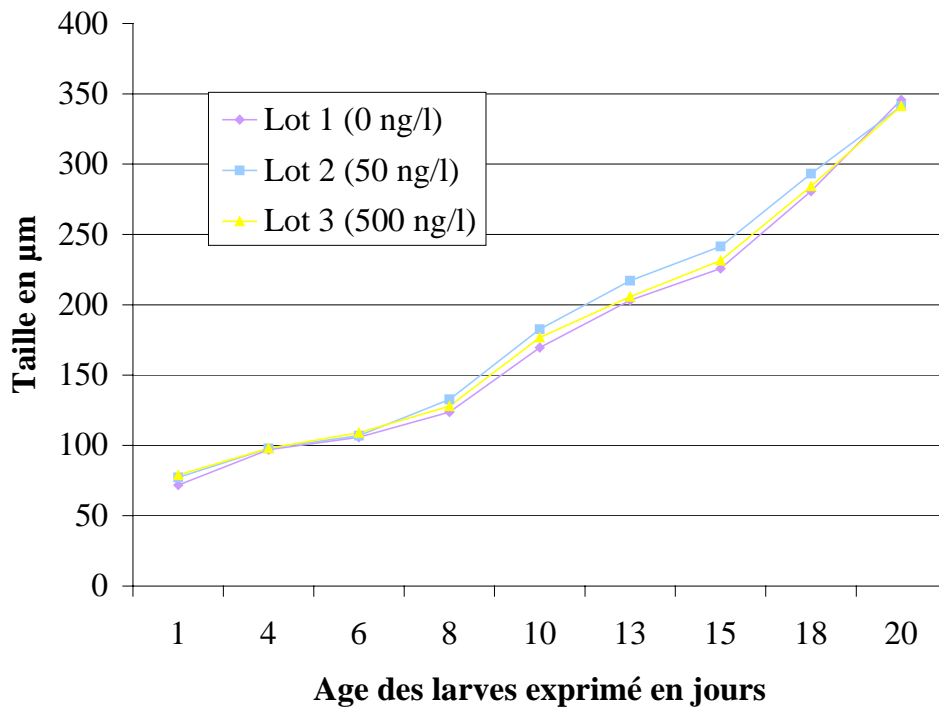
hasard pouvait expliquer la différence existante entre les lots. Ainsi, les lots étudiés font partie d'une même population homogène car aucune différence significative en ce qui concerne leurs taux d'éclosion respectifs n'a été observée ( $G=4,059$  sans réplicats). Cette valeur est inférieure à la valeur critique (5,99) pour un risque d'erreur de 5%.



**Figure 42 :** Taux d'éclosion de la descendance d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différentes concentrations de cadmium : lot 1 ( $0 \text{ ng l}^{-1}$ ), lot 2 ( $50 \text{ ng l}^{-1}$ ) et lot 3 ( $500 \text{ ng l}^{-1}$ ).

### 3.3.2 Croissance larvaire

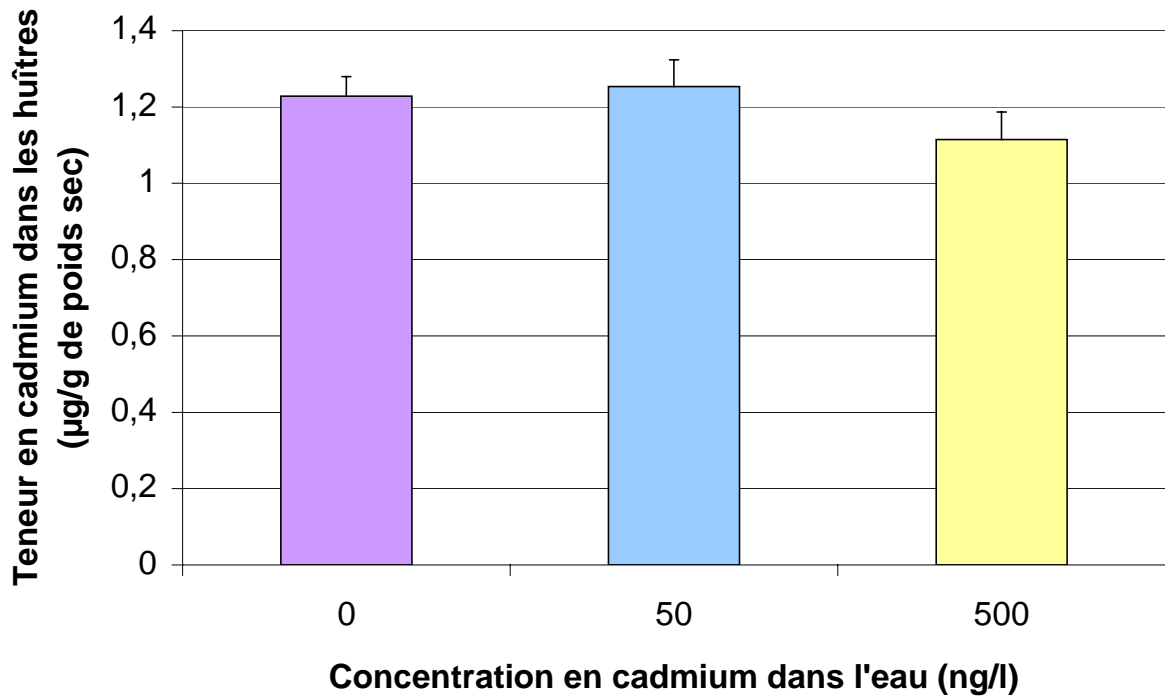
Les descendances des huîtres *Crassostrea gigas* ayant été exposées à différentes concentrations de cadmium n'ont pas montré de différences significatives au niveau de leur croissance larvaire (Figure 43). Les valeurs des coefficients de corrélation  $R$  (1,0000 ; 0,9998 et 0,9999) entre les lots 1 et 2, 1 et 3, et 2 et 3 respectivement étaient toutes supérieures à la valeur critique de la distribution de Student ( $t=0,38$ ) pour un risque d'erreur de 5%.



**Figure 43 : Taille des larves (en  $\mu\text{m}$ ) descendantes d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées au cadmium en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.**

### 3.3.3 Quantification du cadmium

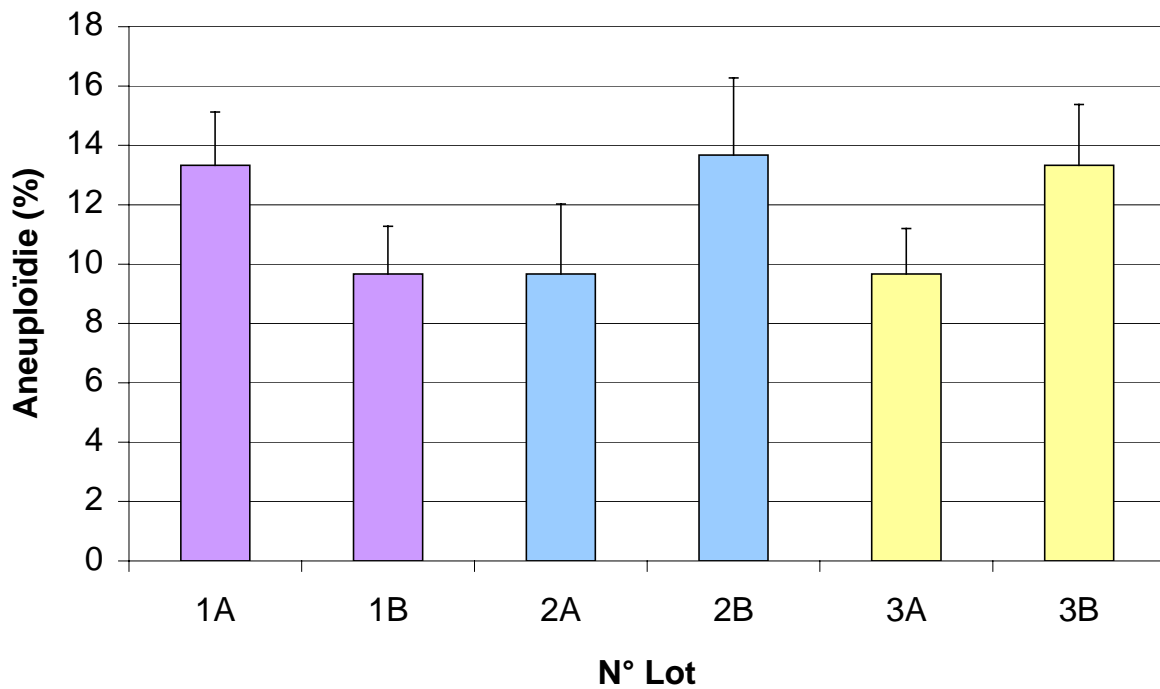
Les teneurs en cadmium des descendants d'huîtres exposées au cadmium sont assez proches et comprises entre 1,11 et 1,25  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec (Figure 44). Une analyse statistique a révélé qu'il existait une différence significative entre les réplicats ( $F=4,482$  ;  $p=0,048$ ) mais pas entre les traitements ( $F=2,153$  ;  $p=0,145$ ). Cette différence entre les réplicats n'est observée en réalité que lorsque nous comparons les traitements 2 et 3 ( $F=12,570$  ;  $p=0,004$ ).



**Figure 44 :** Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* descendantes d'huîtres exposées au cadmium pendant deux mois (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en  $\text{ng l}^{-1}$ ).

### 3.3.4 Aneuploïdie

Les taux d'aneuploïdie des différents lots ont varié de 9,7 à 13,7% (Figure 45). Une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les réplicats ( $F=0,649$  ;  $p=0,424$ ) ni entre les traitements ( $F=0,005$  ;  $p=0,996$ ).



**Figure 45 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* descendantes d'huîtres exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l<sup>-1</sup>), lots 2A, 2B (50 ng l<sup>-1</sup>) et lots 3A, 3B (500 ng l<sup>-1</sup>).**

### 3.3.5 Comparaison entre les parents exposés au cadmium et leurs descendants

#### 3.3.5.1 Quantification du cadmium

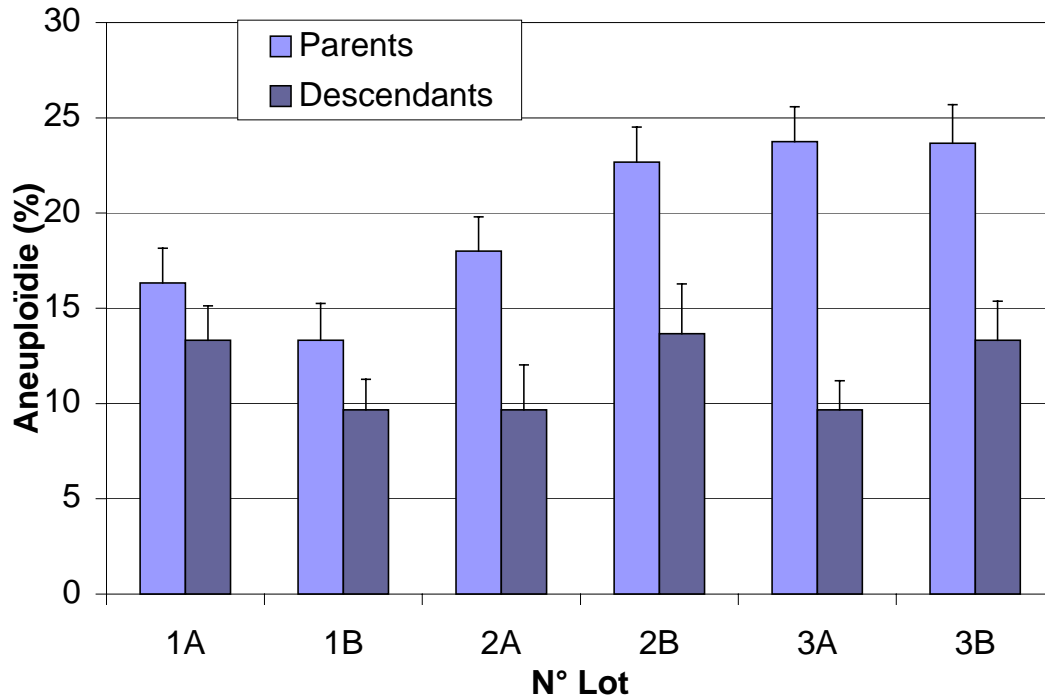
Une analyse de variance à trois facteurs a montré qu'il existait des différences significatives entre les parents exposés au cadmium et leurs descendants ( $F=99,099$  ;  $p<0,001$ ) et entre les traitements ( $F=39,108$  ;  $p<0,001$ ). En réalité, il existe des différences significatives entre les traitements excepté entre les lots 1 et 2 ( $F=0,177$  ;  $p=0,678$ ).

#### 3.3.5.2 Aneuploïdie

Si nous comparons les taux d'aneuploïdie des parents à ceux des descendants (Figure 46) nous observons aucune différence significative entre les répliqués ( $F=0,651$  ;  $p=0,422$ ), des différences significatives entre les traitements ( $F=4,857$  ;  $p=0,010$ ) et entre les parents et



leurs descendants ( $F=48,961$  ;  $p<0,001$ ). En réalité, des différences significatives ne sont observées qu'entre les traitements 1 et 3 ( $F=11,255$  ;  $p=0,001$ ).



**Figure 46 : Comparaison entre le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées pendant deux mois au cadmium et leurs descendances en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l<sup>-1</sup>), lots 2A, 2B (50 ng l<sup>-1</sup>) et lots 3A, 3B (500 ng l<sup>-1</sup>).**

### 3.4 Discussion

La teneur en cadmium au sein des huîtres des 3 lots est statistiquement identique. Ce résultat est cohérent étant donné que le cadmium n'est pas bioaccumulé principalement dans la gonade mais plutôt dans la glande digestive.

Il semblerait que l'impact du cadmium sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observé chez des adultes n'ait pas persisté à la génération suivante. En effet, les taux d'aneuploïdie chez les descendants étaient en moyenne de l'ordre de 11,5% et plus faibles que ceux des parents. La non persistance de l'impact du cadmium sur la génération suivante semble confirmée par les teneurs en cadmium des descendants qui ne diffèrent pas de façon significative et qui sont plus faibles que celles des parents. Le cadmium, aux concentrations testées, ne semblerait donc pas induire un dommage génétique transmissible d'une génération

à l'autre, comme cela a été suggéré avec l'atrazine. Les mécanismes d'action de ces deux contaminants ne sont probablement pas les mêmes.

Robert et His (1985) ont remarqué que la concentration de cadmium des eaux de l'estuaire de la Gironde ( $1 \mu\text{g l}^{-1}$ ) n'affectait pas le potentiel reproducteur des huîtres *C. gigas*. Ce résultat est bien en concordance avec ce que nous observons puisque des concentrations plus faibles de cadmium n'ont pas diminué le succès reproducteur des huîtres exposées à 50 et  $500 \text{ ng l}^{-1}$ . En effet, le taux d'éclosion des descendants était même plus élevé lorsque les parents ont été exposés à la plus forte concentration de cadmium ( $500 \text{ ng l}^{-1}$ ). Par contre, il n'y a pas eu d'impact de l'exposition au cadmium des parents sur la croissance larvaire. Ce résultat est en accord avec celui de Watling (1978) qui observait une diminution de la croissance larvaire chez *C. gigas* seulement à partir de  $20 \mu\text{g l}^{-1}$  donc à une concentration beaucoup plus élevée que celles que nous avons étudié. De plus, Robert et His (1985) n'ont pas observé d'effet sur le développement larvaire de la même espèce jusqu'à  $50 \mu\text{g l}^{-1}$ .

## **4 Conclusion**

Un impact du cadmium sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* n'a pu être démontré aux concentrations testées. En effet, bien qu'une augmentation du taux d'aneuploïdie chez des huîtres adultes exposées au cadmium ait été observée, ce résultat n'a pas été confirmé chez des juvéniles exposés aux mêmes concentrations pendant plus longtemps. De plus, les descendants d'huîtres exposées au cadmium n'ont pas montré de différences significatives dans leur taux d'aneuploïdie. Ainsi, aux concentrations testées, le cadmium ne peut pas être considéré comme un contaminant influençant le taux d'aneuploïdie chez les huîtres *C. gigas*. Toutefois, le cadmium est connu pour ses propriétés aneugènes et clastogènes et à des concentrations plus élevées, il pourrait peut-être avoir un effet sur les juvéniles et les descendants d'huîtres exposées à ce contaminant.

**Partie V :**  
**Etude de l'aneuploïdie**  
**chez des huîtres en milieu naturel**



*Huîtres Crassostrea gigas juvéniles très allongées originaires de la vasière de Brouage*

*Echelle = 23 mm*



## **Partie V : Etude de l'aneuploïdie chez des huîtres en milieu naturel**

### **1 Introduction**

Deux contaminants pouvant entraîner une augmentation du taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ont été étudiés en milieu contrôlé. Il s'agit de l'atrazine et du cadmium. En effet, la pollution aquatique est une préoccupation majeure. Malgré l'observation de conséquences défavorables sur les écosystèmes et les organismes, la dégradation de l'environnement marin continue à s'intensifier. Ainsi, dans le milieu naturel, de nombreux polluants peuvent être présents en quantité plus ou moins importante et il semblait intéressant d'effectuer plusieurs études *in situ* afin d'observer d'éventuelles variations du taux d'aneuploïdie selon les conditions environnementales. Des huîtres d'élevage ou bien sauvages ont été utilisées pour réaliser ces études. Les huîtres d'élevage présentent un intérêt particulier puisque leur patrimoine génétique est connu. Dans le milieu, les huîtres élevées proviennent soit de captage naturel soit d'écloserie. De nombreuses huîtres sauvages, non élevées, prolifèrent aussi. Le fait d'étudier à la fois des huîtres d'élevage et des huîtres sauvages dans l'environnement aquatique est donc représentatif de ce qu'il est possible de trouver dans le milieu naturel.

Dans ce milieu, il a été observé que les huîtres peuvent subir des mortalités en période estivale encore inexplicables pour lesquelles un grand nombre de facteurs peuvent intervenir. Ceci est une préoccupation majeure de la profession ostréicole. Diverses pratiques culturales sont utilisées pour permettre à une huître d'atteindre une taille commerciale. La plus courante est l'utilisation de poches ostréicoles placées sur l'estran sur des tables en surélévé. Cependant, d'autres modes de culture consistant à semer les huîtres à plat ou à les disposer en eaux profondes sont aussi employées. Lorsque les huîtres ont atteint une taille commerciale, un affinage en claire peut aussi être effectué. Ces diverses pratiques culturales représentent des conditions environnementales différentes pour les huîtres. La réalisation de différentes expériences afin d'observer d'éventuelles relations entre mortalités différentielles et taux d'aneuploïdie, conditions environnementales et taux d'aneuploïdie semblait donc importante. De plus, il était aussi intéressant d'étudier des huîtres sauvages du bassin de Marennes-Oléron et d'observer d'éventuelles fluctuations du taux d'aneuploïdie au cours du temps selon

probablement des conditions environnementales différentes en fonction de la saison. Une autre des préoccupations majeures de la profession est la faible croissance des huîtres sur des bassins où leur densité est élevée. Pour répondre à l'attente de la profession qui souhaiterait que les huîtres aient de meilleures performances de croissance, des études de sélection génétique ont été menées. Celles-ci permettent d'améliorer la croissance d'huîtres hybrides entre lignées consanguines par exemple. Ce phénomène de supériorité d'un hybride par rapport au meilleur de ses parents est appelé hétérosis. Etant donné qu'il existe une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance chez *C. gigas* (Leitão *et al.*, 2001a), il était également intéressant d'étudier s'il existe une relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie.

## **2 Relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie ?**

### **2.1 Introduction**

En 2001, l'Ifremer a initié le programme « MOREST » (MORTalité ESTivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*) qui aborde les thématiques de la génétique, de la physiologie, de l'écophysiologie, de l'écotoxicologie, de l'immunologie et de la pathologie afin de comprendre les phénomènes de mortalité estivale affectant les juvéniles de *C. gigas* en France. Des croisements ont donc été réalisés au sein du laboratoire au cours du premier trimestre 2001 afin de produire des familles d'huîtres pour ce programme qui ont ensuite été placées dans le milieu naturel sur différents sites afin d'étudier leur comportement. Au cours de l'été 2001, il s'est avéré que les mortalités estivales ont touché de façon différentielle ces familles en cours d'étude. Il est alors apparu intéressant de caractériser le génome de ces familles, d'une part grâce à des marqueurs moléculaires et d'autre part, en ce qui nous concerne plus particulièrement, en observant le taux d'aneuploïdie chez ces animaux. En effet, des études génétiques précédentes ont pu mettre en évidence que certaines familles avaient des taux d'aneuploïdie significativement différents (Leitão *et al.*, 2001b). Nous souhaitons donc déterminer si certaines familles ayant subi des mortalités différentielles en 2001 peuvent être caractérisées par des taux d'aneuploïdie différents des autres familles.

## **2.2 Matériels et méthodes**

### **2.2.1 Matériel biologique**

Six familles différenciées ont été choisies à partir du croisement de la série 3 qui avait eu lieu le 18 avril 2001. Les familles F 14-54, F 14-55 et F 16-62 sont qualifiées de familles « sensibles » car elles ont un plus fort taux de mortalité sur le milieu que les familles F 15-57, F 15-58 et F 15-59, qui sont, elles, qualifiées de familles « résistantes » car elles ont une meilleure survie. Ces huîtres avaient été mises sur site le 7 août 2001. Le site sélectionné est celui de Perquis (Ronce les bains). Les mêmes familles restées à la nurserie de Bouin (Vendée) et n'ayant pas subi de mortalité ont aussi été analysées.

### **2.2.2 Conditionnement**

Les huîtres de Bouin ont été acheminées au marais expérimental d'Artouan le 30 novembre 2001 puis placées en maturation à l'écloserie de La Tremblade le 14 décembre 2001. Les huîtres de Perquis ont été rentrées à l'écloserie début janvier 2002 afin de les conditionner.

### **2.2.3 Analyses statistiques**

Des analyses de variance à deux facteurs (survie/mortalité et familles) ainsi qu'une analyse de variance à trois facteurs (site, survie/mortalité et familles) ont été réalisées sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990).

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Mortalité

Les taux de mortalité établis le 2 octobre 2001 étaient relativement faibles pour les familles « résistantes » et forts pour les familles « sensibles » (Tableau 6) (Dégremont, 2003).

**Tableau 6 : Taux de mortalité (en %) des différentes familles à la nurserie de Bouin et sur le site de Perquis.**

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

### 2.3.2 Aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* situées à Perquis

Sur le site de Perquis, il semblerait que les taux d'aneuploïdie observés ne diffèrent pas entre les familles d'huîtres (Figure 47). En effet, une analyse statistique a permis de montrer qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,672$  ;  $p=0,515$ ) ni entre les familles résistantes et sensibles ( $F=0,397$  ;  $p=0,532$ ).

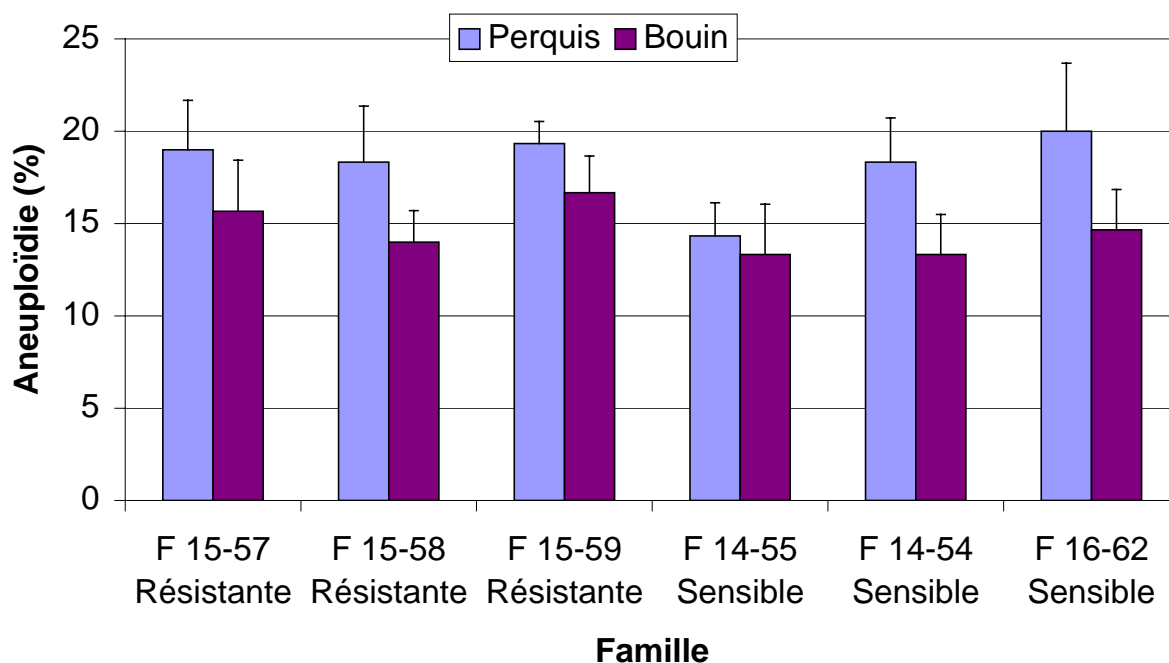
### 2.3.3 Aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* situées à Bouin

Les taux d'aneuploïdie des différentes familles d'huîtres provenant de la nurserie de Bouin ne semblent pas être différents les uns des autres (Figure 47). Une analyse statistique a permis de montrer également qu'il n'existait pas de différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,386$  ;  $p=0,682$ ) ni entre les familles résistantes et sensibles ( $F=0,797$  ;  $p=0,376$ ).



### 2.3.4 Comparaison des données obtenues chez *Crassostrea gigas* sur les sites de Perquis et de Bouin

Si nous comparons les huîtres des mêmes familles placées sur deux sites différents (Perquis et Bouin) (Figure 47), nous n'observons aucune différence significative ni entre les 3 familles d'un même groupe ( $F=0,813$  ;  $p=0,446$ ), ni entre les familles résistantes et sensibles ( $F=1,129$  ;  $p=0,290$ ). Par contre, une différence significative entre les huîtres de Perquis et celles de Bouin a été observée ( $F=6,546$  ;  $p=0,012$ ). En effet, les huîtres de Bouin ont présenté un plus faible taux d'aneuploïdie que celles de Perquis.



**Figure 47 : Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres issues de familles « résistantes » ou « sensibles » selon le site.**

## 2.4 Discussion

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'aneuploïdie ont été mis en parallèle avec les taux de survie observés afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ces deux paramètres. Au vu de nos résultats, il semblerait qu'il n'y ait pas de relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie étant donné qu'aucune différence significative n'a été

observée entre des familles ayant un fort taux de mortalité et des familles ayant un faible taux de mortalité dans le milieu. De plus, ces mêmes familles, sans mortalité, n'ont pas montré de différence significative du taux d'aneuploïdie. A Perquis, des éléments présents dans le milieu qui étaient absents à Bouin ont dû déclencher la mortalité des familles les moins résistantes à un stress environnemental. Au delà d'un certain seuil d'aneuploïdie, les huîtres meurent peut-être mais cette hypothèse peut difficilement être vérifiée étant donné que nous ne travaillons que sur du matériel vivant et il est donc difficile de connaître le taux d'aneuploïdie d'huîtres mortes. Ainsi, les huîtres ne doivent pas tolérer physiologiquement plus d'un certain pourcentage de perte chromosomique. En effet, au sein d'une même huître, il n'a jamais été observé plus de la moitié de cellules aneuploïdes.

Une augmentation du taux d'aneuploïdie des huîtres présentes sur Perquis par rapport à celles qui sont restées à la nurserie de Bouin a été observée. Il semblerait donc que les conditions environnementales jouent un rôle au niveau des taux d'aneuploïdie observés. Ces différences de taux d'aneuploïdie entre les huîtres de Perquis et de Bouin pourraient peut-être être expliquées par la présence de produits chimiques en quantité plus ou moins importante selon le site mais cette hypothèse ne peut pas être vérifiée car aucune étude n'a été réalisée pour évaluer les teneurs en pesticides, métaux, hydrocarbures, etc... présentes dans l'eau de mer à Perquis/Bouin ou bien au sein des huîtres. Une autre hypothèse peut être émise pour expliquer ces différences de taux d'aneuploïdie selon le site. Dans le milieu, en période hivernale, la croissance du phytoplancton est assez faible. Par conséquent, les huîtres ont une plus faible quantité de nourriture pour leur propre croissance par rapport à des huîtres élevées dans une nurserie, qui elles, reçoivent une plus grande quantité de nourriture et ont donc une meilleure croissance par rapport à des huîtres du milieu naturel. Or, une corrélation négative entre le taux d'aneuploïdie et le taux de croissance, dans les mêmes conditions alimentaires, a déjà été montrée chez *Crassostrea gigas* (Leitão *et al.*, 2001a), donc, il serait fort possible que les huîtres de Bouin aient eu une meilleure croissance que celles de Perquis et donc un taux d'aneuploïdie plus faible.

### **3 Impact des conditions d'élevage sur le taux d'aneuploïdie**

#### **3.1 Introduction**

Le projet DYNAMO (DYNAmique des MOrtalités) faisant partie intégrante du programme MOREST se propose d'étudier la dynamique de la mortalité printanière et estivale de *Crassostrea gigas* dans des environnements discriminants par rapport à la mortalité (distance par rapport au sédiment, positionnement dans la colonne d'eau et environnement peu sensible). Dans notre cas, ce projet a pour but d'évaluer l'impact de conditions environnementales différentes sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas*.

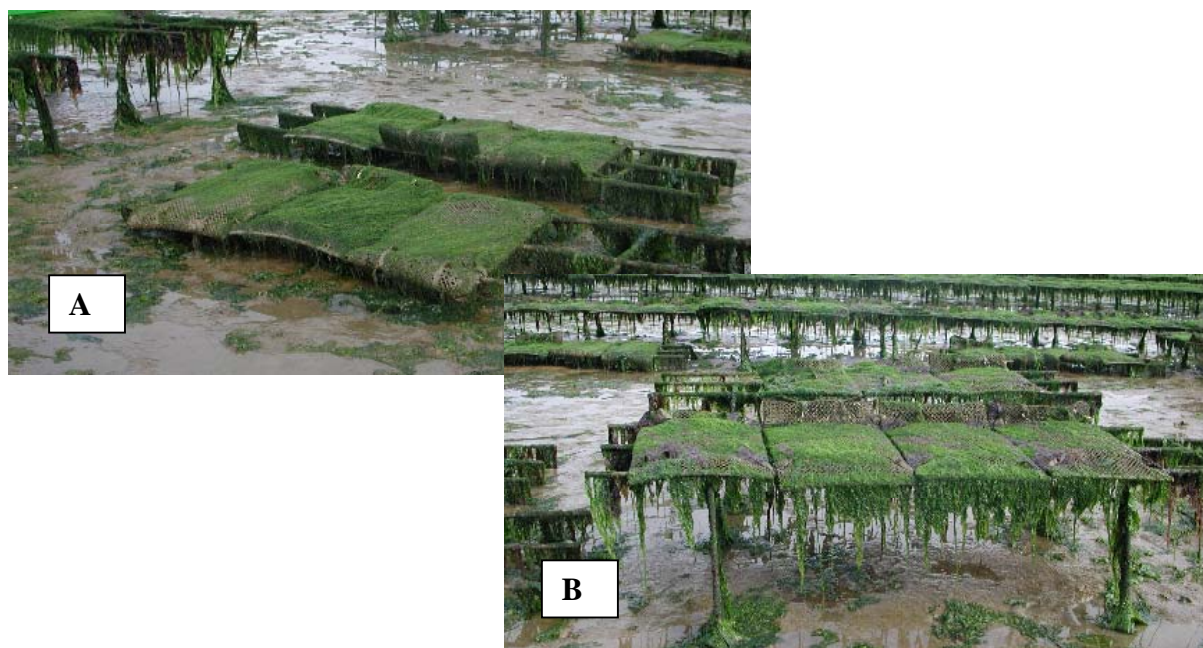
#### **3.2 Matériels et Méthodes**

##### **3.2.1 Matériel biologique**

Une population avec une variabilité assez large (pool de la série 3 de la première génération du programme MOREST) a été utilisée afin de réaliser cette étude.

Les 3 conditions expérimentales proposées sont des élevages sur tables ostréicoles et en poches traditionnelles :

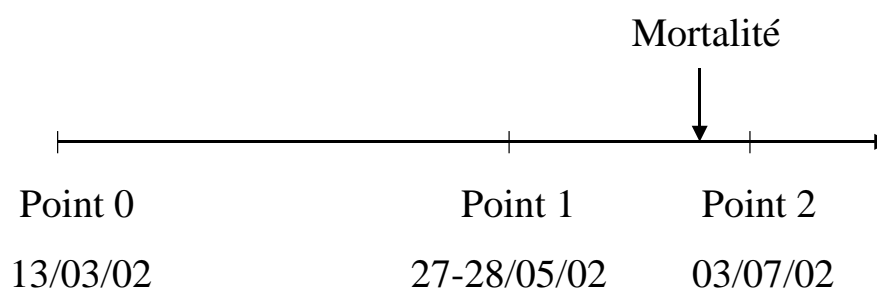
- 1- élevage sur estran à proximité du fond (15 cm du fond) sur le site atelier de Perquis (Figure 48A)
- 2- élevage sur estran à 70 cm du fond sur le site atelier de Perquis (Figure 48B)
- 3- élevage en marais sur le site d'Artouan



**Figure 48 : Poches d'huîtres posées sur des tables ostréicoles à différents niveaux par rapport au sédiment sur le site atelier de Perquis. (A) 15 cm du fond (Perquis 15), (B) 70 cm du fond (Perquis 70).**

### 3.2.2 Prélèvements

Un premier prélèvement a été réalisé avant la mise sur sites (le 13 mars 2002) afin d'estimer le taux d'aneuploïdie de cette population. Ce premier prélèvement a été nommé Point 0 et les huîtres provenaient de la nurserie de la station Ifremer de Bouin. Un deuxième prélèvement nommé Point 1 a ensuite été réalisé après plus de deux mois de mise sur sites (le 27 mai 2002 pour Artouan et le 28 mai pour Perquis) pour chaque condition environnementale. Un troisième et dernier prélèvement nommé Point 2 a eu lieu après une période de mortalité dans le milieu naturel (le 3 juillet 2002), et ce, pour chaque site (Figure 49). A chaque fois, 35 individus ont été prélevés par site et par point.



**Figure 49 : Diagramme résumant les différents points de prélèvement pour le projet DYNAMO.**

### 3.2.3 Comptage chromosomique

Le pourcentage d'aneuploïdie a été estimé en comptabilisant 30 métaphases par individu et en étudiant 20 huîtres par lot. Pour chaque lot d'huîtres, nous avons réalisé deux classes de taille : petites et grandes, et nous avons étudié 10 huîtres « petites » et 10 huîtres « grandes » par lot. La taille (longueur de coquille) des huîtres « petites » était comprise entre 40 et 60 mm et celle des « grandes » entre 60 et 90 mm.

### 3.2.4 Analyses statistiques

Des analyses de variance à un facteur ont été réalisées sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990).

## **3.3 Résultats**

### 3.3.1 Mortalité et croissance

La mortalité a été étudiée à partir de 3 poches ostréicoles contenant chacune 200 huîtres au départ pour chaque site. Un fort taux de mortalité est tout d'abord apparu à Artouan puis plus tardivement à Perquis 15 (Figure 50).

Les mesures de poids ont été effectuées sur 30 individus par lot. Les huîtres d'Artouan ont eu une meilleure croissance que celles de Perquis 15 et de Perquis 70 (Figure 51).

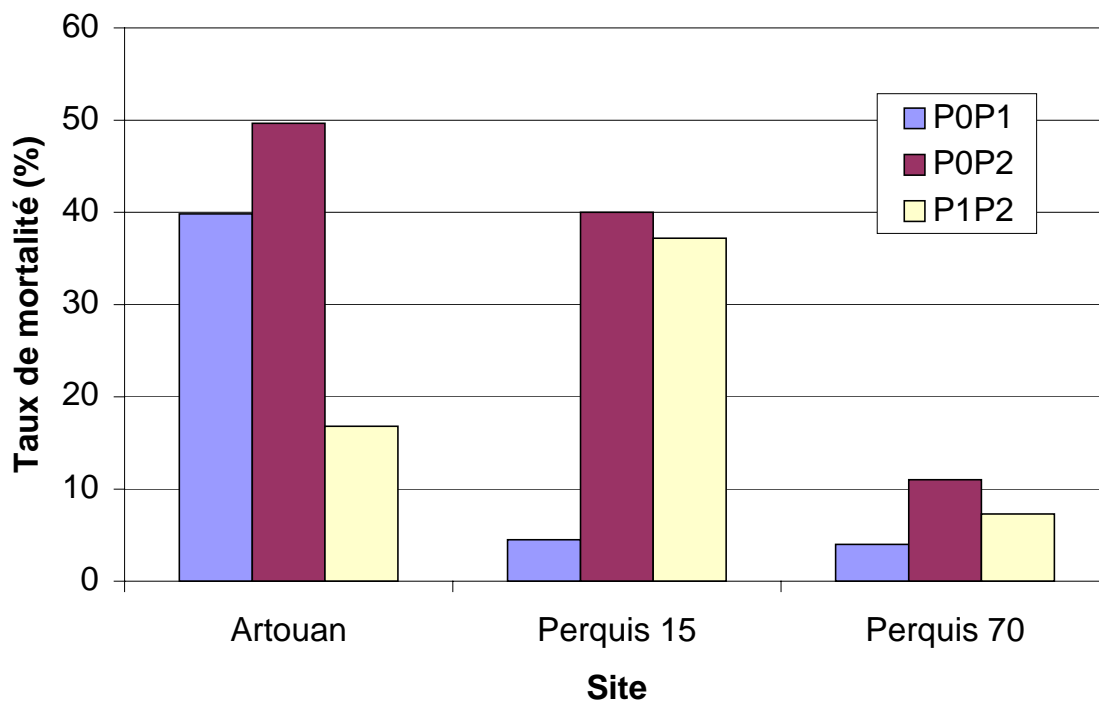


Figure 50 : Taux de mortalité (en %) des huîtres *Crassostrea gigas* en fonction du site et entre chaque point.

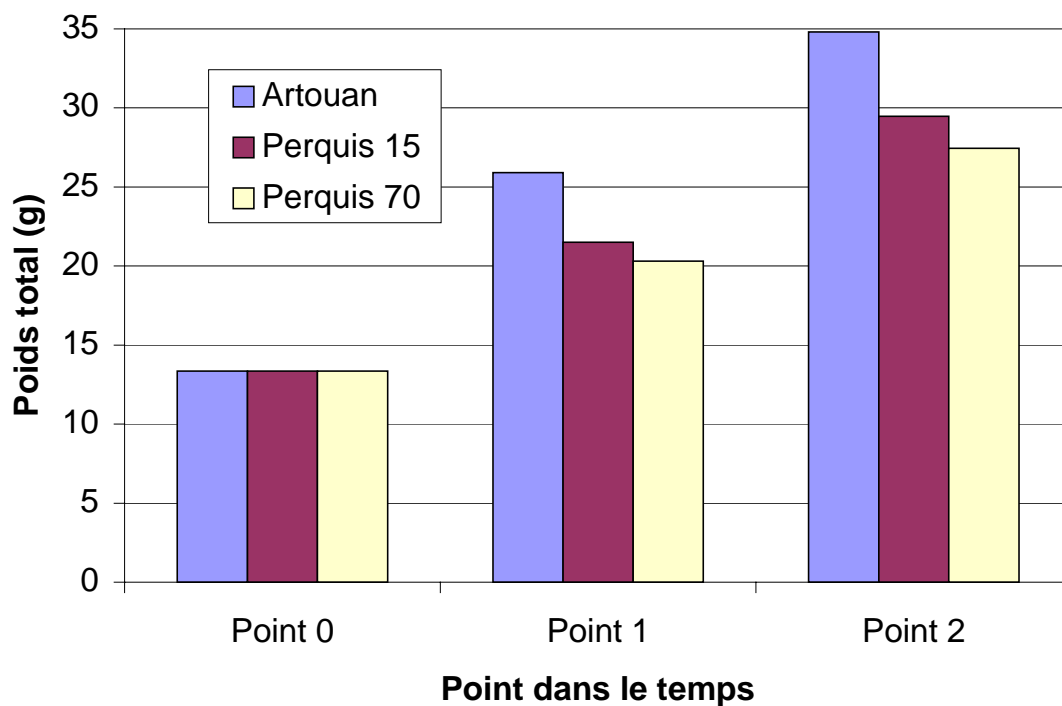
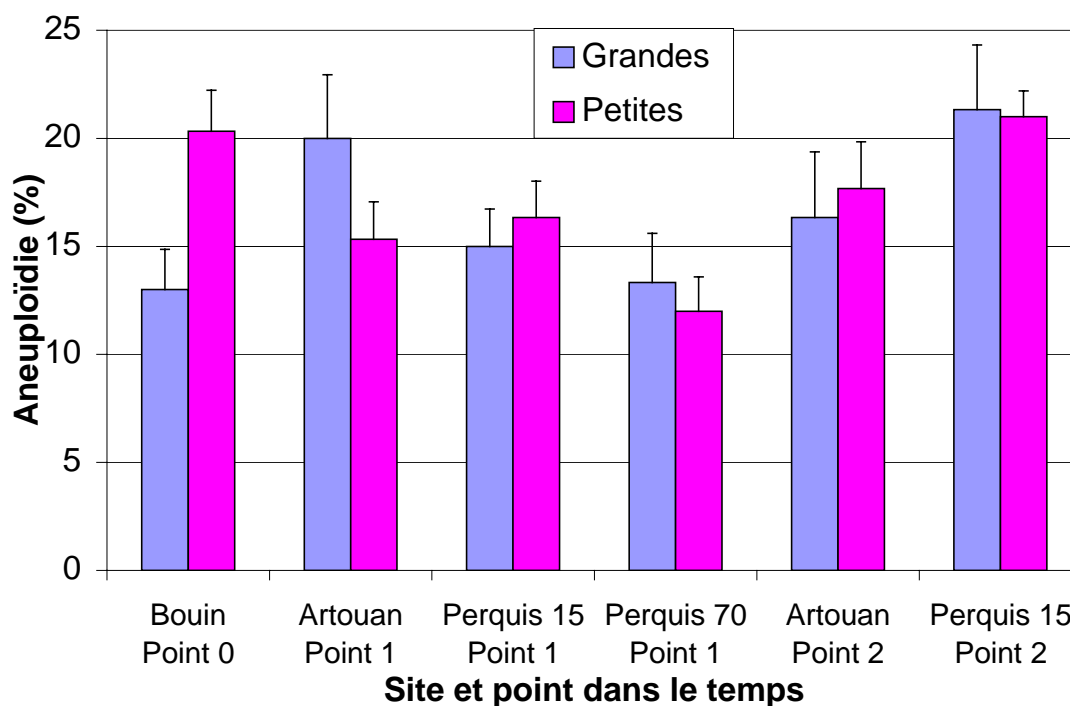


Figure 51 : Poids total (en g) des huîtres *Crassostrea gigas* en fonction du point dans le temps et du site.

### 3.3.2 Aneuploïdie

Les pourcentages d'aneuploïdie obtenus pour chaque site en fonction du point et de la taille ont varié entre 12 et 21,3% (Figure 52). Sans distinction de la taille, le plus faible taux d'aneuploïdie a été obtenu sur le site de Perquis 70 au Point 1 et le plus fort sur le site de Perquis 15 au Point 2 (Figure 53). Des analyses statistiques (ANOVA) ont été réalisées afin de comparer les résultats obtenus (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9). Afin de tenter d'expliquer les résultats observés en aneuploïdie, ces derniers ont été mis en relation avec des données sur la mortalité ainsi que sur le poids (et donc de la croissance) obtenues par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes de l'Ifremer de La Tremblade.



**Figure 52 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* pour chaque site en fonction du point dans le temps et de leur taille.**

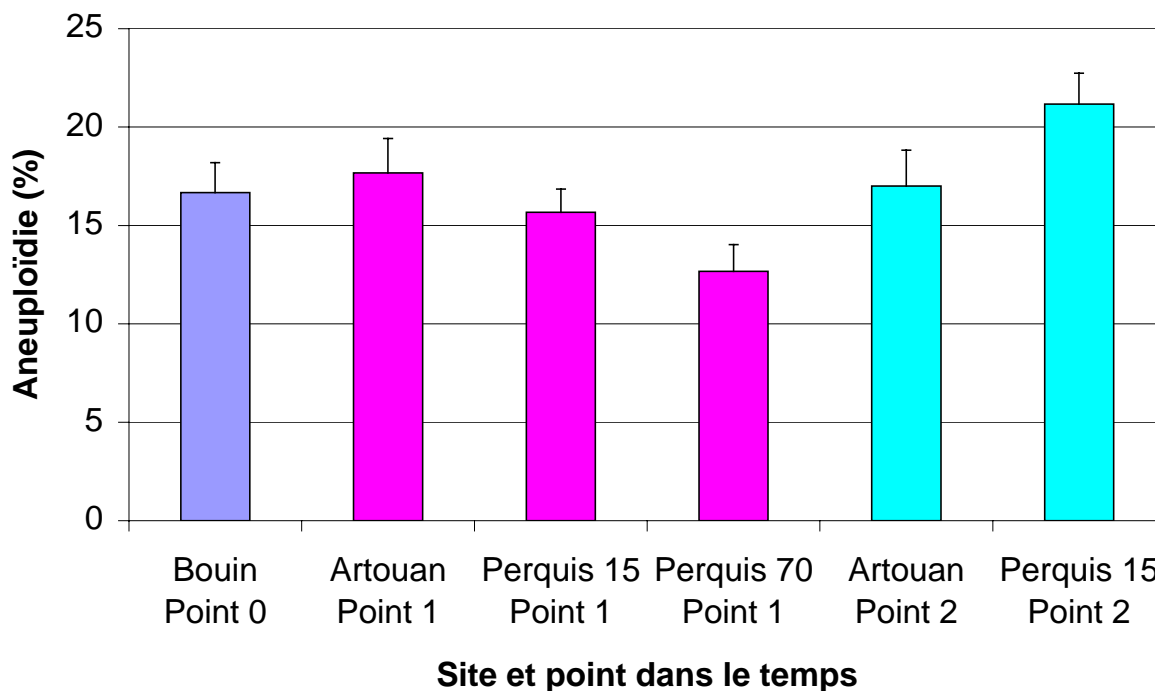


Figure 53 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* pour chaque site en fonction du point dans le temps.

Tableau 7 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre les grandes (G) et les petites (P) pour chaque point (Point 0 : P0, Point 1 : P1 et Point 2 : P2) et chaque site.

	PO	P1			P2	
	Bouin	Artouan	Perquis15	Perquis70	Artouan	Perquis15
G-P	0,017*	0,188	0,684	0,637	0,725	0,838

\*: différence significative à un risque d'erreur de 5%.

Tableau 8 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre chaque point pris deux à deux, pour chaque site, en fonction ou non de la taille.

		Artouan	Perquis 15	Perquis 70
P0P1	Grandes	0,071	0,442	1,000
	Petites	0,067	0,131	0,003*
	Ensemble	0,721	0,606	0,048*
P0P2	Grandes	0,411	0,036*	-
	Petites	0,366	0,883	-
	Ensemble	0,944	0,064	-
P1P2	Grandes	0,397	0,100	-
	Petites	0,412	0,050*	-
	Ensemble	0,793	0,012*	-



**Tableau 9 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre 2 ou 3 sites, pour chaque point, en fonction ou non de la taille.**

		P1	P2
3 sites	Grandes	0,144	-
	Petites	0,177	-
	Ensemble	0,055	-
Artouan-	Grandes	0,188	0,256
	Petites	0,684	0,242
Perquis15	Ensemble	0,390	0,105
Artouan-	Grandes	0,090	-
	Petites	0,173	-
Perquis70	Ensemble	0,030*	-
Perquis15-	Grandes	0,494	-
	Petites	0,077	-
Perquis70	Ensemble	0,087	-

### **3.4 Discussion**

L'ensemble de ces analyses nous a permis de constater qu'il existait une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les huîtres « petites » et « grandes » uniquement pour le Point 0, donc avant mise sur sites (Figure 52, Tableau 7). Entre le Point 0 et le Point 1, une différence significative du taux d'aneuploïdie a été observée pour Perquis 70 (Figure 53, Tableau 8). En effet, le taux d'aneuploïdie des huîtres sur ce site était plus faible après deux mois et demi qu'au départ, ce qui est difficilement explicable. Au Point 1, une différence significative a été observée entre les huîtres d'Artouan et celles de Perquis 70 (le taux d'aneuploïdie des huîtres d'Artouan étant plus élevé que celui de celles de Perquis 70) (Figure 53, Tableau 9). Ce plus fort taux d'aneuploïdie à Artouan au Point 1 pourrait être mis en relation avec le fort taux de mortalité observé entre le Point 0 et le Point 1 sur le site d'Artouan (Figure 50). En effet, il semblerait que la mortalité des huîtres soit corrélée avec un plus fort taux d'aneuploïdie. Ainsi, le taux d'aneuploïdie des huîtres du site Perquis 15 au Point 1 est significativement différent de celui des huîtres du même site au Point 2 qui est plus élevé (Figure 53, Tableau 8) et justement la mortalité sur ce site est apparue entre le Point 1 et le Point 2 (Figure 50). Cette différence est aussi significative entre le Point 0 et le Point 2 (Figure 53, Tableau 8). Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier le taux d'aneuploïdie des huîtres en provenance de Perquis 70 au Point 2 à cause d'un problème survenu lors des fixations des branchies. Il aurait été très intéressant de vérifier l'hypothèse d'une relation entre mortalité et taux d'aneuploïdie étant donné qu'un très faible taux de mortalité a été

observé tout au long de l'expérience à Perquis 70 (Figure 50). Si un faible taux d'aneuploïdie avait pu être observé au Point 2 à Perquis 70 et qu'il soit identique à celui observé au Point 1, nous aurions pu confirmer cette hypothèse. Il est aussi intéressant de montrer que le poids des huîtres le plus élevé au Point 1 est obtenu sur le site d'Artouan (Figure 51). La meilleure croissance est donc sur le site d'Artouan mais ceci est sûrement dû au fort taux de mortalité observé sur ce site avant le Point 1. En effet, le fort taux de mortalité a entraîné une densité plus faible, la pression trophique a ainsi diminué et la croissance des survivantes a été plus importante.

Dans le cadre de cette étude, nous avons observé des différences de taux d'aneuploïdie chez des huîtres selon divers modes de culture. A long terme, le site pourrait jouer sur le patrimoine génétique global de la population (par sélection, ...). L'élevage en poches sur des tables ostréicoles placées à 70 cm du sol semble être le meilleur mode de culture car c'est dans ces conditions que nous avons observé le plus faible taux d'aneuploïdie. Il s'agit du mode de culture principal utilisé en ostréiculture. Après une période de mortalité, il semblerait que le taux d'aneuploïdie des huîtres soit plus élevé mais ce résultat reste toutefois à confirmer.

## **4 Fluctuations au cours du temps du taux d'aneuploïdie d'huîtres d'un même site : la vasière de Brouage**

### **4.1 Introduction**

La vasière de Brouage est le site expérimental du Programme Environnement, Vie et Sociétés (PEVS) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Ce programme a pour titre : Impact des micropolluants (métaux lourds et phytosanitaires) sur le fonctionnement d'un écosystème : application sur la vasière de la zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron. La zone littorale est soumise à d'importants apports de micropolluants qui s'accumulent dans les différents compartiments des biotopes et des biocénoses et qui peuvent, par leur action toxique, perturber le fonctionnement de l'écosystème. Or, la frange côtière est une zone à forte activité économique (aquaculture, pêche, tourisme) extrêmement sensible à ce type de pollution. Le site des Pertuis Charentais constitue une zone privilégiée pour une telle étude. Effectivement, il est soumis à une pollution métallique chronique par le mercure

provenant de la Charente et par le cadmium, zinc et cuivre provenant de la Gironde et des zones portuaires de La Rochelle (Charente-Maritime, France). De plus, la Charente qui alimente en partie le bassin de Marennes-Oléron véhicule des produits phytosanitaires en quantités non négligeables (Scribe *et al.*, 1999). Les objectifs de ce programme sont 1) d'évaluer l'impact des contaminants sur le fonctionnement de cet écosystème particulier et 2) d'estimer le rôle d'acteur des organismes vivants dans la transformation et le transfert des contaminants, et en particulier, l'influence de la structure du réseau trophique sur le devenir des contaminants.

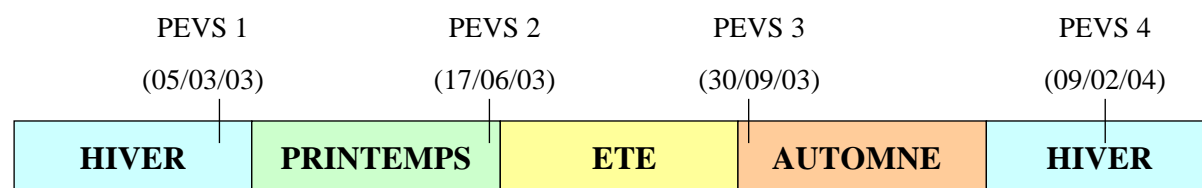
En ce qui nous concerne, cette analyse dans le milieu naturel, sur un même site (connu pour être soumis à une pollution métallique et chimique), à des périodes différentes est intéressante afin de connaître l'évolution du taux d'aneuploïdie des huîtres d'une même population au cours du temps.

## **4.2 Matériels et méthodes**

### **4.2.1 Matériel biologique**

Des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles très allongées, de longueur moyenne 60 – 70 mm, poussant naturellement les unes sur les autres sur la vasière de Brouage ont été utilisées pour réaliser cette étude.

Plusieurs prélèvements d'huîtres ont été effectués au cours d'une année sur ce site. Quatre prélèvements d'huîtres ont été réalisés les 5 mars (PEVS 1), 17 juin (PEVS 2), et 30 septembre 2003 (PEVS 3), et le 9 février 2004 (PEVS 4) (Figure 54). Les huîtres, provenant d'un captage naturel, ont dû être détroquées. A chaque prélèvement, une centaine d'huîtres juvéniles de taille approximativement équivalente a été conservée.



**Figure 54 : Diagramme représentant les différents points de prélèvement sur la vasière de Brouage selon la saison.**

#### 4.2.2 Conditionnement

Les huîtres ont été placées dans différentes salles de l'écloserie afin de les conditionner (augmentation de température jusqu'à 15°C et addition de nourriture) excepté pour le prélèvement du mois de septembre. En effet, à cette période de l'année, l'écloserie était en vide sanitaire et les huîtres ont été placées dans des bassins extérieurs. Au bout de 3 à 4 semaines, 35 branchies d'huîtres ont été fixées par prélèvement.

#### 4.2.3 Comptage chromosomique

Les huîtres des deux premiers prélèvements étaient très riches en métaphases et 30 individus par prélèvement ont pu être analysés. Par contre, l'indice mitotique de celles de septembre était très faible et une nouvelle fixation a été réalisée lorsque nous disposions de cultures d'algues (2 mois après le prélèvement sur le milieu). Malheureusement, l'indice mitotique de ces nouvelles huîtres était à nouveau très faible et seulement 10 individus ont pu être analysés pour l'estimation de l'aneuploïdie. Pour le dernier prélèvement, 30 individus ont pu être analysés.

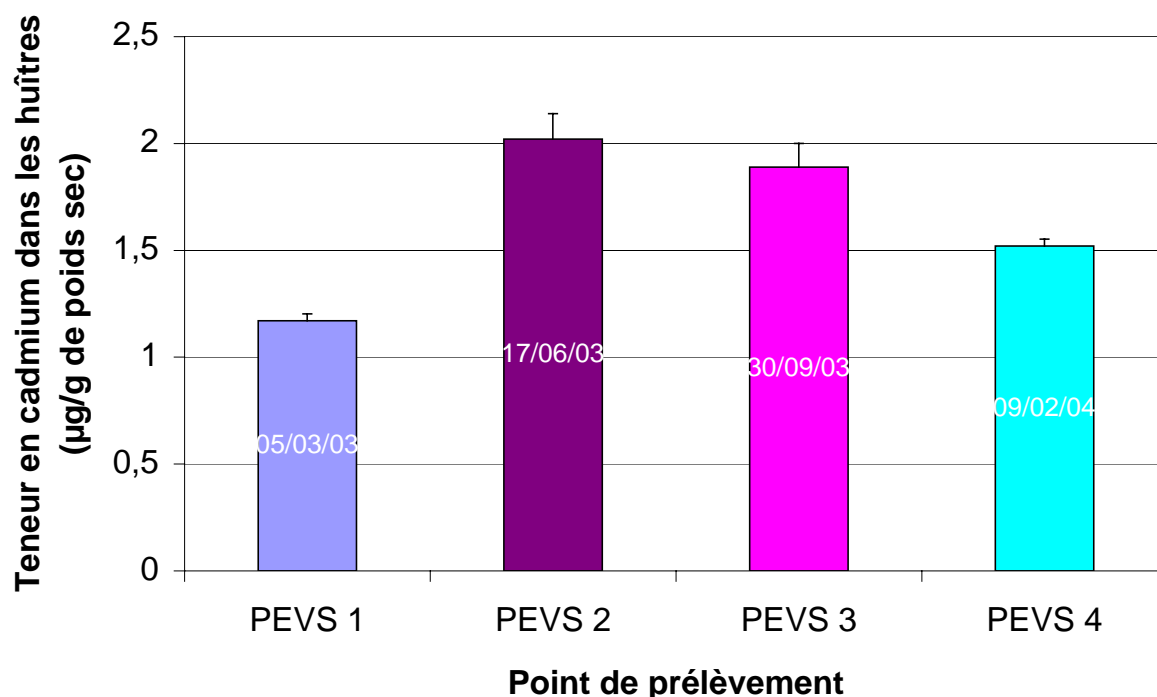
#### 4.2.4 Analyses statistiques

Des analyses de variance à un facteur (prélèvement) ont été réalisées sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990) à la fois pour comparer les taux d'aneuploïdie mais aussi les teneurs en cadmium entre les différents points de prélèvement.

### 4.3 Résultats

#### 4.3.1 Quantification du cadmium

Les teneurs en cadmium au sein des huîtres ont varié de 1,17 à 2,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec (Figure 55). Une différence significative entre les 4 points de prélèvement a été observée ( $F=20,618$  ;  $p<0,001$ ). La teneur en cadmium dans les huîtres est donc différente entre chaque point excepté entre juin et septembre 2003 ( $F=0,568$  ;  $p=0,473$ ).

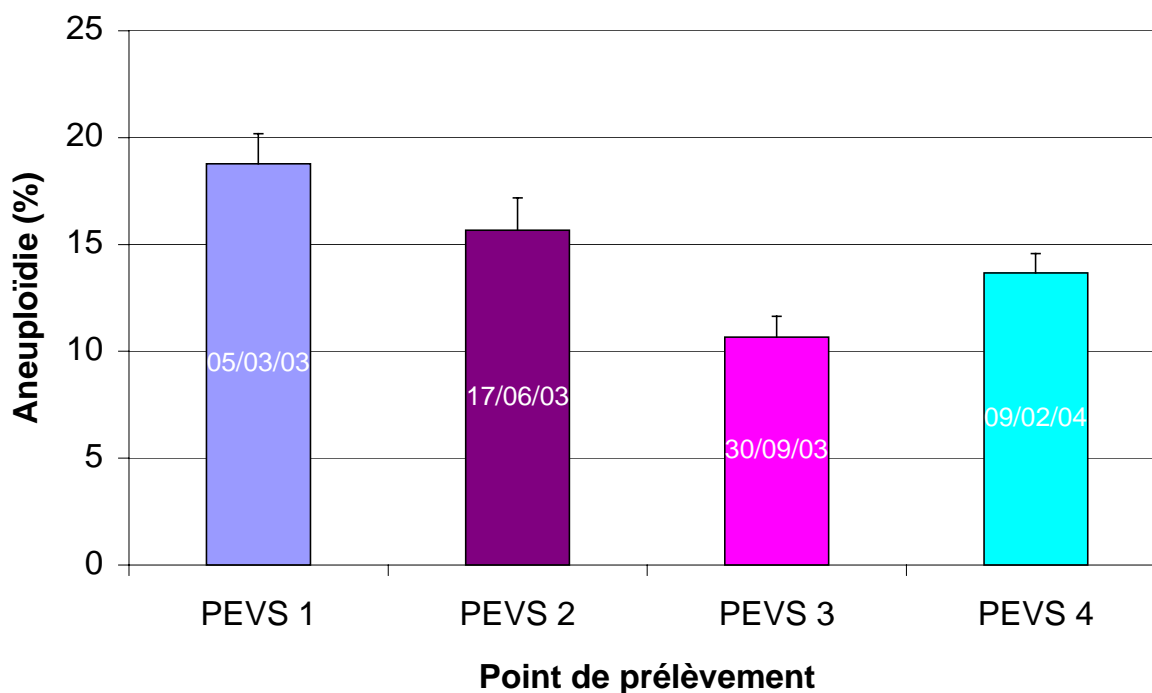


**Figure 55 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) à différents points de prélèvement sur la vasière de Brouage.**

#### 4.3.2 Aneuploïdie

Les pourcentages d'aneuploïdie des huîtres aux différents points de prélèvement ont varié entre 10,7 et 18,8% (Figure 56). Une analyse de variance a montré qu'il existait des différences significatives entre les différents points de prélèvement ( $F=4,670$  ;  $p=0,004$ ). Une nouvelle analyse statistique a révélé une différence significative entre mars et septembre 2003

( $F=10,38$  ;  $p=0,003$ ) et les mois de mars 2003 et février 2004 ( $F=9,312$  ;  $p=0,003$ ) ; mais pas entre les mois de mars et juin 2003 ( $F=2,274$  ;  $p=0,137$ ), de juin et septembre 2003 ( $F=3,349$  ;  $p=0,071$ ), de juin 2003 et février 2004 ( $F=1,289$  ;  $p=0,261$ ) et de septembre 2003 et février 2004 ( $F=3,193$  ;  $p=0,082$ ).



**Figure 56 : Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* de la vasière de Brouage à différents points de prélèvement.**

#### **4.4 Discussion**

Au cours de l'année 2003, le taux d'aneuploïdie a diminué. Le plus fort taux d'aneuploïdie observé était de 18,8% en mars 2003. Au début de l'année 2004, le taux d'aneuploïdie était plus faible que l'année précédente en période hivernale. Nous avons déjà montré que l'atrazine était corrélée positivement avec le taux d'aneuploïdie chez l'huître *Crassostrea gigas* en milieu contrôlé (Partie III). De plus, Munaron *et al.* (2003) ont montré, dans une étude portant sur l'estimation des apports d'herbicides dans le bassin de Marennes-Oléron pour l'année 2001, que les produits phytosanitaires se trouvaient en plus grande quantité en hiver (ruissellement plus important) et au printemps (période d'épandage d'avril à juillet). Ainsi, les résultats observés pourraient s'expliquer en partie avec les quantités

d'atrazine retrouvées dans le milieu étant donné que le plus faible taux d'aneuploïdie a été observé en période estivale (septembre 2003). Cependant, le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas a réalisé des analyses de pesticides au niveau de l'eau interstitielle des sédiments sur la vase de Brouage en juin 2002 (Annexe 4). Ces analyses ont montré que l'atrazine était très peu présente sur ce site au moment du prélèvement (seulement  $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et en faible quantité ( $0,15 \mu\text{g l}^{-1}$ ) au niveau du canal de Montportail, à l'est de la radiale du PEVS, à la sortie d'une parcelle agricole drainée. Pourtant, en général, les valeurs pics en atrazine dans le milieu aquatique sont retrouvées au mois de juin. Malheureusement, nous n'avons aucune donnée sur les teneurs en pesticides dans l'eau au moment des prélèvements. Le plus faible taux d'aneuploïdie observé en février 2004 par rapport à mars 2003 pourrait peut-être s'expliquer par des précipitations plus faibles pendant l'hiver 2004 (et donc un apport plus faible en herbicides) et/ou par une diminution des quantités de pesticides (et en particulier l'atrazine) utilisées par les agriculteurs. En effet, l'interdiction totale de l'atrazine a été décidée fin 2001. Toutefois, la date limite de distribution de l'atrazine était fixée au 30 septembre 2002 et son utilisation au 30 septembre 2003. Il se peut donc que les quantités d'atrazine épandues au cours de l'été 2003 aient été moindres et donc que ce soit une des raisons pour laquelle nous observons un plus faible taux d'aneuploïdie au cours de l'hiver 2004. Nous avons aussi montré l'effet potentiel du cadmium sur l'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* adultes (Partie IV). Nous avons donc évalué les teneurs en cadmium au sein des huîtres afin d'établir ou non une relation entre les concentrations en cadmium et les taux d'aneuploïdie observés. En effet, les fluctuations des taux d'aneuploïdie observés au cours du temps dépendent probablement de plusieurs facteurs environnementaux et de nombreux polluants sont présents dans le bassin de Marennes-Oléron.

Nous avons observé des teneurs en cadmium au sein des huîtres plus importantes en période estivale. En effet, les teneurs en cadmium au sein des huîtres en juin 2003 et septembre 2003 étaient de  $2,02$  et  $1,89 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec respectivement alors qu'elles étaient de  $1,17$  et  $1,52 \mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec en mars 2003 et février 2004 respectivement. Ces résultats diffèrent de ceux d'Amiard *et al.* (1994) qui observaient des quantités en cadmium dans les tissus mous des huîtres plus élevées en période hivernale. Toutefois, leurs conditions expérimentales n'étaient pas identiques puisque les huîtres étaient en milieu contrôlé et non en milieu naturel. Le plus fort taux d'aneuploïdie a été observé au sein d'animaux ayant la plus faible teneur en cadmium. Le cadmium ne peut donc pas expliquer, en partie, les fluctuations des taux d'aneuploïdie des huîtres au cours d'une période d'un an. Plusieurs causes doivent

expliquer ces variations d'aneuploïdie mais elles ne sont pas encore toutes connues ; les quantités de produits phytosanitaires (et en particulier l'atrazine) doivent en être une malgré le fait que nous n'ayons aucune donnée sur la quantité de ces produits dans l'eau ou bien dans les huîtres au moment des prélèvements. Les différences de croissance des huîtres selon la période pourraient aussi en être une car la croissance phytoplanctonique (source de nourriture pour l'huître) est aussi différente selon la saison.

## **5 Relation entre croissance due à l'hétérosis et aneuploïdie ?**

### **5.1 Introduction**

Dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire américain de l'Université de DAVIS, Californie, et de la Taylor Shellfish Farms, Washington, des analyses ont été effectuées afin de comparer le taux d'aneuploïdie (au stade juvénile) de lignées consanguines d'huîtres creuses et de leurs hybrides. En effet, il a été mis en évidence un fort effet d'hétérosis sur la croissance d'animaux hybrides entre lignées consanguines chez *Crassostrea gigas* aux stades larvaire, juvénile ou adulte (Hedgecock *et al.*, 1995, 1996 ; Bayne *et al.*, 1999). De plus, nous savons qu'il existe une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance chez *C. gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 ; Zouros *et al.*, 1996 ; Leitão *et al.*, 2001a). Il apparaît donc tout à fait intéressant d'observer s'il existe une relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie.

### **5.2 Matériels et méthodes**

#### **5.2.1 Matériel biologique**

Des lignées consanguines de seconde génération 6 x 6 et 16 x 16 et leurs hybrides 6 x 16 et 16 x 6 ont été étudiées (Expérience 1), ainsi que des lignées consanguines de troisième génération 35 x 35 et 51 x 51 et leurs hybrides 35 x 51 et 51 x 35 (Expérience 2). Toutes ces lignées ont été élaborées au sein de l'écloserie de la Taylor Shellfish Farms à Quilcene, Washington (Etats-Unis).



Lorsque ces huîtres ont atteint une taille suffisante pour les transférer dans le milieu naturel, celles-ci ont été mises en culture à Dabob Bay, Washington (Etats-Unis).

### 5.2.2 Conditionnement

En ce qui concerne l'expérience 1, les huîtres ont été conditionnées à la nurserie de l'écloserie de la Taylor Shellfish Farms pendant une semaine avant les fixations. Par contre, pour l'expérience 2, les huîtres ont été conditionnées pendant trois mois au sein du conservatoire de souches de l'écloserie de La Tremblade.

### 5.2.3 Analyses statistiques

Des analyses de variance à un facteur (lots) ont été réalisées sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). De plus, des analyses de variance à deux facteurs (consanguines ou hybrides, familles) ont été effectuées également sur SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). Afin de comparer les deux expériences, une analyse de variance à trois facteurs (expérience 1 ou 2, consanguines ou hybrides, familles) a aussi été réalisée.

## **5.3 Résultats**

### 5.3.1 Longueur et poids des huîtres

Les mesures de la longueur des coquilles ainsi que le poids de chaque huître ont été effectuées. Le Tableau 10 donne la moyenne de la longueur des coquilles et le poids moyen pour chaque lignée sur les 35 huîtres étudiées ainsi que sur les 10 huîtres analysées pour chacune des deux expériences.

**Tableau 10 : Longueur de la coquille moyenne (en mm) et poids moyen (en g) des huîtres *Crassostrea gigas* analysées et étudiées pour chaque lignée (lignées consanguines 6 x 6 et 16 x 16, lignées hybrides 6 x 16 et 16 x 6 de l'expérience 1, et lignées consanguines 35 x 35 et 51 x 51, lignées hybrides 51 x 35 et 35 x 51 de l'expérience 2).**

Lignée	Moyenne longueur coquille (mm)		Moyenne Poids (g)	
	10 analysées	35 étudiées	10 analysées	35 étudiées
6 x 6	23,0	20,7	0,689	0,581
16 x 16	23,8	22,1	0,782	0,654
6 x 16	22,5	22,3	0,690	0,718
16 x 6	28,4	28,4	1,183	1,216
35 x 35	40,0	37,4	4,101	3,273
51 x 51	33,8	33,5	2,030	1,966
51 x 35	46,8	46,1	4,363	4,212
35 x 51	38,6	37,7	3,307	3,253

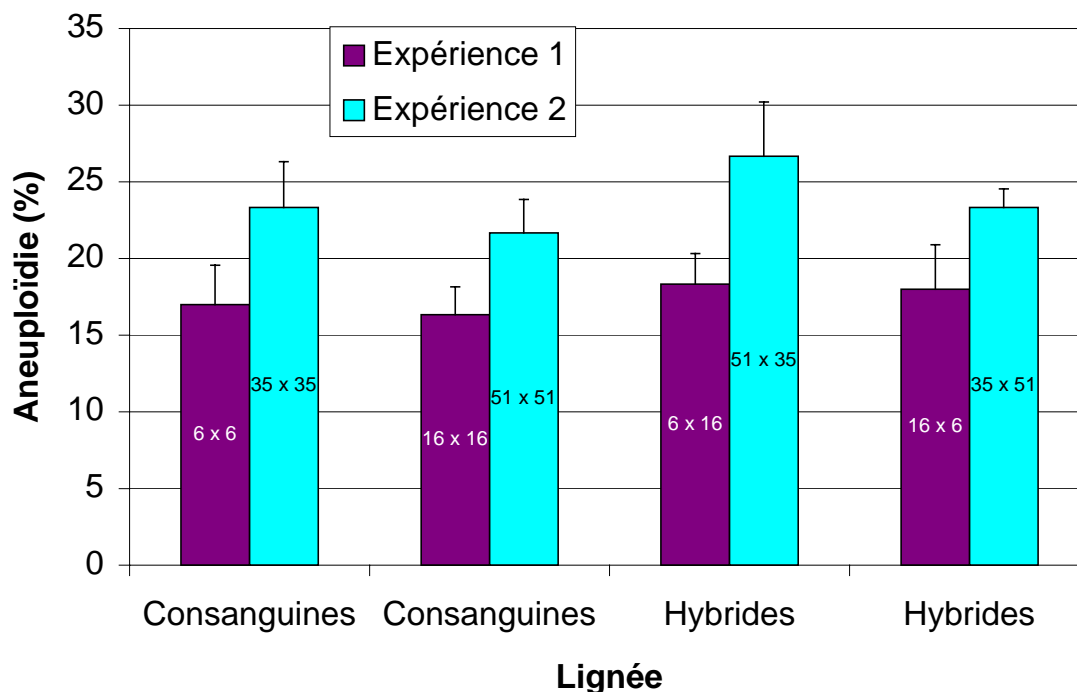
### 5.3.2 Aneuploïdie des huîtres

Seulement 10 huîtres ont été analysées par lignée sur les 35 au départ car certaines huîtres étaient très pauvres en métaphases (elles avaient un faible indice mitotique) et il était donc impossible de trouver 30 métaphases pour une grande partie des individus. Les taux d'aneuploïdie des lignées consanguines et de leurs hybrides ne diffèrent pas quel que soit l'expérience (Figure 57). En effet, pour les expériences 1 et 2, aucune différence significative entre les lots n'a été observée ( $F=0,151$  ;  $p=0,928$  et  $F=0,635$  ;  $p=0,597$  respectivement). Si nous comparons les lignées consanguines et leurs hybrides entre elles, nous n'observons aucune différence significative ( $F=0,403$  ;  $p=0,529$  et  $F=0,902$  ;  $p=0,349$ ). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les 2 familles ( $F=0,045$  ;  $p=0,834$  et  $F=0,902$  ;  $p=0,349$ ).

### 5.3.3 Comparaison entre les deux expériences

Les taux d'aneuploïdie des huîtres consanguines et de leurs hybrides des deux expérimentations ont été comparés (Figure 57). Les taux d'aneuploïdie se sont globalement avérés plus élevés pour l'expérience 2. Une analyse statistique a ainsi montré qu'il n'existait aucune différence significative ni entre les familles ( $F=0,720$  ;  $p=0,399$ ), ni entre les

consanguines et leurs hybrides ( $F=1,279$  ;  $p=0,262$ ). Par contre, des différences significatives entre les expériences 1 et 2 ont été observées ( $F=12,829$  ;  $p=0,001$ ).



**Figure 57 : Pourcentages d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* consanguines et hybrides des deux expériences.**

#### 5.4 Discussion

Le faible indice mitotique observé était peut-être dû à un mauvais conditionnement des huîtres. En effet, en ce qui concerne l'expérience 1, les huîtres ne sont rentrées en nurserie qu'une semaine avant d'effectuer les fixations, donc elles n'étaient qu'en faible pousse et probablement en faible activité mitotique. Pour la seconde expérience, les huîtres sont restées trois mois à l'écloserie mais l'eau n'était pas chauffée et la quantité de nourriture supplémentaire par rapport au milieu assez faible, ce qui peut aussi induire une activité mitotique peu élevée. Pour les deux expériences, ce sont les lignées hybrides qui ont présenté le plus faible indice mitotique.

Les lignées consanguines et les hybrides 6 x 16 présentaient la même longueur moyenne de coquille et le même poids moyen. Seuls les hybrides 16 x 6 avaient une longueur moyenne de coquille plus élevée et donc un poids moyen plus élevé. Cependant, Hedgecock

et Davis (2000) ont montré que les hybrides ont une plus forte croissance que les consanguines. Notre lignée hybride 16 x 6 avait bien une croissance plus élevée que les consanguines 6 x 6 et 16 x 16 mais ce n'était pas le cas pour la lignée hybride 6 x 16. Aucune différence significative du taux d'aneuploïdie entre les lignées consanguines et leurs hybrides n'a été observée. Etant donné qu'une des lignées hybrides avait une croissance identique à celle des consanguines, une étude complémentaire nous avait semblé nécessaire pour vérifier ce résultat. C'est la raison pour laquelle de nouvelles lignées des Etats-Unis ont été reçues afin de valider ou non les premiers résultats observés.

La lignée consanguine 51 x 51 présentait la plus faible longueur moyenne de coquille et donc le plus faible poids moyen. Par contre, l'autre lignée consanguine 35 x 35 présentait la même longueur moyenne de coquille et le même poids moyen que la lignée hybride 35 x 51. Seule la lignée hybride 51 x 35 avait une longueur moyenne de coquille plus élevée et donc un poids moyen plus élevé (Figure 58). Notre lignée hybride 51 x 35 avait donc bien une croissance plus élevée que les consanguines 35 x 35 et 51 x 51 mais ce n'était pas le cas pour la lignée hybride 35 x 51. Nous ne retrouvons donc pas le phénomène d'hétérosis sur la croissance (Hedgecock *et al.*, 1995, 1996), tout comme lors de la première expérience. Il aurait peut-être fallu attendre que les huîtres juvéniles aient atteint une plus grande taille afin d'observer ce phénomène.



**Figure 58 : Huîtres *Crassostrea gigas* issues des lignées consanguines 51 x 51 et 35 x 35 et des lignées hybrides 35 x 51 et 51 x 35 de l'expérience 2. Echelle = 17 mm.**

Des taux d'aneuploïdie plus élevés ont été observés chez les huîtres de troisième génération (51 et 35) par rapport à celles de seconde génération (6 et 16). Il aurait été intéressant d'étudier la troisième génération des familles 6 et 16 pour savoir si leur taux d'aneuploïdie augmentait aussi. Par contre, il ne faut pas omettre que ces deux séries d'huîtres n'ont pas suivi le même parcours. En effet, les huîtres des deux expérimentations sont restées à peu près le même temps à Dabob Bay, mais les huîtres de la seconde expérimentation sont restées dans un autre environnement d'écloserie pendant une période additionnelle de trois mois. Les huîtres présentes à Dabob Bay pendant la période estivale ont pu avoir une assez bonne croissance car c'est aussi une période de croissance phytoplanctonique. Au sein de l'écloserie, en période automnale, l'apport nutritionnel n'est pas très important et les huîtres ont eu une croissance assez modérée. Les huîtres de l'expérience 2 pouvaient donc avoir un plus faible taux de croissance que celles de l'expérience 1 au moment de l'étude de l'aneuploïdie, ce qui pourrait peut-être expliquer les plus forts taux d'aneuploïdie retrouvés pour l'expérience 2.

Au vu des résultats identiques pour les deux expérimentations, il n'existerait aucune relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie. Cependant, il ne faut pas oublier que cette étude a été réalisée parce qu'une relation négative entre l'aneuploïdie et le taux de croissance a été démontrée chez des huîtres *Crassostrea gigas* (ex : Leitão *et al.*, 2001a) et que les hybrides ont normalement une croissance plus élevée que les consanguines (Hedgecock *et al.*, 1995, 1996), ce qui n'était pas le cas dans nos deux études.

## **6 Conclusion**

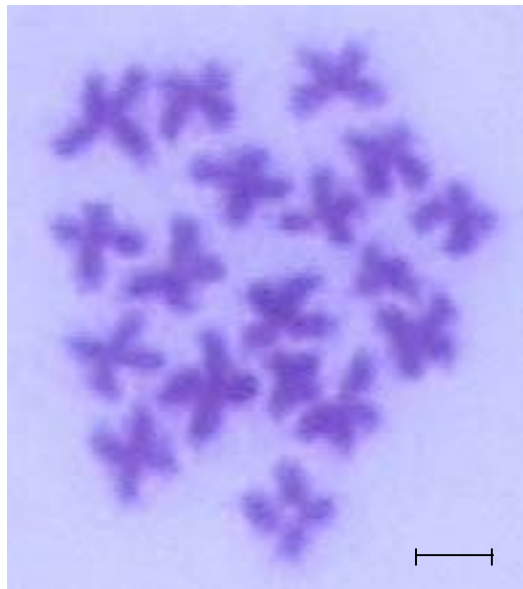
L'aneuploïdie chez les huîtres peut être influencée par l'environnement dans lequel vivent ces organismes. Ceci a été suggéré à plusieurs reprises avec nos expérimentations dans le milieu naturel. En effet, des individus de la même famille mis en élevage sur des sites différents présentaient des taux d'aneuploïdie différents. Ainsi, des conditions environnementales différentes pourraient avoir un impact sur le taux d'aneuploïdie des huîtres. Le mode de culture des huîtres pourrait aussi avoir une influence sur leur taux d'aneuploïdie. En effet, sur un même site mais à des hauteurs d'eau différentes, les huîtres peuvent être soumises à des conditions environnementales différentes et subir des stress amenant à la mortalité. De plus, sur un même site, des fluctuations au cours du temps du taux d'aneuploïdie d'huîtres sauvages ont aussi été observées. Ces fluctuations pourraient aussi

être dues à différents facteurs environnementaux comme la présence de polluants chimiques par exemple qui sont en plus ou moins faible quantité selon la saison.

Juste après une période de mortalité, il semblerait que le taux d'aneuploïdie des huîtres soit plus élevé. Par contre, aucune relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* n'a pu être établie en étudiant des familles qualifiées de « résistantes » et « sensibles ». Cependant, les analyses ont été effectuées 4 mois après avoir observé ce fort taux de mortalité, donc il est possible que les huîtres les plus affaiblies soient mortes juste après la période de mortalité et que les survivantes aient des taux d'aneuploïdie identiques à ceux des familles qualifiées de « résistantes ». L'augmentation du taux d'aneuploïdie suite à une période de mortalité avait été observée juste après celle-ci. Il doit donc être nécessaire d'étudier l'aneuploïdie de survivantes juste après une période de mortalité car si le temps qui sépare la période de mortalité et l'étude de l'aneuploïdie est trop long, il se peut qu'aucun effet de la mortalité ne puisse être observé.

Des lignées consanguines et leurs hybrides ont présenté des taux d'aneuploïdie identiques. Nous nous attendions à observer un plus faible taux d'aneuploïdie pour les huîtres hybrides car normalement, celles-ci ont une croissance plus élevée que les consanguines (Hedgecock *et al.*, 1995, 1996) et les individus à plus forte croissance ont un taux d'aneuploïdie plus faible chez *C. gigas* (ex : Leitão *et al.*, 2001a). Toutefois, le phénomène d'hétérosis sur la croissance n'a pas été observé dans nos deux études, donc c'est peut-être la raison pour laquelle nous n'observons pas de relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie.

# Conclusion générale et Perspectives



*Métaphase aneuploïde de Crassostrea gigas avec  $2n=18$  chromosomes*

*Echelle = 4  $\mu$ m*





---

## Conclusion générale et Perspectives

Le phénomène de l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* est étudié depuis une vingtaine d'années sans que les facteurs ayant un effet sur le taux de ce phénomène ne soient clairement identifiés. Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène complexe faisant intervenir des facteurs génétiques mais aussi environnementaux. Les objectifs principaux de ce travail étaient de déterminer si (1) le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* pouvait être influencé par une pollution environnementale et si tel était le cas, si l'effet persistait dans le temps et entre les générations, (2) l'aneuploïdie est un phénomène agissant sur les mêmes chromosomes ou bien si certains facteurs agissent sur différents chromosomes cibles, (3) une relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie existe, (4) les conditions environnementales ont une influence sur le taux d'aneuploïdie des huîtres *C. gigas*, (5) le taux d'aneuploïdie des huîtres d'une même population évolue au cours du temps sur un même site et (6) une relation entre croissance due à l'hétérosis et aneuploïdie existe.

L'influence d'une pollution environnementale sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* a été démontrée grâce à cette étude. En effet, nous avons montré l'existence d'une corrélation positive entre la présence **d'atrazine** et le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* adultes et juvéniles. De plus, l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie a persisté à la génération suivante, ce qui est en accord avec l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère. Il serait intéressant de poursuivre ce travail en étudiant la troisième génération afin de confirmer ou non cette hypothèse. Une prochaine étape complémentaire serait d'effectuer des croisements entre mâles non exposés à l'atrazine et femelles exposées à l'atrazine et l'inverse afin de savoir si seul un des parents transmet un taux d'aneuploïdie plus élevé à ses descendants ou bien si les deux sont incriminés. Cette étude a également permis de montrer qu'après une courte période de retour dans des conditions non polluées, l'effet observé persistait dans le temps. Ainsi, l'atrazine pourrait avoir un effet défavorable sur la formation des fibres du fuseau mitotique qui entraînerait une perte chromosomique plus importante et qui ne serait pas réversible.

Par contre, l'influence du **cadmium** sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* n'a pas été montrée. Une augmentation du taux d'aneuploïdie chez des huîtres adultes exposées au cadmium a bien été observée mais ce résultat n'a pas été confirmé chez des huîtres juvéniles exposées plus longtemps au cadmium que les adultes. De plus, les descendants des

huîtres adultes exposées au cadmium n'ont pas montré de différences significatives dans leur taux d'aneuploïdie. A une concentration proche de la valeur pic retrouvée dans le bassin de Marennes-Oléron, le cadmium ne semble pas influencer le taux d'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas*. Il serait intéressant d'effectuer des expérimentations avec des concentrations plus élevées étant donné que le cadmium est connu pour ses propriétés clastogènes et aneugènes.

Une pollution environnementale peut donc causer des dommages génétiques importants chez l'huître creuse *C. gigas*. La concentration d'atrazine intermédiaire testée dans notre étude est tout de même très rare dans les milieux où vivent les huîtres. Toutefois, une multitude de produits chimiques se retrouvent dans le milieu aquatique, certains de ces produits peuvent avoir des propriétés aneugènes et ils agissent peut-être en synergie sur le génome de l'huître *C. gigas*. Une autre expérimentation en milieu contrôlé avec un mélange de plusieurs produits actifs avec des concentrations maximales retrouvées dans le milieu serait intéressante à réaliser.

Quel que soit le facteur intervenant sur le taux d'aneuploïdie, il semblerait que ce soit toujours les mêmes paires de chromosomes qui soient touchées par la perte de l'un d'entre eux. En effet, notre étude a montré que l'atrazine n'avait pas d'effet spécifique sur l'identité des paires de chromosomes absentes dans les cellules aneuploïdes. Cette étude a confirmé que seuls les chromosomes des paires 1, 5, 9 et 10 pouvaient être perdus en un seul exemplaire. Ceci nous amène à nous poser la question : Pourquoi la cellule peut-elle tolérer une perte non aléatoire des chromosomes ? Ceci est peut-être en relation avec l'expression des gènes. Les gènes normalement présents sur chaque chromosome sont en double copie puisque dans une paire chromosomique il existe deux chromosomes homologues. Lorsqu'un chromosome est absent d'une paire chromosomique, le manque est probablement compensé par d'autres copies de gènes présentes sur son homologue. Les paires les plus petites (9 et 10) possèdent moins de gènes et devraient donc être les plus favorables à la perte d'un chromosome. Ces chromosomes de petite taille ont également moins de chiasmas pendant la méiose I (Verma, 1990) et peuvent donc être plus facilement perdus. Les chromosomes de la paire 1 sont les plus grands et pourtant ils sont très souvent perdus. C'est même ce chromosome qui est le plus souvent perdu (61%). Les chromosomes de la paire 1 sont peut-être hétérochromatiques et par conséquent ont un grand nombre de séquences d'ADN répété. Ceci pourrait expliquer que leur perte soit mieux tolérée par les cellules étant donné qu'ils pourraient avoir peu de gènes par rapport à leur taille. Une cartographie génétique de *C. gigas* pourrait nous permettre

de mieux comprendre la perte chromosomique. Cette dernière est d'ailleurs en cours de réalisation. Le récent développement de nouvelles techniques moléculaires chez l'huître, telles que la digestion enzymatique et l'hybridation *in situ* par fluorescence devrait nous permettre de mieux comprendre ce phénomène.

Aucune relation entre mortalités estivales différentielles et aneuploïdie chez *C. gigas* n' a pu être établie. Des familles qualifiées de « résistantes » et « sensibles » ont été étudiées mais les analyses d'aneuploïdie ont été effectuées 4 mois après l'observation d'un fort taux de mortalité. Au bout de 4 mois, les huîtres les plus « affaiblies » sont probablement mortes. Il serait souhaitable de renouveler l'expérience en étudiant l'aneuploïdie des huîtres « résistantes » et « sensibles » juste après une période de mortalité. Des huîtres « affaiblies » mais encore vivantes pourraient peut-être nous montrer que leur taux d'aneuploïdie est plus élevé que des huîtres « en bonne santé ». Nous croyons toujours en l'hypothèse que les huîtres ne tolèrent qu'un certain pourcentage de perte de chromosomes et qu'au-delà, les huîtres meurent, mais cette hypothèse peut difficilement être confirmée sur des huîtres vivantes. Il serait intéressant de réaliser un suivi dans le temps du taux d'aneuploïdie au sein d'une même huître pour connaître l'évolution de ce phénomène jusqu'à la mort de l'organisme. Malheureusement, cette expérience n'est pas réalisable car la technique employée pour étudier l'aneuploïdie est destructive.

Les conditions environnementales peuvent avoir une influence sur le taux d'aneuploïdie des huîtres *C. gigas*. En effet, des individus issus de la même famille, mis en élevage sur des sites différents ont présenté des taux d'aneuploïdie différents. De plus, sur un même site mais à des hauteurs d'eau différentes, des taux d'aneuploïdie différents ont été observés. Il serait intéressant de connaître les teneurs en divers produits chimiques dans l'eau au moment des prélèvements mais aussi les ressources nutritives. A une faible hauteur d'eau, les huîtres semblent subir un stress supplémentaire pouvant provoquer l'apparition de plus fortes mortalités. A cette faible hauteur d'eau, les huîtres ont présenté un plus fort taux d'aneuploïdie que des huîtres placées à une hauteur d'eau plus élevée sur le même site.

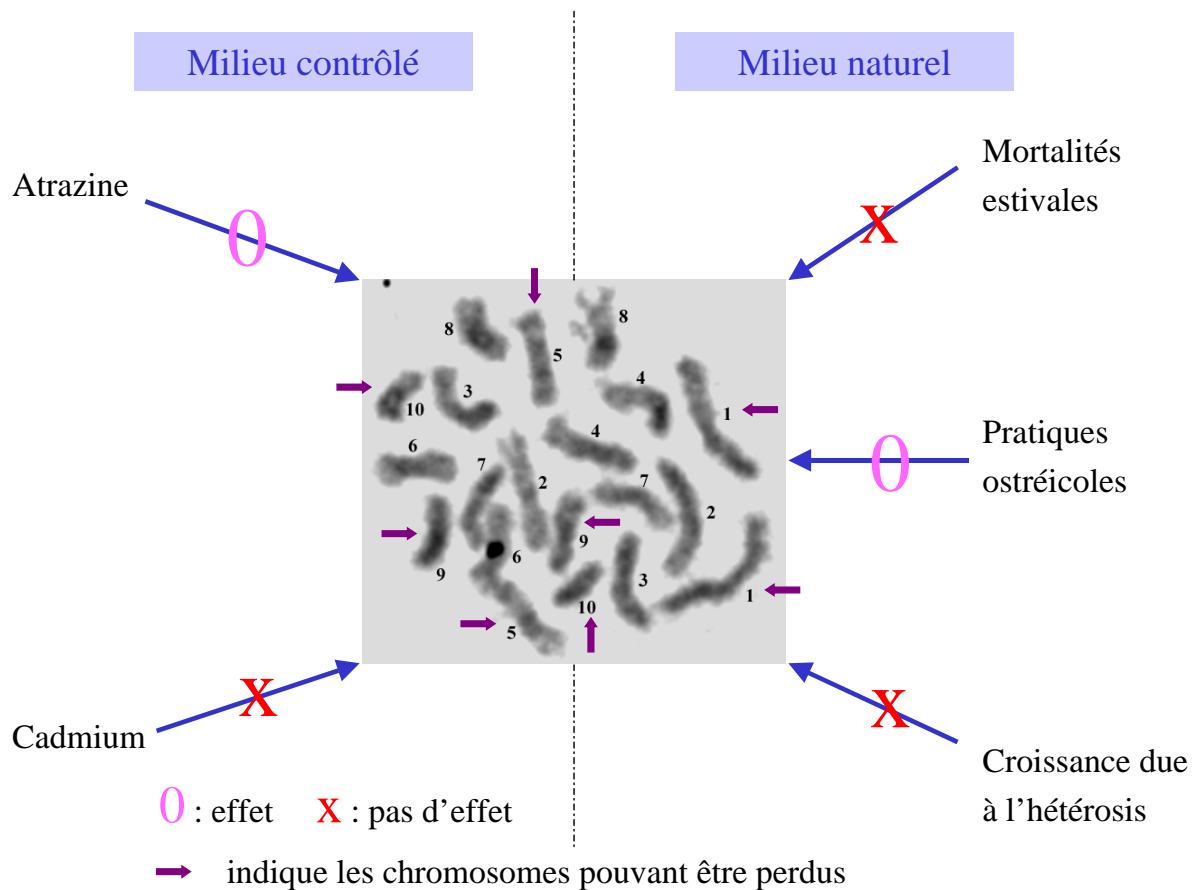
Nous avons également montré que le taux d'aneuploïdie des huîtres d'une même population évoluait au cours du temps sur un même site. En effet, des huîtres *C. gigas* sauvages prélevées sur la vasière de Brouage au cours d'une période d'un an ont montré des

taux d'aneuploïdie différents. Ces fluctuations dans le temps pourraient être dues à des facteurs environnementaux différents selon la saison. Par exemple, les polluants chimiques sont en quantité plus ou moins importante selon les précipitations et les périodes d'épandage ; ils pourraient donc agir sur le génome des huîtres selon leurs propriétés clastogènes et aneugènes. Les teneurs en polluants au sein des organismes sont aussi différentes selon la saison. Il serait intéressant de quantifier la teneur en différents métaux lourds (autres que le cadmium) et pesticides au sein des organismes pour établir ou non une relation avec les taux d'aneuploïdie observés.

Aucune relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie n'a pu être établie au cours de cette étude. Toutefois, l'hétérosis sur la croissance n'a pas été observée pour chaque lignée d'hybrides. Une nouvelle expérience avec des lignées d'hybrides présentant bien une supériorité au niveau de la croissance par rapport aux lignées consanguines serait intéressante à réaliser pour pouvoir vérifier s'il existe ou non une relation entre la croissance due à l'hétérosis et l'aneuploïdie.

La Figure 59 illustre une grande partie des résultats obtenus au cours de ce travail.

**Cette étude est la première à démontrer l'influence d'une pollution environnementale sur le taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *C. gigas*. L'impact potentiel de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître *C. gigas* peut être mis en relation avec un effet site et un effet saison.**



**Figure 59 :** Schéma résumant les effets de divers polluants en milieu contrôlé et de plusieurs expérimentations en milieu naturel sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.



## Références bibliographiques



*Larve d'huître Crassostrea gigas pédivéligère (Dégremont, 2003)*

*Echelle = 50  $\mu$ m*





---

## Références bibliographiques

- Abel, T. & Barlocher, F.**, 1988. Uptake of cadmium by *Gammarus fossarum* (Amphipoda) from food and water. *J. Appl. Ecol.* 25 (1): 223-231.
- Adler, Y.D.**, 1993. Synopsis of the *in vivo* results obtained with 10 known or suspected aneugens tested in the CEC Collaborative Study. *Mutat. Res.* 287: 131-137.
- 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.
- Ahmed, M. & Sparks, A.K.**, 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 138: 1-13.
- Allan, J.W., Liang, J.C., Carrano, A.V. & Preston, R.J.**, 1986. Review of literature on chemical-induced aneuploidy in male germ cells. *Mutat. Res.* 167: 123-137.
- Allran, J.F. & Karasov, W.H.**, 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2850-2855.
- Allran, J.F. & Karasov, W.H.**, 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae and adults of anuran amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 769-775.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B. & Métayer, C.**, 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper, and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 90: 425-431.
- Amiard, J.C., Métayer, C., Baud, J.P. & Ribeyre, F.**, 1994. Influence de facteurs écologiques et biologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques chez de jeunes huîtres (*Crassostrea gigas* Thunberg) au cours du prégrossissement en nourricerie. *Water Res.* 28 (1): 219-231.
- Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.C.**, 1980. *La Radioécologie des Milieux Aquatiques*. Masson (Eds), Paris.
- Amiard-Triquet, C., Métayer, C. & Amiard, J.C.**, 1980. Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaînes trophiques néritiques et estuariennes. II. Accumulation biologique chez les poissons planctonophages. *Water Res.* 14: 1327-1332.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B. & Martoja, R.**, 1991. Influence of salinity on trace metal (Cu, Zn, Ag) accumulation at the molecular, cellular and organism level in the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Biol. Metals* 4: 144-150.

- 
- Amiard-Triquet, C., Altmann, S., Amiard, J.C., Ballan-Dufrançais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Garrigues, P., His, E., Jeantet, A.Y., Menasria, R., Mora, P., Mouneyrac, C., Narbonne, J.F. & Pavillon, J.F., 1998.** Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* 373/374: 259-279.
- Ashanullah, M., Negilski, D.S. & Mobley, M.C., 1981.** Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Mar. Biol.* 64: 299-304.
- Au, D.W.T., Reunov, A.A. & Wu, R.S.S., 2001.** Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. *Environ. Pollut.* 111: 11-20.
- Auffret, M. & Oubella, R., 1997.** Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (3): 705-712.
- Barnabé, G., 1985.** Aquaculture Volume 1. Partie 2 – La culture des mollusques. Chap 1 – Reproduction contrôlée des mollusques bivalves. Lavoisier Tec & Doc (Eds), 521 p, pp 273-284.
- Bayne, B.L., Hedgecock, D., McGoldrick, D. & Rees, R., 1999.** Feeding behaviour and metabolic efficiency contribute to growth heterosis in Pacific oysters [*Crassostrea gigas* (Thunberg)]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 233: 115-130.
- Beaumont, A.R. & Gruffydd, T.T., 1974.** Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 54: 713-718.
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1991.** Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Mar. Biol.* 108 (1): 91-96.
- Bebianno, M.J. & Langston, W.J., 1992.** Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Phys. C* 103 (1): 79-85.
- Bignami, M., Morpurgo, G., Pagliani, R., Carere, A., Conti, G. & Di Giuseppe, G., 1974.** Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.* 26: 159-170.
- Biradar, D.P. & Rayburn, A.L., 1995.** Flow cytogenetic analysis of whole cell clastogenicity of herbicides found in groundwater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 13-17.
- Bond, D.J. & Chandley, A.C., 1983.** Aneuploidy. Oxford Univ. Press, Oxford.

- 
- Bourner, R.D.P., Parry, E.M. & Parry, J.M.**, 1998. Chemically induced aneuploidy: investigations into chromosome specific effects in mitosis. *Mutat. Res.* 404: 191-197.
- Boutier, B.**, 1984. Recherche de la contamination en cadmium de la Gironde. Rapport ISTPM. Contrat d'étude n° 83-213. 25 p + annexes.
- Boutier, B. & Chiffolleau, J.F.**, 1986. La contamination par le cadmium en Gironde et son extension sur le plateau continental. Rapport IFREMER n° DERO-86.12-MR. 28 p.
- Boutier, B., Chiffolleau, J.F., Jouanneau, J.M., Latouche, C. & Philipps, I.**, 1989. La contamination de la Gironde par le Cadmium ; origine, extension, importance. Rapports Scientifiques et Techniques de l'Ifremer n° 14. 105 p.
- Boutier, B., Chiffolleau, J.F., Gonzalez, J.L., Lazure, P., Auger, D. & Truquet, I.**, 2000. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanol. Acta* 23 (7): 745-757.
- Boyden, C.R. & Phillips, D.J.H.**, 1981. Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 29-40.
- Brockway, D.L., Smith, P.D. & Stancil, F.E.**, 1984. Fate and effects of atrazine in small aquatic microcosms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 345-353.
- Brown, B.E.**, 1982. The form and function of metal containing "granules" in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57: 621-667.
- Brusick, D.J.**, 1994. An assessment of the genetic toxicity of atrazine: relevance to human health and environmental effects. *Mutat. Res.* 317: 133-144.
- Bryan, G.W.**, 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L.) and *Chlamys opercularis* (L.). *J. Mar. Biol. Ass. UK* 53: 145-166.
- Calabrese, A., Collier, R.S., Nelson, D.A. & MacInnes, J.R.**, 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18: 162-166.
- Chan, K.W., Cheung, R.Y.H., Leung, S.F. & Wong, M.H.**, 1999. Depuration of metals from soft tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted from a contaminated site to clean sites. *Environ. Pollut.* 105: 299-310.
- Cheng, T.C. & Sullivan, J.T.**, 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.* 14: 305-315.

- 
- Chiffoleau, J.F., Cossa, D., Auger, D. & Truquet, I.**, 1994. Trace metal distribution , partition and fluxes in the Seine Estuary (France) in low discharge regime. *Mar. Chem.* 47: 145-158.
- Chiffoleau, J.F., Gonzalez, J.L., Miramand, P. & Thouvenin, B.**, 1999. Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme scientifique Seine-Aval 10 : 31 p.
- Cieplinski, W., Reardon, P. & Testa, M.A.**, 1983. Non-random human chromosome distribution in human-mouse myeloma somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* 35: 93-99.
- Coirault, S.**, 1999. Etude de configuration d'un réseau régional de surveillance de la qualité des eaux vis-à-vis des produits phytosanitaires. Tome I. Rapport d'étude.
- Collet, M.**, 1988. Evaluation des transferts existants ou potentiels de produits phytosanitaires utilisés en agriculture vers le milieu marin. Rapport IFREMER, DERO-88-04-EL, 30 p + annexes.
- Comité National Conchyliculture (CNC)**, 2004. L'officiel de la conchyliculture 60. <http://www.cnc-france.com/actualite/officiel60.pdf>.
- Comps, M.**, 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier : 128 p.
- Comps, M. & Duthoit, J.L.**, 1976. Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C. R. Acad. Sc. Paris* 283 : 1595-1597.
- Coogan, T., Bare, R. & Waalkes, M.**, 1992. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 227-233.
- Cossa, D., Bourget, E. & Piuze, J.**, 1979. Sexual maturation as a source of variation in the relationship between cadmium concentration and body weight of *Mytilus edulis* L.. *Mar. Pollut. Bull.* 10: 174-176.
- Cossa, D. & Lassus, P.**, 1989. Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et Ecotoxicologie. Rapports Scientifiques et Techniques de l'Ifremer n° 16 : 111 p.
- Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.C.**, 1991. Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxication protein for MTs a Language abuse? *Water Air Soil Poll.* 57-58: 555-567.

- 
- Cross, I. & Rebordinos, L.**, 2003. Effect of marine contamination on the genetic population structure of the bivalve *Crassostrea angulata*. *Cienc. Mar.* 29 (2): 239-250.
- Dally, H. & Hartwig, A.**, 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18: 1021-1026.
- Danford, N.**, 1984. Measurement of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment. *Mutat. Res.* 139: 127-132.
- Danford, N.**, 1985. Test for chromosome aberration and aneuploidy in Chinese hamster fibroblast cell line CH1-L. *In: Progress in Mutation Research* (Ashby, J., De Serres, F.J., Draoer, M., Ishidate, Jr., M., Margolin, B.H., Matter, B.E. & Shelby, M.D., Eds) Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 397-411.
- Dearfield, K.L., Frank Stack, H., Quest, J.A., Whiting, R.J. & Waters, M.D.**, 1993. A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity: I. Introduction and first ten chemicals. *Mutat. Res.* 297: 197-233.
- De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. & Znacchi, P.**, 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat. Res.* 238: 90-172.
- Dégremont, L.**, 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'Université de Caen/Basse-Normandie : 334 p.
- De Noyelles, F., Kettle, W.D. & Sinn, D.E.**, 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology* 63 (5): 1285-1293.
- Diana, S.G., Resetarits, W.J. Jr., Schaeffer, D.J., Beckmen, K.B. & Beasley, V.R.**, 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2961-2967.
- Dixon, D.R.**, 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.* 3: 155-161.
- Dixon, D.R. & Wilson, J.T.**, 2000. Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* 420: 29-43.
- Dulout, F.N. & Olivero, O.A.**, 1984. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. *Environ. Mutagen.* 6: 299-310.
- Dulout, F.N. & Natarajan, A.T.**, 1987. A simple and reliable *in vitro* test system for the analysis of induced aneuploidy as well as other cytogenetic end-points using Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 3: 121-126.

- 
- Dulout, F.N., Grillo, C.A., Seoane, A.I., Maderna, C.R., Nilsson, R., Vather, M., Darroudi, F. & Natarajan, A.T.**, 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutat. Res.* 370: 151-158.
- Du Preez, H.H. & Van Vuren, J.H.J.**, 1992. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 101: 651-655.
- Eastmond, D. & Tucker, J.**, 1989. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 34-43.
- Eastmond, D. & Pinkel, D.**, 1990. Detection of aneuploidy inducing agents in human lymphocytes using *in situ* hybridization with chromosome specific DNA-probes. *Mutat. Res.* 234: 303-318.
- Eisler, R.**, 1989. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Contaminant Hazard Reviews Report 18. Biological Report 85. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC.
- Elbaz-Poulichet, F., Huang, W.W., Jednacak-Biscan, J., Martin, J.M. & Thomas, A.J.**, 1982. Trace metal behaviour in the Gironde Estuary. *Thalassia Jugoslavica* 18: 61-95.
- Elbaz-Poulichet, F., Martin, J.M., Huang, W.W. & Zhu, J.X.**, 1987. Dissolved cadmium behaviour in some selected French and Chinese estuaries. *Mar. Chem.* 22: 125-136.
- Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.C. & Chevolut, L.**, 2001. Determination of cadmium partitioning in microalgae and oysters: Contribution to the assessment of trophic transfer. *Arch. Environ. Con. Tox.* 40: 209-221.
- Farooqi, Z., Darroudi, F. & Natarajan, A.T.**, 1993. The use of fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 8: 329-334.
- Fletcher, J.S.**, 1990. Use of algae versus vascular plants to test for chemical toxicity. *In:* Wang, W., Gorsuch, J.W. & Lower, W.R. Eds. *Plants for Toxicity Assessment*. STP 1091. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 33-39.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, 2003. Aquaculture production: Quantities 1950-2001. Fishstat Plus.  
<http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp#Download>.
- Frazier, J.M.**, 1975. The dynamics of metals in the American oyster, *Crassostrea virginica*. I. Seasonal effects. *Chesapeake Sci.* 16: 162-171.

- 
- Frazier, J.M.**, 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environ. Health Persp.* 28: 75-79.
- Frazier, J.M.**, 1986. *Environ. Health Persp.* 65: 39.
- Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapègue, S. & Thomas-Guyon, H.**, 2003. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr. Pharm. Des.* 9: 193-199.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. & Renault, T.**, 2004. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immun.* 16: 501-512.
- Gajardo, G., Parraguez, M. & Colihueque, N.**, 2002. Karyotype analysis and chromosome banding of the Chilean-Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* 21: 585-590.
- Gamble, D.S., Khan, S.H.U. & Tee, Q.S.**, 1983. Atrazine hydrolysis. Part I. Proton catalysis at 25°C. *Pestic. Sci.* 14: 537-545.
- George, S.G.**, 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. *In: Heavy metals in the marine environment.* Furness, R.W. & Rainbow, P.S. Eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 123-142.
- Gillot, P., More, P., Amiard, J.C. & Bourget, G.**, 1989. Purification of metallothionein-like (protein) of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg induced experimentally by cadmium. *Océanis* 15 (4): 391-399.
- Giovanni, R.**, 1996. Situation de la dégradation de la qualité des eaux courantes en Bretagne : cas des nitrates et de deux pesticides, l'atrazine et le lindane. *Cybium* 20: 143-162.
- Grassé, P.**, 1960. *Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches.* Tome V. Masson et Cie Eds, Paris, 2219 p.
- Grelon, M.**, 1978. *Saintonge pays des huîtres vertes.* Rupella Eds, La Rochelle, France, 361 p.
- Griffiths, A.J.F.**, 1979. *Neurospora* prototroph selection system for studying aneuploid production. *Environ. Health Perspect.* 31: 75-80.
- Grizel, H. & Héral, M.**, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer* 47: 399-403.
- Güerci, A., Seoane, A. & Dulout, F.N.**, 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutat. Res.* 469: 35-40.

- 
- Gunkel, G. & Streit, B.**, 1980. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis* Müll.) and a fish (*Coregonus fera* Jurine). *Water Res.* 14: 1573-1584.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W.K. & Chew, K.K.**, 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.* 183: 381-386.
- Guo, X. & Allen, S.K. Jr.**, 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3 (1): 42-50.
- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Hogstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. & Sorsa, M.**, 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes - nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54: 2919-2922.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Ali Stuart, A. & Vonk, A.**, 2002a. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8): 5476-5480.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. & Vonk, A.**, 2002b. Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419: 895-896.
- Hedgecock, D., McGoldrick, D. & Bayne, B.L.**, 1995. Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture* 137: 285-298.
- Hedgecock, D., McGoldrick, D., Manahan, D.T., Vavra, J., Appelmans, N. & Bayne B.L.**, 1996. Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203: 49-59.
- Hedgecock, D. & Davis, J.P.**, 2000. Improving Pacific oyster broodstock through crossbreeding. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 614-615.
- His, E. & Robert, R.**, 1986. Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis* 15: 301-308.
- Howard, W., Leonard, B., Moody, W. & Kochlar, T.S.**, 1991. Induction of chromosome changes by metal compounds in cultured CHO cells. *Toxicol. Lett.* 56: 179-186.



- 
- Howe, G.E., Gillis, R. & Mowbray, R.C.**, 1998. Effects of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 519-525.
- Huber, N.**, 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1865-1881.
- Hutber, G.N., Rogers, L.J. & Smith, A.J.**, 1979. Influence of pesticides on the growth of cyanobacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.* 6: 397-402.
- IARC**, 1991. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides, Vol. 53, Lyon, France.
- Ieyama, H.**, 1990. Chromosomes of the oysters, *Hyotissa imbricata* and *Dendostrea folium* (Bivalvia: Pterimorphia). *Venus, Jap. J. Malac.* 49: 63-68.
- Ifremer**, 2001. Suivi des teneurs en cadmium et processus conditionnant la bioaccumulation en cadmium dans les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. Synthèse pour la réunion du CMNA de l'Agence de l'Eau Adour Garonne du 2 octobre 2001.
- Islam, M.S. & Tanaka, M.**, 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 624-649.
- Ivanova, E.P., Kurilenko, V.V., Kurilenko, A.V., Gorshkova, N.M., Shubien, F.N., Nicolau, D.V. & Chelomin, V.P.**, 2002. Tolerance to cadmium of free-living and associated with marine animals and eelgrass marine gamma-proteobacteria. *Curr. Microbiol.* 44: 357-362.
- Jeantet, A.Y., Ballan-Dufrançais, C. & Martin, J.L.**, 1985. Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusque Bivalve). II. Sites intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. *C. R. Acad. Sci., Paris, sér. III*, 301: 177-182.
- Jones, T.W., Kemp, W.M., Stevenson, J.C. & Means, J.C.**, 1982. Degradation of atrazine in estuarine water/sediment systems and soils. *J. Environ. Qual.* 11 (4): 632-638.
- Jouanneau, J.M., Boutier, B., Chiffolleau, J.F., Latouche, C. & Philipps, I.**, 1990. Cadmium in the Gironde fluvioestuarine system: behaviour and flow. *Sci. Total Environ.* 97/98: 465-479.

- 
- Kadoum, A.M. & Mock, D.E.**, 1978. Herbicide and insecticide residues in tailwater pits: Water and pit bottom soil from irrigated corn and sorghum fields. *J. Agric. Food Chem.* 26: 45-50.
- Kemp, W.M., Means, J.S., Jones, T.W. & Stevenson, J.C.**, 1985. Herbicides in Chesapeake Bay and their effects on submerged aquatic vegetation. *In: U.S. Environmental Protection Agency Chesapeake Bay Program Technical Studies: A synthesis*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, pp. 503-567.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. & Van Hummelen, P.**, 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.* 392: 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M. & Decordier, I.**, 2002. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 504: 137-148.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H. & Zucker, R.M.**, 2000. Cytogenetic studies of three triazine herbicides I. *In Vitro* studies. *Mutat. Res.* 465: 53-59.
- Knuesli, E., Berrer, D., Dupuis, G. & Esser, H.**, 1969. S-triazines. *In: Degradation of Herbicides* (Kearney, P.C. & Kaufman, D.D., Eds), Dekker, New York, pp. 51-78.
- Komaru, A. & Wada, K.T.**, 1994. Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese oysters (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids. *Aquaculture* 120: 61-70.
- Kosinski, R. & Merkle, M.G.**, 1984. The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities. *J. Environ. Qual.* 13: 75-82.
- Kraepiel, A.M.L., Chiffoleau, J.F., Martin, J.M. & Morel, F.M.M.**, 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde Estuary. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 61: 1421-1436.
- Lamouroux, M.M.**, 2001. Contribution à l'optimisation du rationnement de phytoplancton en élevage larvaire de *Crassostrea gigas*. Rapport de stage BTSA, option aquaculture, 1ère année, Lycée de la mer et du littoral, Bourcefranc : 10 p.
- Lampert, W., Fleckner, W., Pott, E., Schober, U. & Störkel, K.U.**, 1989. Herbicide effects on planktonic systems of different complexity. *Hydrobiologia* 188/189: 415-424.
- Legendre, P. & Legendre, L.**, 1998. Numerical ecology. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 853 p.

- 
- Lehotay, S.J., Harman-Fetcho, J.A. & McConnell, L.L.**, 1998. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake Bay tributaries. *Mar. Pollut. Bull.* 37 (1-2): 32-44.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193: 39-48.
- Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquat. Living Resour.* 14: 1-5.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genome* 44: 735-737.
- Leitão, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H. & Boudry, P.**, Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: Comparative karyological analysis within Ostreidae. *Genome*, sous presse.
- Leopardi, P., Zijno, A., Bassani, B. & Pachierotti, F.**, 1993. Chromosomes bearing amplified genes are a preferential target of chemicals inducing chromosome breakage and aneuploidy. *Mutat. Res.* 287: 119-130.
- Le Pennec, G. & Le Pennec, M.**, 2001. Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive *in vitro*. *Aquat. Toxicol.* 53: 1-7.
- Lewis, A.G. & Cave, W.R.**, 1982. The biological importance of copper in oceans and estuaries. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 20: 471-695.
- Li, X.X. & Havenhand, J.N.**, 1997. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Mar. Biol.* 127: 443-448.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Bernardino, D. & Ursini, M.V.**, 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ. Mol. Mutagen.* 32: 39-46.
- Longwell, A.C., Stiles, S.S. & Smith, D.G.**, 1967. Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. *Can. J. Gen. Cyt.* 9: 845-856.

- 
- Loprieno, N., Barale, R., Mariani, L., Presciuttini, S., Rossi, A.M., Sbrana, L. & Zaccaro, A.**, 1980. Results of mutagenicity tests on the herbicide atrazine. *Mutat. Res.* 74: 250.
- Lossli, R.**, 1994. Triazines. *Toxicology* 91: 59-62.
- Lynch, A. & Parry, J.**, 1993. The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay *in vitro*: Studies with 10 suspected aneugens. *Mutat. Res.* 287: 71-86.
- Mailhes, J.B., Preston, R.J. & Lavappa, K.S.**, 1986. Mammalian *in vivo* assays for aneuploidy in female germ cells. *Mutat. Res.* 167: 139-148.
- Majori, L., Nedoclan, G., Modonutti, G.B. & Daris, F.**, 1978. Study of the seasonal variations of some trace elements in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* taken in the Gulf of Trieste. *Rev. Int. Océanogr. Méd.* 39: 37-50.
- Marchand, M. & Kantin, R.**, 1997. Contaminants chimiques en milieux aquatiques, 3<sup>ème</sup> partie : Présentation de quelques exemples caractéristiques. *Océanis* 23 (4): 517-695.
- Martin, M., Osborn, K., Billig, P. & Glickstein, N.**, 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12 (9): 305-308.
- Martin, R.H. & Rademaker, A.**, 1990. The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet. Cell Genet.* 53: 103-107.
- Martínez-Expósito, M.J., Martínez-Lage, A.A., Pasantes, J.J. & Méndez, J.**, 1992. A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. *Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos* 6: 49-55.
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, A. & Méndez, J.**, 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249.
- Martoja, M. & Elkaïm, B.**, 1980. Bioaccumulation du cuivre chez *Littorina littorea* (L.) (Gastéropode Prosobranchie) : signification physiologique et écotoxicologique. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 43: 251-270.
- Marzin, D. & Phi, H.**, 1985. Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA 102. *Mutat. Res.* 155: 49-51.
- Maurer, D. & Comps, M.**, 1986. Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *In:*

- 
- Pathology in Marine Aquaculture*. Vivarès, C.P., Bonami, J.R. & Jaspers, E. (Eds), European Aquaculture Society, Special Publication N° 9, Bredene, Belgium, pp. 29-41.
- Means, J.C., Wijayarathne, R.D. & Boynton, W.R.**, 1983. Fate and transport of selected herbicides in an estuarine environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40 (2): 337-345.
- Métayer, C., Amiard, J.C. & Amiard-Triquet, C.**, 1982. Accumulation de quelques éléments traces métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn) chez la sole (*Solea solea*) et le flet (*Platichthys flesus*) : variations en fonction de l'âge et de l'organotropisme. *Rev. Int. Océanogr. Méd.* LXVI-LXVII: 33-45.
- Miramand, P., Pigeot, J., Guyot, T. & Fichet, D.**, 1999. Ecotoxicologie intégrée : de l'espèce à l'écosystème. *Océanis* 25 (4): 581-608.
- Miramand, P., Guyot, T., Pigeot, J., Bustamante, P., Caurant, F. & Ferchaud, R.**, 2000. Le cadmium dans les réseaux trophiques marins : de la source aux consommateurs. *Journal Européen d'Hydrologie* 31 (2): 127-143.
- Miramand, P., Pigeot, J., Budzinsky, H., Guyot, T., Bustamante, P., Huet, V. & Fichet, D.**, 2002. Etude des polluants métalliques (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn), des organochlorés (Lindane, PCB) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les organismes vivants sur une zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime). Contrat Agence de l'eau Adour-Garonne. Dossier n° : 290/98/0004 : 58 p.
- Moraga, D. & Tanguy, A.**, 2000. Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (3): 706-711.
- Moreland, D.E.**, 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31: 597-638.
- Morgan, M.K., Scheuerman, P.R., Bishop, C.S. & Pyles, R.A.**, 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using fetax. *J. Toxicol. Env. Health* 48: 151-168.
- Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B. & Zeiger, E.**, 1986. *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.* 8 (Suppl. 7): 1-119.
- Munaron, D.**, 2004. Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente : Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI : 340 p.
- Munaron, D., Scribe, P., Dubernet, J.F., Kantin, R., Vanhoutte, A., Fillon, A. & Bacher, C.**, 2003. Estimation of herbicide inputs in a sensitive area on the Atlantic coast:

- Marenes-Oléron bay (France). Proceedings of the XII Symposium Pesticide Chemistry: 717-726.
- Munaron, D., Scribe, P., Dubernet, J.F. & Stanisière, J.Y.**, 2004. Rapport d'avancement concernant les actions 1 et 8 (Action 1 : Recherche multirésidus et détermination des flux de produits phytosanitaires et Action 8 : Modélisation hydrodynamique des apports en herbicides au bassin de Marenes-Oléron). PEVS (Programme Environnement Vie et Sociétés) : 13 p.
- Muñoz, I. & Rosés, N.**, 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). Water Res. 34 (10): 2846-2848.
- Muñoz, I., Real, M., Guasch, H., Navarro, E. & Sabater, S.**, 2001. Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. Aquat. Toxicol. 55: 239-249.
- Munsch, C.**, 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI : 263 p.
- Murnik, M.R. & Nash, C.L.**, 1977. Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. J. Toxicol. Environ. Health 3: 691-697.
- Nassiri, Y., Ginsburger-Vogel, T., Mansot, J.L., Wery, J. & Rouillard, I.**, 1997. Etude par EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) des sites de stockage du cadmium et du cuivre chez *Crassostrea gigas* contaminée par voie alimentaire. Bull. Soc. Zool. Fr. 122 (2): 101-108.
- Natarajan, A.T.**, 1993. An overview of the results of testing of known or suspected aneugens using mammalian cells *in vitro*, Mutat. Res. 287: 113-118.
- Natarajan, A.T., Duivenvoorden, W.C.M., Meijers, M. & Zwanenburg, T.S.B.**, 1993. Induction of mitotic aneuploidy using Chinese hamster primary embryonic cells. Test results of 10 chemicals. Mutat. Res. 287: 47-56.
- Natarajan, A.T., Boei, J.J.W.A., Darroudi, F., Van Diemen, P.C.M., Dulout, F.N., Hande, M.P. & Ramalho, A.T.**, 1996. Current cytogenetic methods for detecting exposures and effects of mutagens and carcinogens. Environ. Health Perspect. 104 (Suppl. 3): 445-448.

- 
- Nichols, W.W., Moorehead, P. & Brewen, G.,** 1972. Chromosome methodologies in mutation testing. Report of the Ad-Hoc Committee on the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22: 269-275.
- Nolan, C.V. & Duke, E.J.,** 1983. Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: Involvement of metallothioneins and heavy-molecular weight protein. *Aquat. Toxicol.* 4: 153-163.
- Ochi, T., Mogi, M., Watanabe, M. & Oshawa, M.,** 1984. Induction of chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster ovary cells by short-term treatment with cadmium chloride. *Mutat. Res.* 137: 103-109.
- Osgood, C., Zimmering, S. & Mason, J.M.,** 1991. Aneuploidy in *Drosophila*, II. Further validation of the FIX and ZESTE genetic test systems employing female *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 259: 147-163.
- Parry, J.M.,** 1993. An evaluation of the use of *in vitro* tubulin polymerisation, fungal and wheat assay to detect the activity of potential chemicals: the European Community Aneuploidy Project. *Mutat. Res.* 287: 23-28.
- Parry, J. & Sors, A.,** 1993. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European community aneuploidy project. *Mutat. Res.* 287: 3-15.
- Pastorak, R.A., Anderson, J.K., Butcher, M.K. & Sexton, J.E.,** 1994. West coast marine species chronic protocol variability study. Final report by PTI Environmental Services, Bellevue, WA, for the Washington Department of Ecology, Olympia, WA.
- Pavicic, J., Balestreri, E., Lenzi, P., Raspor, B., Branica, M. & Felicioli, R.,** 1991. Isolation and partial characterization of cadmium-induced metallothionein-like proteins in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Chem.* 36 (1-4): 249-265.
- Pechenik, J.A., Berard, R., Daniels, D., Gleason, T.R. & Champlin, D.,** 2001. Influence of lowered salinity and elevated cadmium on the survival and metamorphosis of trochophores in *Capitella* sp.. *Invertebr. Biol.* 120 (2): 142-148.
- Pennec, J.P., Gallet, M., Gioux, M. & Dorange, G.,** 2002. Cell culture of bivalves: tool for the study of the effects of environmental stressors. *Cell. Mol. Biol.* 48 (4): 351-358.
- Pennington, P.L. & Scott, G.I.,** 2001. Toxicity of atrazine to the estuarine phytoplankter *Pavlova* sp. (Prymnesiophyceae): Increased sensitivity after long-term, low-level population exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (10): 2237-2242.

- 
- Phelps, H.L., Wright, D.A. & Mihursky, J.A.**, 1985. Factors affecting trace metal accumulation. *J. Shellfish Res.* 6 (2): 67-70.
- Phelps, H.L. & Hetzel, E.W.**, 1987. Oyster size, age, and copper and zinc accumulation. *J. Shellfish Res.* 6: 67-70.
- Phillips, D.J.H.**, 1976. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.* 38: 59-69.
- Phillips, D.J.H.**, 1990. Use of macroalgae and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and coastal waters. *In: Heavy metals in the marine environment.* Furness, R.W. & Rainbow, P.S. Eds, CRC Press, Boca Raton, pp. 81-99.
- Pigeot, J.**, 2001. Approche écosystémique de la contamination métallique du comportement biologique benthique des littoraux charentais : exemple du bassin de Marennes-Oléron. Thèse de doctorat de l'Université de La Rochelle : 305 p.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Gentile, G.J. & Gentile, J.M.**, 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136: 233-245.
- Plumley, F. & Davis, D.E.**, 1980. The effect of a photosynthesis inhibitor, atrazine, on salt marsh edaphic algae, in culture, microecosystems, and in the field. *Estuaries* 3: 217-223.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H. & Depledge, H.**, 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 321-324.
- Ramachandran, S., Patel, T.R. & Colbo, M.H.**, 1997. Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. *Ecotox. Environ. Safe.* 36: 183-188.
- Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N. & Marcos, R.**, 1998. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 416: 93-99.
- Ringwood, A.H. & Brouwer, M.**, 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Envir. Res.* 39: 101-105.
- Ritz, D.A., Swain, R. & Elliott, N.G.**, 1982. Use of the mussel *Mytilus edulis planatus* (Lamarck) in monitoring heavy metals in sea water. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 33: 491-506.



- 
- Robert, R. & His, E.**, 1985. Combined effects of salinity and cadmium chloride upon embryos and larvae of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. 15: 303-312.
- Robert, R., His, E. & Maurer, D.**, 1986. Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. Haliotis 15: 319-325.
- Roesijadi, G.**, 1994. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. Mar. Environ. Res. 38: 147-168.
- Roesijadi, G., Kielland, S. & Klerks, P.**, 1989. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. Arch. Biochem. Biophys. 273 (2): 403-413.
- Rosés, N., Poquet, M. & Muñoz, I.**, 1999. Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). J. Appl. Toxicol. 19: 351-356.
- Saplakoglu, U. & Iscan, M.**, 1998. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated *in vitro* with cadmium in G<sub>(0)</sub> and S phase of their cell cycles. Mutat. Res. 412: 109-114.
- Savage, J.R.K.**, 1993. Update on target theory as applied to chromosome aberrations. Environ. Mol. Mutagen. 22: 198-207.
- Scherrer, B.**, 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin, Montréal.
- Schiestl, R.H.**, 1989. Nonmutagenic carcinogens induce intrachromosomal recombination in yeast. Nature (London) 337: 285-288.
- Scribe, P., Dupas, S. & Dubernet, J.F.**, 1999. Apports des triazines et des phényl-urées aux eaux du littoral par la Charente et les canaux de Marennes-Oléron. L'Estuaire de la Seine, fonctionnement, perspectives, Rouen.
- Seoane, A.I. & Dulout, F.N.**, 1994. Use of the anaphase-telophase test to detect aneugenic compounds: effects of propionaldehyde and cadmium chloride. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53 (6): 924-929.
- Seoane, A.I. & Dulout, F.N.**, 2001. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. Mutat. Res. 490: 99-106.
- Seoane, A.I., Güerci, A.M. & Dulout, F.N.**, 2000. Mechanisms involved in the induction of aneuploidy: the significance of chromosome loss. Genet. Mol. Biol. 23 (4): 1077-1082.

- 
- Shelton, A.D. & Miller, M.C.**, 2002. Herbicide bioconcentration in *Cladophora glomerata*: atrazine removal in a eutrophic agricultural river. *Hydrobiologia* 469 (1-3): 157-164.
- Siewicki, T.C., Sydlowski, J.S. & Webb, E.S.**, 1983. The nature of cadmium binding in commercial Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 299-304.
- Simpson, R.D.**, 1979. Uptake and loss of zinc and lead by mussels (*Mytilus edulis*) and relationships with body weight and reproductive cycle. *Mar. Pollut. Bull.* 10: 74-78.
- Smith, A.E., Muir, D.C.G. & Grover, R.**, 1982. The triazine herbicides. *In: Analysis of pesticides in water*, Vol. III, Chau, A.S., Afghan, B.K., CRC Press, pp. 213-239.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.**, 1995. *Biometry*. Freeman, W.H. & Company, New York.
- Solbe, J.F. & Cooper, V.G.**, 1976. Studies on the toxicity of the copper sulphate to stone loach *Noemacheilus barbatulus* (L.) in hard water. *Water Res.* 10: 523-527.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, Jr., L.W. & Williams, W.M.**, 1996. Ecological risk assesment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1): 31-76.
- Strömngren, T.**, 1980. The effect of lead, cadmium, and mercury on the increase in length of five intertidal fucales. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 43: 107-119.
- Stallard, R., Haney, N.R., Frank, P.A., Styron, P. & Juberg, R.C.**, 1981. Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. *Cytogenet. Cell Genet.* 30: 50-53.
- Stebbing, A.R.D.**, 1982. Hormesis – The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 22: 213-234.
- Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M. & Chadwick, D.B.**, 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.* 399: 65-85.
- Stevens, J.T. & Summer, D.D.**, 1991. Herbicides. *In: Hayes, W.J., Jr., Laws, E.R., Jr. (Eds), Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, San Diego, USA, pp. 1317-1408.
- Stillman, W.S., Varella-Garcia, M., Gruntmeir, J.J. & Irons, R.D.**, 1997. The benzene metabolite, hydroquinone, induces dose-dependent hypoploidy in a human cell line. *Leukemia* 11: 1540-1545.
- Streit, B.**, 1979. Uptake, accumulation, and release of organic pesticides by benthic invertebrates. 3. Distribution of [<sup>14</sup>C]-atrazine and [<sup>14</sup>C]-lindane in an experimental 3-step food chain microcosm. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 55: 373-400.

- 
- Sunila, I. & Lindström, R.**, 1985. Survival, growth and shell deformities of copper- and cadmium-exposed mussels (*Mytilus edulis* L.) in brackish water. *Estuar. Coast. Shelf S.* 21: 555-565.
- Taets, C., Aref, S. & Rayburn, A.L.**, 1998. The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ. Health Perspect.* 106 (4): 197-201.
- Tavera Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D. & Marcogliesse, D.**, 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (3): 527-531.
- Taylor, D.**, 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotox. Environ. Safe.* 71: 33-42.
- Thiriot-Quévieux, C.**, 1984a. Les caryotypes de quelques Ostreidae et Mytilidae. *Malacologia* 25 (2): 465-475.
- Thiriot-Quévieux, C.**, 1984b. Analyse comparée des caryotypes d'Ostreidae (Bivalvia). *Cah. Biol. Mar.* 25: 407-418.
- Thiriot-Quévieux, C.**, 1986. Etude de l'aneuploidie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231.
- Thiriot-Quévieux, C.**, 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cah. Biol. Mar.* 43: 17-26.
- Thiriot-Quévieux, C. & Ayraud, N.**, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 70: 165-172.
- Thiriot-Quévieux, C., Noël, T., Bougrier, S. & Dallot, S.**, 1988. Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75: 89-96.
- Thiriot-Quévieux, C., Pogson, G.H. & Zouros, E.**, 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45.
- Thomas, S. & Durand, G.**, 1995. Suivi des pesticides dans la rade de Brest. *Ingénieries – EAT – Spécial Rade de Brest* : 95-101.
- Thompson, E. & Perry, P.**, 1988. The identification of micronucleated chromosomes; a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3: 415-418.
- Thornton, I.**, 1992. Sources and pathways of cadmium in the environment. *IARC Sci. Publ.* 118: 149-162.

- 
- Turner, A.**, 1996. Trace-metal partitioning in estuaries: importance of salinity and particle concentration. *Mar. Chem.* 54: 27-39.
- USEPA**, 1991. Environmental Fact Sheet, Atrazine Label Amendments, Washington, USA.
- Van Diemen, P.C.M., Maasdam, D., Vermeulen, S., Darroudi, F. & Natarajan, A.T.**, 1995. Influence of smoking habits on the frequencies of structural and numerical chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Mutagenesis* 10: 487-495.
- Verma, R.S.**, 1990. *The Genome*. VCH, New York.
- Viarengo, A. & Nott, J.A.**, 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 355-372.
- Viarengo, A., Canesi, L., Mazzucotelli, A. & Pontano, E.**, 1993. Cu, Zn and Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: role of metallothionein in heavy metal homeostasis and detoxication. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 95: 163-168.
- Vicente, N., Henry, M., Chabert, D. & Riva, A.**, 1988. Contrôle de métaux lourds dans les écosystèmes littoraux et dans les chaînes alimentaires marines : expériences de contamination par un élément métallique, le cadmium. *Océanis* 14 (1): 201-223.
- Vig, B.K. & Sandberg, A.A.**, 1987. *Aneuploidy: Part A. Incidence and Etiology*. Alan R. Liss, New York.
- Vocke, R.W., Sears, K.L., O'Toole, J.J. & Wildman, R.B.**, 1980. Growth responses of selected freshwater algae to trace elements and scrubber ash slurry generated by coal-fired power plants. *Water Res.* 14: 141-150.
- Wada, K.T., Scarpa, J. & Allen Jr., S.K.**, 1990. Karyotype of the dwarf surfclam *Mulinia lateralis* (Say, 1822) (Mactridae, Bivalvia). *J. Shellfish Res.* 9 (2): 279-281.
- Wade, T.L., Sericano, J.L., Gardinali, P.R., Wolff, G. & Chambers, L.**, 1998. NOAA's 'Mussel Watch' Project: Current use organic compounds in bivalves. *Mar. Pollut. Bull.* 37 (1-2): 20-26.
- Wallin, M. & Hartly-Asp, B.**, 1993. Effects of potential aneuploidy inducing agents on microtubule assembly *in vitro*. *Mutat. Res.* 287: 22-27.
- Wang, Z., Guo, X., Allen Jr., S.K. & Wang, R.**, 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. *Aquaculture* 173: 347-357.

- 
- Warr, T., Parry, E. & Parry, J.**, 1993. A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. *Mutat. Res.* 287: 29-46.
- Watanabe, T., Shimada, T. & Endo, A.**, 1979. Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes. *Mutat. Res.* 67: 349-356.
- Watanabe, T. & Endo, A.**, 1982. Chromosome analysis of preimplantation embryos after cadmium treatment of oocytes at meiosis I. *Environ. Mutagenesis* 4: 563-567.
- Watling, H.R.**, 1978. Effect of cadmium on larvae and spat of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Trans. roy. soc. South Africa* 43 (2): 125-134.
- Watling, M.**, 1982. Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 21: 2767.
- Wenger, S.L., Golden, W.L., Dennis, S.P., & Steele, M.W.**, 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Am. J. Med. Genet.* 19: 715-719.
- Wikfors, G.H. & Ukeles, R.**, 1982. Growth and adaptation of estuarine unicellular algae in media with excess copper, cadmium or zinc, and effects of metal-contaminated algal food on *Crassostrea virginica* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 7: 191-206.
- Wilkinson, L.**, 1990. SYSTAT: The system for statistics. SYSTAT, Inc., Evanston, IL, 676 p.
- Yang, H., Zhang, F. & Guo, X.**, 2000. Triploid and tetraploid Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. *Mar. Biotechnol.* 2: 466-475.
- Yoder, J., Watson, M. & Benson, W.W.**, 1973. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutat. Res.* 21: 335-340.
- Zarogian, G.E. & Cheer, S.**, 1976. Accumulation of cadmium by the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Nature* 261: 408.
- Zarogian, G.E. & Morrison, G.**, 1981. Effect of cadmium body burdens in adult *Crassostrea virginica* on fecundity and viability of larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 344-348.
- Zhang, L.P., Wang, Y.X., Shang, N. & Smith, M.T.**, 1998. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Res.* 22: 105-113.

- Zouros, E., Thiriot-Quiévreux, C. & Kotoulas, G.,** 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genet. Res.* 68: 109-116.
- Zwolsman, J.J.G., Van Eck, T.M. & Van Der Weijden, C.H.,** 1997. Biochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper, zinc) in the Sheldt estuary, southwestern Netherlands: Impact of seasonal variability. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 61: 1635-1652.

---

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Etudes de l'aneuploïdie réalisées chez divers mollusques.....	36
Tableau 2 : Facteurs de bioconcentration de l'atrazine chez divers organismes vivants.....	45
Tableau 3 : Résultats des analyses effectuées par Dominique Munaron (CEMAGREF de Bordeaux-Cestas). Concentrations des triazines exprimées en $\mu\text{g l}^{-1}$ . "-" : 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).....	81
Tableau 4 : Quantités d'atrazine diluée ajoutées à chaque jarre. ....	82
Tableau 5 : Pourcentage de perte de chromosomes dans des cellules en métaphase de <i>Crassostrea gigas</i> pour chaque paire perdue avec trois méthodes d'analyse de caryotypes (Marquage avec enzyme de restriction <i>Hae</i> III, pas de marquage et marquage avec bandes G). ....	105
Tableau 6 : Taux de mortalité (en %) des différentes familles à la nurserie de Bouin et sur le site de Perquis.....	136
Tableau 7 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre les grandes (G) et les petites (P) pour chaque point (Point 0 : P0, Point 1 : P1 et Point 2 : P2) et chaque site. ....	144
Tableau 8 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre chaque point pris deux à deux, pour chaque site, en fonction ou non de la taille. ....	144
Tableau 9 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre 2 ou 3 sites, pour chaque point, en fonction ou non de la taille. ....	145
Tableau 10 : Longueur de la coquille moyenne (en mm) et poids moyen (en g) des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> analysées et étudiées pour chaque lignée (lignées consanguines 6 x 6 et 16 x 16, lignées hybrides 6 x 16 et 16 x 6 de l'expérience 1, et lignées consanguines 35 x 35 et 51 x 51, lignées hybrides 51 x 35 et 35 x 51 de l'expérience 2). ....	154

---

## Liste des figures

Figure 1 : Caryotype de <i>Crassostrea gigas</i> ( $2n=20$ ) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. Echelle = 5 $\mu\text{m}$ . .....	29
Figure 2 : Anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (Barnabé, 1985).....	30
Figure 3 : Cycle de vie de l'huître creuse (Dégremont, 2003). (1) Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). (2) Embryon stade morula (2-3 heures). (3) Larves D (24 heures). (4) Larves véligères umbonées (14 jours). (5) Larve pédivéligère (18 jours). (6) Naissains post-fixation (1 mois). (7) Naissains (2 mois). (8) Naissains (6 mois). (9) Adulte (10 mois). (10) Géniteur mature (10 mois). <i>Nb : l'âge indiqué pour les photos 7 à 10 est représentatif d'huîtres élevées en nurserie et en claire ostréicole, mais pas pour des huîtres du milieu naturel.</i> .....	33
Figure 4 : Visualisation du panache d'atrazine (concentrations en $\text{ng l}^{-1}$ ) dans le bassin de Marennes-Oléron au 14 mai 2001 (étale de haute mer), d'après la simulation Mars2D du mois de mai 2001 (Munaron, 2004).....	43
Figure 5 : Visualisation du panache d'atrazine (concentrations en $\text{ng l}^{-1}$ ) dans le bassin de Marennes-Oléron au 15 mai 2001 (étale de basse mer), d'après la simulation Mars2D du mois de mai 2001 (Munaron, 2004).....	43
Figure 6 : Variations temporelles de la concentration en atrazine ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) dans le canal de Grand-Garçon (Munsch, 1995). .....	44
Figure 7 : Carte du bassin de Marennes-Oléron (Le Moine, LERPC La Tremblade, modifié). .....	51
Figure 8 : Huîtres prêtes à filtrer une solution de colchicine pendant la nuit. ....	64
Figure 9 : (A) Dissection des branchies. (B) Réalisation des micro-coupures. ....	64
Figure 10 : Exécution des préparations chromosomiques. (A) Libération des noyaux. (B) Etalement de la suspension cellulaire sur une lame microscopique préchauffée à $44^{\circ}\text{C}$ .....	65
Figure 11 : Métaphases aneuploïdes de <i>Crassostrea gigas</i> avec (A) $2n=19$ , (B) $2n=18$ et (C) $2n=17$ chromosomes. Echelle = 7 $\mu\text{m}$ . .....	66
Figure 12 : Gamètes mâles et femelles d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> . (A) Spermatozoïdes. (B) Ovocyte. Echelle = 10 $\mu\text{m}$ .....	67
Figure 13 : Salle d'élevage larvaire avec 12 lots. ....	68



---

Figure 14 : Larves D de 24 heures d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> . Echelle = 20 $\mu\text{m}$ . ....	68
Figure 15 : Salles de production du phytoplancton. (A) Ballons de 2 et 10 litres. (B) Cuves de 300 litres. ....	69
Figure 16 : Bacs contenant des larves de <i>Crassostrea gigas</i> placées en micronurserie sur des tamis de 150 $\mu\text{m}$ . ....	70
Figure 17 : Spectrophotomètre d'absorption atomique à la flamme. ....	70
Figure 18 : Lyophilisateur contenant nos pools de chair d'huîtres dans des boîtes de Pétri...	71
Figure 19 : Minéralisation de nos échantillons sur une plaque chauffante à 150°C. ....	72
Figure 20 : Huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> aux stades adulte et juvénile exposées à l'atrazine dans des bacs du conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade. ....	78
Figure 21 : Taux de mortalité des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes exposées à l'atrazine en fonction du lot : lot 1 (contrôle 0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 3 (100 $\mu\text{g l}^{-1}$ ). ....	83
Figure 22 : Taux d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes et juvéniles exposées à différentes concentrations d'atrazine : lots 1A, 1B (contrôle 0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B (100 $\mu\text{g l}^{-1}$ ). ....	84
Figure 23 : Taux d'éclosion des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées à différents traitements d'atrazine pendant leur développement larvaire : lot 1 (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 (0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 3 (0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 4 (1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 5 (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 6 (100 $\mu\text{g l}^{-1}$ ). ....	86
Figure 24 : Taille des larves (en $\mu\text{m}$ ) d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées à différents traitements d'atrazine pendant leur développement larvaire en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot. ....	86
Figure 25 : Taux d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> juvéniles exposées à l'atrazine pendant le stade larvaire (3 semaines) puis replacées dans des conditions non polluées (6 mois) : lots 1A, 1B (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B (0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 3A, 3B (0,4 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 4A, 4B (1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 5A, 5B (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 6A, 6B (100 $\mu\text{g l}^{-1}$ ). ....	87
Figure 26 : Diagramme résumant différentes expériences : (1) Descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine. (2) Huîtres juvéniles exposées à l'atrazine puis transférées dans des conditions non polluées. (3) Huîtres adultes exposées à l'atrazine puis transférées dans des conditions non polluées. ....	91
Figure 27 : Taux d'éclosion de la descendance d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées à différents traitements d'atrazine : lot 1 (0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ), lot 2 (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et lot 3 (100 $\mu\text{g l}^{-1}$ ). ....	93

- Figure 28 : Taille des larves (en  $\mu\text{m}$ ) descendantes d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à de l'atrazine en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot. .... 94
- Figure 29 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* exposées à l'atrazine (parents) et de leurs descendants en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). .... 95
- Figure 30 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). .... 96
- Figure 31 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). .... 98
- Figure 32 : Caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III chez des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées indirectement par l'atrazine. (A) Perte d'un chromosome dans la paire 9. (B) Perte de deux chromosomes dans les paires 1 et 10. Echelle =  $5 \mu\text{m}$ . .... 103
- Figure 33 : Fréquence de chromosomes manquants dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III réalisés à partir de la descendance d'huîtres exposées à l'atrazine. .... 104
- Figure 34 : Huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium dans des aquariums. .... 112
- Figure 35 : Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au cadmium en fonction du lot : lot 1 (contrôle  $0 \text{ng l}^{-1}$ ), lot 2 ( $50 \text{ng l}^{-1}$ ) et lot 3 ( $500 \text{ng l}^{-1}$ ). .... 114
- Figure 36 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au cadmium pendant deux mois (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en  $\text{ng l}^{-1}$ ). .... 115
- Figure 37 : Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle  $0 \text{ng l}^{-1}$ ), lots 2A, 2B ( $50 \text{ng l}^{-1}$ ) et lots 3A, 3B ( $500 \text{ng l}^{-1}$ ). .... 116
- Figure 38 : Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium en fonction du lot : lot 1 (contrôle  $0 \text{ng l}^{-1}$ ), lot 2 ( $50 \text{ng l}^{-1}$ ) et lot 3 ( $500 \text{ng l}^{-1}$ ). .... 117
- Figure 39 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en  $\text{ng l}^{-1}$ ). .... 118

Figure 40 : Taux d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> juvéniles exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l <sup>-1</sup> ), lots 2A, 2B (50 ng l <sup>-1</sup> ) et lots 3A, 3B (500 ng l <sup>-1</sup> ). .....	119
Figure 41 : Comparaison entre le taux d'aneuploïdie d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes et juvéniles exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l <sup>-1</sup> ), lots 2A, 2B (50 ng l <sup>-1</sup> ) et lots 3A, 3B (500 ng l <sup>-1</sup> ). .....	120
Figure 42 : Taux d'éclosion de la descendance d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées à différentes concentrations de cadmium : lot 1 (0 ng l <sup>-1</sup> ), lot 2 (50 ng l <sup>-1</sup> ) et lot 3 (500 ng l <sup>-1</sup> ). .....	125
Figure 43 : Taille des larves (en µm) descendantes d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées au cadmium en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot. ....	126
Figure 44 : Teneur en cadmium dans les huîtres <i>Crassostrea gigas</i> descendantes d'huîtres exposées au cadmium pendant deux mois (en µg g <sup>-1</sup> de poids sec) en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau (en ng l <sup>-1</sup> ). .....	127
Figure 45 : Taux d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> descendantes d'huîtres exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l <sup>-1</sup> ), lots 2A, 2B (50 ng l <sup>-1</sup> ) et lots 3A, 3B (500 ng l <sup>-1</sup> ). .....	128
Figure 46 : Comparaison entre le taux d'aneuploïdie d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées pendant deux mois au cadmium et leurs descendances en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l <sup>-1</sup> ), lots 2A, 2B (50 ng l <sup>-1</sup> ) et lots 3A, 3B (500 ng l <sup>-1</sup> ). .....	129
Figure 47 : Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres issues de familles « résistantes » ou « sensibles » selon le site. ....	137
Figure 48 : Poches d'huîtres posées sur des tables ostréicoles à différents niveaux par rapport au sédiment sur le site atelier de Perquis. (A) 15 cm du fond (Perquis 15), (B) 70 cm du fond (Perquis 70). .....	140
Figure 49 : Diagramme résumant les différents points de prélèvement pour le projet DYNAMO. ....	140
Figure 50 : Taux de mortalité (en %) des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> en fonction du site et entre chaque point. ....	142
Figure 51 : Poids total (en g) des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> en fonction du point dans le temps et du site. ....	142
Figure 52 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> pour chaque site en fonction du point dans le temps et de leur taille. ....	143

---

Figure 53 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> pour chaque site en fonction du point dans le temps.....	144
Figure 54 : Diagramme représentant les différents points de prélèvement sur la vasière de Brouage selon la saison.....	147
Figure 55 : Teneur en cadmium dans les huîtres <i>Crassostrea gigas</i> (en $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec) à différents points de prélèvement sur la vasière de Brouage.....	149
Figure 56 : Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> de la vasière de Brouage à différents points de prélèvement. ....	150
Figure 57 : Pourcentages d'aneuploïdie des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> consanguines et hybrides des deux expériences. ....	155
Figure 58 : Huîtres <i>Crassostrea gigas</i> issues des lignées consanguines 51 x 51 et 35 x 35 et des lignées hybrides 35 x 51 et 51 x 35 de l'expérience 2. Echelle = 17 mm.....	156
Figure 59 : Schéma résumant les effets de divers polluants en milieu contrôlé et de plusieurs expérimentations en milieu naturel sur l'intégrité du génome de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . ....	165

---

## Liste des annexes

- Annexe 1 : Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H. & Lapègue, S., **2003**. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Environmental Toxicology and Chemistry** 22 (1): 229-233..... 201
- Annexe 2 : Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A. & Lapègue, S., **2004**. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology** 145 (4): 699-705..... 209
- Annexe 3: Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Boudry, P. & Lapègue, S., Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. **Genome**, sous presse..... 219
- Annexe 4 : Analyses de pesticides au niveau de l'eau interstitielle des sédiments sur la vasière de Brouage. Point 2 de la radiale du PEVS (3 premiers points) et Exutoire du chenal de Montportail (amont de la radiale PEVS) (3 derniers). nd : non détecté. Concentrations en  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Données du CEMAGREF de Bordeaux-Cestas..... 235



# Annexes



*Tables ostréicoles sur le site de Ronce-Perquis à marée basse*





**Annexes**

**Annexe 1 :**

**Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters,  
*Crassostrea gigas***

**Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H. & Lapègue, S.**

**Article publié en 2003 dans :**

***Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (1): 229-233**





## IMPACT OF ATRAZINE ON ANEUPLOIDY IN PACIFIC OYSTERS, *CRASSOSTREA GIGAS*

KARINE BOUILLY, ALEXANDRA LEITÃO, HELEN MCCOMBIE, and SYLVIE LAPÈGUE\*  
IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France

(Received 1 April 2002; Accepted 11 July 2002)

**Abstract**—Aneuploidy has previously been described and studied in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and has been shown to be negatively correlated with growth. The present study investigated the effect of atrazine on the level of aneuploidy in this species. *Crassostrea gigas* adults and juveniles were subjected to different concentrations of atrazine representing a peak value found in a polluted environment (46.5 nM) and a value 10 times higher (465 nM). Although atrazine did not show any effect on the oyster mortality, significant differences in aneuploidy level were observed between the different treatments (9% for the control, 16% for 46.5 nM and 20% for 465 nM atrazine). Moreover, the same levels of aneuploidy were observed at adult and juvenile stages. This is the first reported evidence for an environmental effect on aneuploidy in *C. gigas*. These results will be useful for the oyster aquaculture industry and management of resources. The lowest atrazine level in the current study represents realistic potential exposure, and the results suggest that studies should be made on other aquatic species at risk of exposure to atrazine in the wild. This widely used compound may be an important factor causing damage to genetic material.

**Keywords**—Aneuploidy    Atrazine    Pacific oysters    *Crassostrea gigas*    Environmental factor

### INTRODUCTION

Cytogenetic abnormalities, such as aneuploidy, are known to be common in bivalve populations [1–6]. This phenomenon, which originates mainly from the nondisjunction of chromosomes during mitosis or meiosis [7,8], is often lethal in higher animals, such as mammals, or is associated with growth retardation [9]. In oysters, aneuploidy is observed as the alteration of the normal diploid chromosome number ( $2n = 20$ ) in hypodiploid cells with  $2n = 19, 18,$  or  $17$  [10]. A negative correlation between somatic aneuploidy and growth rate has been described in progenies from crosses of cultivated oysters [10–12] and in natural populations of the same species [13]. Moreover, the hypothesis of a genetic basis for the control of the level of aneuploidy in *Crassostrea gigas* was suggested because significant differences in aneuploidy were observed among different families with the same age and weight, bred in the same conditions [14]. Furthermore, a differential chromosomal susceptibility was observed in aneuploid situations [15]. However, the influence of environmental factors (such as pollutants) on the level of aneuploidy of bivalves is poorly documented. In mussels, Dixon [2] showed that the level of aneuploidy was higher in *Mytilus edulis* embryos descended from parents originating from a polluted dock (King's Dock, Swansea, South Wales, UK) containing organic contaminants (hydrocarbons and polycyclic compounds) and heavy metals. Moreover, deep-sea hydrothermal vent emissions contain high levels of toxic substances (heavy metals, arsenic, radon, and other radionuclide substances) that have the potential to damage DNA in mussels [16]. Additionally, Steinert et al. [17] showed that the frequency of cells with damaged DNA was higher in *Mytilus galloprovincialis* with greater exposure to contaminants (organic pollutants and heavy metals). However, effects such as these have not yet been investigated in oysters.

In recent years, the production and utilization of pesticides have strongly increased because of the intensification of agriculture. In France, pesticides are used on 90% of crops [18] to improve yields, particularly that of maize. Nevertheless, the use of synthetic substances, such as the pesticides, can pose problems for public health and can damage natural ecosystems. These products and, in particular, atrazine (a herbicide of triazine family) are likely to be transported to the aquatic environment by leaching and soil erosion. Their level depends on the frequency and intensity of rainfall as well as the treatment periods. However, we know that these pesticides are both mobile and persistent because they have been detected outside the areas and times of year of application [19].

Even if they are highly diluted in the aquatic environment, triazines can induce lethal or sublethal effects on aquatic organisms. An acute exposure to 97.65 nM of atrazine impeded the sexual differentiation of *Xenopus laevis* tadpoles [20]. Moreover, Hayes et al. [21] found that atrazine ( $\geq 465$  nM) induced hermaphroditism and demasculinized the larvae of exposed *X. laevis* males ( $\geq 4650$  nM). Rosés et al. [22] found significant changes in behavior and kidney cell lysis of the grazing gastropod species *Physa acuta* and *Ancylus fluviatilis* with atrazine treatment. In digestive acini of the bivalve *Pecten maximus*, atrazine at  $10^{-4}$  M was cytotoxic, and atrazine at  $10^{-5}$  M showed a tendency toward genotoxicity [23]. In *C. gigas*, exposure to atrazine at a peak environmental concentration over a short period resulted in moderate changes in hemocyte aggregation [24]. Atrazine also directly harmed the growth and development of young *C. gigas* larvae and indirectly affected veligers by curbing the growth of nanoplankton [25]. Moreover, Moraga and Tanguy [26] observed a mortality rate of approximately 60 to 70% on *C. gigas* adults at atrazine concentrations of 465 and 930 nM after two months of exposure. In other species of bivalves, pollution has been observed to have effects on the genetic material, visible at the level of chromosome structure or number (aneuploidy). For

\* To whom correspondence may be addressed  
(slapegue@ifremer.fr).

instance, a higher aneuploidy level has previously been observed in embryos descended from mussels exposed to environmental pollution [2] and in trout exposed to five different organic pollutants [27]. In this paper, we investigate whether atrazine has any effect on chromosome number (aneuploidy) in the Pacific oyster at different stages of development (adult and juvenile) in a controlled environment.

## MATERIAL AND METHODS

### Biological material

Three-year-old Pacific oysters, *C. gigas*, were purchased from a shellfish farm located in Marennes-Oléron Bay (La Tremblade, Charente-Maritime, France) on the French Atlantic coast in February 2001. Juveniles were bred and raised at the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) hatchery (La Tremblade, France). They were obtained by crossing six males with 24 females originating from the Seudre River (Charente-Maritime, France) at the beginning of February 2001.

### Atrazine exposure

Oysters were exposed to atrazine diluted in seawater directly pumped from Marennes-Oléron Bay. The atrazine was supplied by the Institut National de la Recherche Agronomique (Saint-Laurent-de-la-Prée, Charente-Maritime, France) at the concentration of 2.325 M. Pure seawater was used as a control (treatment 1). The atrazine treatments applied represent one peak value found in a polluted environment (46.5 nM; treatment 2) [19] and a value 10 times higher (465 nM; treatment 3). For each concentration and the control, two replicates were made (A and B). Each batch contained 75 adult oysters (~70-mm shell length) and about 100 juveniles (~5-mm shell length). Oysters were acclimated for 6 d in raceways (containers of circulating seawater measuring  $1.65 \times 0.50 \times 0.30$  m). The experiment was then conducted over two months for the adults and three and a half months for the juveniles (to obtain the size of 30–40 mm) in closed-circuit raceways with a system of water circulation for oxygenation. Each raceway contained 157 L of seawater, with or without atrazine, which was changed every day and maintained at  $19.5 \pm 1^\circ\text{C}$ . A volume of 157 ml of atrazine at 46.5  $\mu\text{M}$  for treatment 2 and 465  $\mu\text{M}$  for treatment 3 diluted in 5 L of seawater was added to the corresponding raceways each time the water was changed. Oysters were fed daily with 8 L of *Isochrysis galbana* ( $6.10^6$  cells/ml) and 3.5 L of *Tetraselmis suecica* ( $1.5.10^6$  cells/ml) for each raceway.

Water samples were collected for analysis (Institut de Recherche pour l'Ingénierie de l'agriculture et de l'environnement, Bordeaux, France) throughout the treatment period to verify the atrazine concentrations in the different raceways including the control. For each raceway, pH and conductivity (salinity) were measured on a homogenized 1-L sample. High-performance liquid chromatography analyses were then performed. The detection of compounds was carried out at 220 nm. The first sampling was performed just after the addition of atrazine to the raceways for the first time. Concentrations were in agreement with those expected. A second sampling was performed 24 h after the addition of atrazine in the raceways, just before the replacement of the water. At this point, the atrazine concentrations had decreased by about 20%, and new degradation products, such as simazine, désopropylatrazine, and dééthylatrazine, had appeared in low concen-

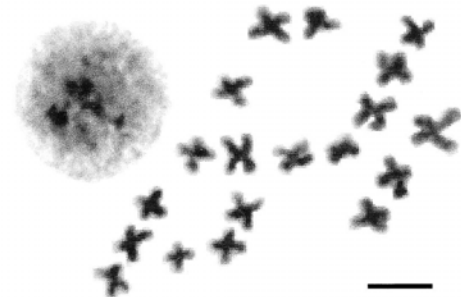


Fig. 1. Metaphase cell of *Crassostrea gigas* with  $2n = 19$  chromosomes. Scale = 5  $\mu\text{m}$ .

trations. Sampling was then repeated every 2 d with a water sample taken at the same point, 24 h after the addition of the atrazine, with levels showing a similar pattern of degradation.

### Aneuploidy scoring

Samples of 10 animals per treatment were incubated for 7 to 8 h in seawater containing 0.005% colchicine. The gills were then dissected in seawater, treated for 40 min in 0.9% sodium citrate, and fixed in a freshly prepared mixture of absolute alcohol/acetic acid (3:1) with two 10-min changes and then two 20-min changes. Slides were made from one individual gill, following the air-drying technique of Thiriot-Quévroux and Ayraud [28]. The preparation was stained for 10 min with Giemsa (4%, pH 6.8). Chromosome counts were made directly by microscope observation (Olympus BH2 microscope, Tokyo, Japan) on apparently intact and well-spread metaphase cells. We considered as aneuploid the cells with  $2n = 19$  (Fig. 1), 18, or 17 chromosomes. The level of aneuploidy was estimated by counting 30 randomly chosen, similarly well-spread metaphase cells per individual. This is the minimal statistical number usually accepted in cytogenetic studies [29,30]. The mean percentage of aneuploidy was calculated for each batch of 10 animals.

### Data analyses

Since the number of metaphase cells evaluated per individual was the same in all the studied material (30/individual), it was possible to test the replicate effect using a nested two-way analysis of variance (atrazine concentration and replicate effect). The oyster mortality was analyzed with a *G* test [31,32] and a Student's *t* test. The results between adults and juveniles were also compared using a three-way analysis of variance (development stage [adult or juvenile], atrazine concentration, and replicate effect). Statistical analyses of variance were computed using Systat® 9.0 by SPSS [33].

## RESULTS

A low mortality rate was recorded in the different experimental groups exposed to atrazine. The levels for treatments 1 (control), 2 (46.5 nM), and 3 (465 nM) were 11.3, 6.7, and 5.3%, respectively, at the adult stage. The *G* test ( $G = 3.74$ ) and Student's test ( $t = 1.93$ ) showed that the difference between the three treatments was not significant. So we can consider that in our experiment atrazine did not induce any differential mortality at the two concentrations tested.

The percentages of aneuploid cells for each treatment are presented in Table 1. Aneuploidy is a phenomenon frequently observed in natural oyster populations at a low level. The

Table 1. Observed aneuploidy of adult and juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed to different atrazine treatments: treatments 1A, 1B (control 0 nM), treatments 2A, 2B (46.5 nM), and treatments 3A, 3B (465 nM). Thirty metaphase cells per animal and 10 individuals per treatment were studied. Standard error of the mean is indicated in parentheses

Developmental stage (n = 10)	Treatment no.	Total cells observed				Mean aneuploidy (%)
		2n = 20	2n = 19	2n = 18	2n = 17	
Adult	1A	279	11	6	4	7 (0.78)
Juvenile	1A	269	20	7	4	10.3 (1.53)
Adult	1B	270	14	11	5	10 (1.86)
Juvenile	1B	271	20	9	0	9.7 (0.92)
Adult	2A	246	29	16	9	18 (3.19)
Juvenile	2A	257	32	8	3	14.3 (1.49)
Adult	2B	256	25	7	12	14.7 (2.18)
Juvenile	2B	252	28	11	9	16 (1.71)
Adult	3A	237	34	18	11	21 (4.56)
Juvenile	3A	224	40	21	15	25.3 (1.74)
Adult	3B	242	31	16	11	19.3 (2.27)
Juvenile	3B	227	38	25	10	24.3 (2.86)

levels for treatments 1 (control), 2 (46.5 nM), and 3 (465 nM) ranged from 7 to 10%, 14.7 to 18%, and 19.3 to 21%, respectively, at the adult stage and from 9.7 to 10.3%, 14.3 to 16%, and 24.3 to 25.3%, respectively, at the juvenile stage. The statistical analysis showed that aneuploidy level was not significantly different between the replicates ( $F = 0.089$ ,  $p = 0.766$ , for the adults;  $F = 0.000$ ,  $p = 1.000$ , for the juveniles). However, it was significantly different between the three treatments studied ( $F = 9.458$ ,  $p < 0.001$ , for the adults;  $F = 34.878$ ,  $p < 0.001$ , for the juveniles). Moreover, the aneuploidy level was significantly different between the two doses of atrazine ( $F = 12.462$ ,  $p < 0.001$ ). This result suggests a dose-response effect in the induction of aneuploidy in the oysters. When comparing aneuploidy between adult and juvenile oysters (Fig. 2), statistical analysis revealed no significant differences ( $F = 1.554$ ,  $p = 0.215$ ).

#### DISCUSSION

The causes of the aneuploidy are still unclear. Nevertheless, in humans and plants, genetic factors have been shown to be involved in the origin of aneuploidy [7,34]. The hypothesis of the existence of a genetic basis for the control of the level of aneuploidy in *C. gigas* has previously been suggested [14]. However, the effect of the environment on the level of aneuploidy in *C. gigas* remained to be investigated. Our study

represents the first reported evidence of an environmental factor influencing aneuploidy in oysters.

The toxic effect of atrazine on mammalian chromosomes has been investigated. In certain studies on human lymphocyte cultures, atrazine did not produce any significant increases in sister chromatid exchanges or chromosome aberrations below 69.75  $\mu\text{M}$  [35] and 465  $\mu\text{M}$ , respectively [36]. However, a large increase in chromosome aberrations and a small increase in sister chromatid exchanges were found in cultured human lymphocytes exposed to atrazine at concentrations in the range of 8.5 to 51  $\mu\text{M}$  [37], although the method of exposure was not exactly the same, and statistical analysis also differed. Furthermore, atrazine has clastogenic potential in Chinese hamster ovary cells at concentrations deemed safe by the U.S. Environmental Protection Agency for drinking water [38] and at the highest contamination level found in Illinois (USA) water supplies [39]. In our study, we saw a dose-dependent effect of atrazine on the aneuploidy level in the *C. gigas* adults and juveniles. Based on our data, a positive correlation between atrazine and aneuploidy was clearly shown. Moreover, a significant augmentation of aneuploidy level was observed at a concentration that can be found in polluted environments (46.5 nM) compared with the control treatments (without atrazine). Marine invertebrates accumulate atrazine essentially by filtering water [26], and evidence of atrazine accumulation has been reported in invertebrates and fish [40]. The effects we observed might therefore be related to a phenomenon of accumulation of atrazine by oysters, as they were exposed to that pollutant for at least two months.

In our study, atrazine did not have a significant effect on the mortality of *C. gigas*. For the three treatments, the mortality rates were very low. These low rates are normal in closed-circuit culture conditions. In adults, the oysters with the higher concentration of atrazine (465 nM) showed a low mortality rate (5.3%) despite exposure for 51 d. However, Moraga and Tanguy [26] observed a mortality rate of approximately 60 to 70% at atrazine concentrations of 465 and 930 nM after two months of exposure. This high mortality rate in adults at only 465 and 930 nM atrazine also appears to contradict the finding of Robert et al. [25] that mortalities in larvae (generally more sensitive to pollutants) appeared only beyond 4.65  $\mu\text{M}$ . The noncongruent results between the study of Moraga and Tanguy [26] and our own could, however, be due to differences in the biological condition of the animals, as these did not have the

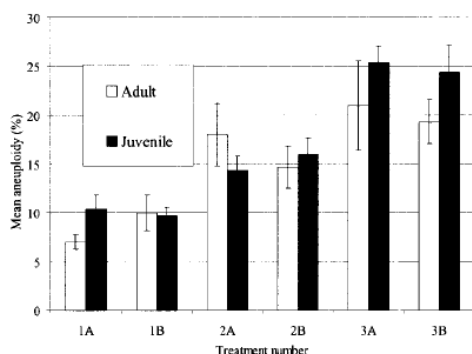


Fig. 2. Comparison of mean percentage aneuploidy between adult and juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* according to the different atrazine treatments: treatments 1A, 1B (control 0 nM); treatments 2A, 2B (46.5 nM); and treatments 3A, 3B (465 nM).

same origin and were maintained in a lower volume of seawater that was changed only every 48 h.

The results obtained in this study are particularly important for shellfish farming areas, such as Marennes-Oléron Bay, which is the principal center for production and commercialization of the Pacific oyster *C. gigas* in France. However, atrazine is also widely used in the rest of France, and agronomic development of the marshland in coastal regions like those near Marennes-Oléron has led to increased agrochemical use and hence the risk of pollution. In many zones, the juxtaposition of agricultural and aquacultural activities that share the same water has caused concern on the part of shellfishery managers who fear a degradation in water quality. In June 1993, the Grand-Garçon channel in Brouage (Charente-Maritime, France) had a high concentration in atrazine (36.21 nM) [19]. This channel is a possible means of entry for atrazine into the Marennes-Oléron Bay because it communicates with the bay through the Brouage oyster channel. The raised concentration is close to the one tested in our lowest treatment. The concentrations of atrazine are higher during crop treatment periods, but this contaminant is also present outside the period of application. Although we observed 20% degradation in atrazine in the first 24 h, this chemical and its derivatives are persistent. For example, in the Grand-Garçon channel, the atrazine concentrations were superior to 9.3 nM from the end of April until the end of July (period of application), but a small concentration was still found in September (0.49 nM) [19]. Atrazine is spread during the oyster reproduction period, so it could have an impact on larval recruitment.

In conclusion, our results have shown that, although atrazine did not have an effect on mortality up to the concentration of 465 nM, significant differences in aneuploidy level were observed between the batches exposed to the different concentrations of atrazine and the controls. Although these results need to be confirmed in the natural environment, they are very important for shellfish cultivation activities because of concerns about water quality in the production area. To expand on these results, the next step will be to study the aneuploidy level of descendants from parents exposed to atrazine. In a similar manner, Dixon [2] studied *M. edulis* embryos of parents originating from a chemically contaminated environment. Determining if this genotoxic effect persists to the next generation will allow a greater understanding of the observed impact of atrazine in oysters.

*Acknowledgement*—The authors are grateful to C. Chevallier, D. Munaron, J.F. Dubernet, L. Degrémont, S. Sabatier, and S. Heurtebise for technical assistance; R. Ben Hamadou for statistical analysis; and P. Boudry, C. Thiriôt-Quévieux, and P. Miramand for their scientific advice. Part of this research was supported by the Conseil Général de Charente-Maritime and the Région Poitou-Charentes (Plan Etat-Région 2001-RPC-A 212 IFREMER 01/5210/757 F).

#### REFERENCES

- Ahmed M, Sparks AK. 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biol Bull* 138:1–13.
- Dixon DR. 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar Biol Lett* 3:155–161.
- Thiriôt-Quévieux C. 1986. Etude de l'aneuploidie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70:225–231.
- Martínez-Expósito MJ, Martínez-Lage AA, Pasantes JJ, Méndez J. 1992. A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. *Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos* 6:49–55.
- Cornet M. 1993. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). *Experientia* 49:87–90.
- Li XX, Havenhand JN. 1997. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): Evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Mar Biol* 127:443–448.
- Bond DJ, Chandley AC. 1983. *Aneuploidy*. Oxford Monographs on Medical Genetics No. 11. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Martin RH, Rademaker A. 1990. The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 53:103–107.
- Vig BK, Sandberg AA. 1987. *Aneuploidy: Part A. Incidence and Etiology*. Alan R. Liss, New York, NY, USA.
- Thiriôt-Quévieux C, Pogson GH, Zouros E. 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: Aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35:39–45.
- Thiriôt-Quévieux C, Noël T, Bougnier S, Dallot S. 1988. Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75:89–96.
- Leitão A, Boudry P, Thiriôt-Quévieux C. 2001. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Ten years of evidence. *Aquaculture* 193:39–48.
- Zouros E, Thiriôt-Quévieux C, Kotoulas G. 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genetic Research* 68:109–116.
- Leitão A, Boudry P, McCombie H, Gérard A, Thiriôt-Quévieux C. 2001. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquat Living Resour* 14:233–237.
- Leitão A, Boudry P, Thiriôt-Quévieux C. 2001. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome* 44:735–737.
- Dixon DR, Wilson JT. 2000. Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* 420:29–43.
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399:65–85.
- Collet M. 1988. Evaluation des transferts existants ou potentiels de produits phytosanitaires utilisés en agriculture vers le milieu marin. DERO-88-04-EL. Final Report. IFREMER, Brest, France.
- Munsch C. 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. PhD thesis. Université de Paris 6, Paris, France.
- Tavera Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliesse D. 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ Toxicol Chem* 21:527–531.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Ali Stuart A, Vonk A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5476–5480.
- Rosés N, Poquet M, Muñoz I. 1999. Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). *J Appl Toxicol* 19:351–356.
- Le Pennec G, Le Pennec M. 2001. Evaluation of the toxicity of chemical compounds using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. *Aquat Toxicol* 53:1–7.
- Auffret M, Oubella R. 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol A* 118:705–712.
- Robert R, His E, Maurer D. 1986. Toxicité d'un desherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Halictis* 15:319–325.
- Moraga D, Tanguy A. 2000. Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environ Toxicol Chem* 19:706–711.
- Al-Sabti K. 1985. Frequency of chromosomal aberrations in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., exposed to five pollutants. *J Fish Biol* 26:13–19.
- Thiriôt-Quévieux C, Ayraud N. 1982. Les caryotypes de qu-

- elques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar Biol* 70: 165-172.
29. Stallard R, Haney NR, Frank PA, Styron P, Juberg RC. 1981. Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: Preliminary observations. *Cytogenet Cell Genet* 30:50-53.
  30. Wenger SL, Golden WL, Dennis SP, Steele MW. 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Am J Med Genet* 19:715-719.
  31. Scherrer B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin, Montréal, Canada.
  32. Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry*. W.H. Freeman, New York, NY, USA.
  33. Wilkinson L. 1990. *Systat: The System for Statistics*. Systat, Evanston, IL, USA.
  34. Verma RS. 1990. *The Genome*. VCH, New York, NY, USA.
  35. Ribas G, Surrallés J, Carbonell E, Creus A, Xamena N, Marcos R. 1998. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 416:93-99.
  36. Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Zucker RM. 2000. Cytogenetic studies of three triazine herbicides I. In vitro studies. *Mutat Res* 465:53-59.
  37. Lioi MB, Scarfi MR, Santoro A, Barbieri R, Zeni O, Salvemini F, Di Bernardino D, Ursini MV. 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ Mol Mutagen* 32:39-46.
  38. Biradar DP, Rayburn AL. 1995. Flow cytogenetic analysis of whole cell clastogenicity of herbicides found in groundwater. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:13-17.
  39. Taets C, Aref S, Rayburn AL. 1998. The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ Health Perspect* 106:197-201.
  40. Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW Jr, Williams WM. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15:31-76.





**Annexe 2 :**

**Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas***

**Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A. & Lapègue, S.**

**Article publié en 2004 dans :**

***Marine Biology* 145 (4): 699-705**



## RESEARCH ARTICLE

K. Bouilly · H. McCombie · A. Leitão · S. Lapègue

## Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*

Received: 5 December 2003 / Accepted: 22 March 2004 / Published online: 30 April 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** Widespread use of the herbicide atrazine has incited much research on its toxicity in aquatic systems, where it is routinely detected due to runoff from cultivated fields. Moreover, the determination of the genotoxic effect of such pollutants in the marine environment has become a major requirement for ecosystem protection. In the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hypodiploid aneuploid cells have regularly been reported. There is a negative correlation between this phenomenon and growth, as well as evidence for a genetic basis. A positive relationship between atrazine and aneuploidy has previously been demonstrated in *C. gigas* adults and juveniles. To evaluate the persistence of this impact, our study examined the offspring of the same adult population previously treated with different atrazine doses ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ , representing a peak value found in a polluted environment and  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ), and a seawater control. We observed that these offspring exhibited significantly higher aneuploidy levels when their parents had been exposed to atrazine (14.9–16.9% in comparison with the control where the levels ranged from 11.4% to 12.8%). In addition, the present study examined the aneuploidy level of a sample of juveniles, previously exposed for 3.5 months to the same doses of atrazine, then transferred to non-polluted conditions for an additional period of 2.5 months; this aneuploidy level remained significantly different between the treatments applied. These results demonstrate the persistence of an atrazine impact on Pacific oyster aneuploidy in time, within and between generations, indicating that this widely used compound may represent an important factor causing at least medium-term damage to genetic material.

Communicated by S.A. Poulet, Roscoff

K. Bouilly · H. McCombie · A. Leitão · S. Lapègue (✉)  
Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER,  
17390 La Tremblade, France  
E-mail: slapegue@ifremer.fr  
Tel.: +33-5-46367619  
Fax: +33-5-46363751

### Introduction

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-s-triazine) is the most commonly used herbicide in the United States and probably the world (US Environmental Protection Agency 1994). It has been used for over 40 years and is currently applied in more than 80 countries to control broad-leaf plants and grassy weeds. In France, atrazine is used mainly on crops to improve yields, particularly that of maize. Atrazine is a potential contaminant of surface and ground water as it is known to have high mobility through soil, so it may easily find its way into the aquatic environment (Marchini et al. 1988). Considering the timing of application and the persistence of atrazine, habitats adjacent to application areas could be chronically exposed to consistently high levels of atrazine that could negatively impact aquatic organisms during their breeding periods. The determination of the genotoxic effect of pollutants in the aquatic environment has become a major requirement for protection of the ecosystem. Many studies about relationships between pollution and immunotoxicity or genotoxicity in vertebrates have been realised, but few studies have examined invertebrates (Dixon 1982; Galloway and Depledge 2001) even though they represent 95% of the animal species on the earth. Moreover, they play key roles in many ecosystems. The effects of agrochemical pollutants on non-target invertebrate species are therefore important for the environment as a whole. Indeed, these species can be sentinel organisms in the monitoring of aquatic pollution and so allow an evaluation of environmental risk (Rivière 2001). This risk is determined according to a classical approach combining the exposure and the hazard. The exposure is characterised by the calculation of predicted environmental concentrations, and the hazard by ecotoxicity data from tests on different animal and plant species. In consequence, the widespread use of atrazine has generated much research on its toxicity in aquatic

systems (Huber 1993; Solomon et al. 1996) as it can induce lethal or sub-lethal effects on aquatic organisms. In *Crassostrea gigas*, exposure to atrazine at a peak environmental concentration ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) over a short period resulted in moderate changes in haemocyte aggregation (Auffret and Oubella 1997). Atrazine also directly harmed the growth and development of young *C. gigas* larvae and indirectly affected veligers by curbing the growth of nanoplankton (Robert et al. 1986). Moreover, Moraga and Tanguy (2000) observed a mortality rate of approximately 60–70% on *C. gigas* adults at atrazine concentrations of 100 and  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  after 2 months of exposure.

Aneuploidy, a cytogenetic abnormality which mainly originates from the non-disjunction of chromosomes during mitosis or meiosis (Bond and Chandley 1983; Martin and Rademaker 1990), is known to be common in bivalve populations (Longwell et al. 1967; Ahmed and Sparks 1970; Dixon 1982; Thiriou-Quévieux 1986; Martínez-Expósito et al. 1992; Li and Havenhand 1997). In oysters, aneuploidy has been observed as the alteration of the normal diploid chromosome number ( $2n=20$ ) in hypodiploid cells with  $2n=19$ , 18, or 17 (Thiriou-Quévieux et al. 1992). A negative correlation between somatic aneuploidy and growth rate has been reported in the Pacific oyster (Leitão et al. 2001c), and differential chromosomal susceptibility has been observed in aneuploid mitotic metaphase cells (Leitão et al. 2001b). In spite of this, the causes of this phenomenon are still unclear. Some evidence for the existence of a genetic basis for the control of the level of aneuploidy in *C. gigas* has been shown (Leitão et al. 2001a). However, few studies have been made on the influence of environmental factors (such as pollutants) on the level of aneuploidy of bivalves. Dixon (1982) showed that the level of aneuploidy was elevated in *Mytilus edulis* embryos from a chemically (aromatic hydrocarbons and heavy metals) polluted dock (King's Dock, Swansea, South Wales, UK). Additionally, in the same species from San Diego Bay, Calif., USA, Steinert et al. (1998) showed that there was more DNA damage in areas with a greater exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals. Recently, the effect of the herbicide atrazine on aneuploidy in *C. gigas* was experimentally demonstrated at adult and juvenile stages (Bouilly et al. 2003). Indeed, significant differences were shown in the aneuploidy level of *C. gigas* exposed to different atrazine treatments, representing a peak value found in a polluted environment ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) and a value ten times higher ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (Bouilly et al. 2003).

In this paper, we investigate whether atrazine has medium-term effects on aneuploidy in the Pacific oyster. We studied the aneuploidy level of: (1) the offspring of contaminated parents to investigate the impact of atrazine on aneuploidy in the next generation and (2) previously contaminated juvenile oysters put in non-polluted conditions for an additional period to investigate the persistence of impact.

## Materials and methods

### Initial biological material

Three-year-old adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, were purchased from a shellfish farm located in Marennes-Oléron Bay (La Tremblade, Charente-Maritime, France) on the French Atlantic coast in February 2001. Juveniles of the same species were bred and raised at the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) hatchery, La Tremblade. They were produced at the beginning of February 2001 by crossing 6 males with 24 females originating from the Seudre River (Charente-Maritime, France). Both adults and juveniles were exposed to atrazine diluted in seawater that was pumped directly from Marennes-Oléron Bay, as described in Bouilly et al. (2003), prior to the experiments described here. The atrazine (CAS no. 1912-24-9) was supplied by the Institut National de la Recherche Agronomique (Saint-Laurent-de-la-Prée, Charente-Maritime, France) at the concentration of  $500 \text{ g l}^{-1}$  (formulated product). Pure seawater was used as a control (treatment 0). The atrazine treatments applied represent one peak value found in a polluted environment ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (treatment 1) (Munsch 1995) and a value ten times higher ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (treatment 2). Indeed, Munsch (1995) found a high concentration of atrazine ( $7.8 \mu\text{g l}^{-1}$ ) in a channel in Brouage (Charente-Maritime), which communicates with Marennes-Oléron Bay, and, more recently, in 2003, Munaron (personal communication) found an atrazine concentration of  $32 \mu\text{g l}^{-1}$  in the Brouage oyster ponds. Oysters live in these waters, so the value  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  is an appropriate concentration to use for this study. For each concentration and the control, two replicates were made (A and B). Oysters were acclimated for 6 days in raceways (containers of circulating seawater measuring  $1.65 \times 0.50 \times 0.30 \text{ m}$ ). The experiment was conducted over 2 months for the adults and 3.5 months for the juveniles in closed-circuit raceways with a system of water circulation for oxygenation. Each raceway contained 157 l of seawater, with or without atrazine, which was changed every day and maintained at  $19.5 \pm 1^\circ\text{C}$ . A volume of 157 ml of atrazine at  $10 \text{ mg l}^{-1}$  (previously dissolved in distilled water from the initial atrazine solution) for treatment 2 and  $100 \text{ mg l}^{-1}$  for treatment 3 diluted in 5 l of seawater was added to the corresponding raceways each time the water was changed. Oysters were fed daily with 8 l of *Isochrysis galbana* ( $6 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ ) and 3.5 l of *Tetraselmis suecica* ( $1.5 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ ) for each raceway. We assume that atrazine is unlikely to have affected the phytoplankton used for food in the treatments, as Robert et al. (1986) showed that phytoplanktonic growth was not affected below the atrazine concentration of  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Water samples were collected for analysis (Institut de Recherche pour l'Ingénierie de l'Agriculture et de l'Environnement, Bordeaux, France) throughout the treat-

ment period to verify the atrazine concentrations in the different raceways including the control. For each raceway, pH and conductivity (salinity) were measured on a homogenised 1-l sample. High-performance chromatography analyses were then performed. The detection of compounds was carried out at 220 nm. The first sampling was performed just after the addition of atrazine to the raceways for the first time. Concentrations were in agreement with those expected. A second sampling was performed 24 h after the addition of atrazine in the raceways, just before the replacement of the water. At this point, the atrazine concentrations had decreased by about 20% and new degradation products, such as simazine, di-isopropylatrazine and di-ethylatrazine, had appeared in low concentrations. Sampling was then repeated every 2 days with a water sample taken at the same point, 24 h after the addition of the atrazine, in which levels showed a similar pattern of degradation.

#### Offspring of the previously exposed adults (experiment 1)

From each raceway of exposed adults described above, we crossed six males with six females. Gametes were obtained by strip-spawning sexually mature animals. For fertilization, 600 million spermatozooids were added to approximately 3 million oocytes suspended in 1 l of seawater. We made two replicates for each batch. The fertilised eggs were placed in 30-l fibreglass larval tanks. Larvae from these crosses were reared for approximately 3 weeks under standard conditions (30-l tanks, 23–24°C) and fed with a mixture of four different phytoplankton species *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans* (25, 10, 2 and 25 cells  $\mu\text{l}^{-1}$  day $^{-1}$ , respectively). The larval density for each batch was evaluated directly by microscope counts. The larval growth was studied by measuring the size of 50 larvae per batch using an image analysis system every 2 or 3 days. The larvae were put in a micro-nursery when they were ready to settle. The aneuploidy of these offspring was studied after 4.5 months.

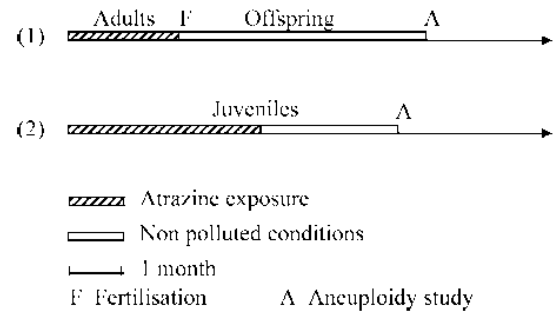
#### Juveniles (experiment 2)

In parallel, the juvenile population exposed to atrazine was put into non-polluted conditions for an additional period of 2.5 months and was then analysed.

The different experiments are summarised in Fig. 1.

#### Chromosome preparation

Samples of the offspring of animals exposed to atrazine and the juveniles transferred to non-polluted conditions for another 2.5 months were analysed. The animals for aneuploidy analysis were incubated for 7–8 h in seawater containing 0.005% colchicine for the aneuploidy



**Fig. 1** Diagram summarising the different experiments: offspring of the adults previously exposed to atrazine (1) and juveniles contaminated by atrazine, then transferred to non-polluted conditions (2)

studies. The gills were then dissected in seawater, treated for 40 min in 0.9% sodium citrate and fixed in a freshly prepared mixture of absolute alcohol acetic acid (3:1) with two 10-min changes then two 20-min changes. Slides were made from a piece of one individual gill, following the air drying technique of Thiriou-Quévieux and Ayraud (1982). The preparation was stained for 10 min with Giemsa (4%, pH 6.8).

#### Scoring

Chromosome counts were made directly by microscope observation (Olympus BH2 microscope) on apparently intact and well-spread metaphase cells. We considered the cells with  $2n=19$ , 18, or 17 chromosomes as aneuploid. The mean percentage of aneuploidy for each batch of animals was estimated by counting 900 well-spread metaphase cells for experiment 1 on the offspring or 420 metaphase cells for experiment 2 on the juveniles. We studied 30 animals per replicate for experiment 1 and 14 for experiment 2. We could not study the same number of animals for each experiment, because we did not have enough juvenile oysters for the second experiment due to unexpected mortality, which was unrelated to the treatment.

#### Statistics

Since the number of metaphase cells evaluated per individual was the same in all studied materials (30 individual $^{-1}$ ), it was possible to test the replicate effect using a nested two-way analysis of variance (atrazine concentration and replicate effect). The results between parents and offspring were compared using a three-way analysis of variance [generation (parents or offspring), atrazine concentration and replicate effect]. A comparison between the groups of juvenile animals exposed to atrazine and samples of the same groups subsequently transferred to non-polluted conditions for a further period was made using a three-way analysis of variance

(group, atrazine concentration and replicate effect). Statistical analyses of variance were computed using SYSTAT 9.0 by SPSS (Wilkinson 1990). The effect of parental treatment on the offspring hatching rate was analysed with a *G*-test (Scherrer 1984; Sokal and Rohlf 1995), and on larval growth, with the Fisher–Snedecor *F*-test (Legendre and Legendre 1998).

## Results

Lower hatching rates of *Crassostrea gigas* were observed in the batches where the parents were exposed to atrazine. The hatching rates in the batches where the parents were exposed to 0, 10 and 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  of atrazine were 74%, 62% and 56%, respectively (Fig. 2). A *G*-test revealed a significant difference between the three batches. The *G*-values between the three batches ( $G=123.35$ , 173.14 and 70.11) were all greater than the critical value (20.09). A Fisher–Snedecor *F*-test revealed that the different larval growth series were correlated following the same growth law (Fig. 3). The *F*-values between the

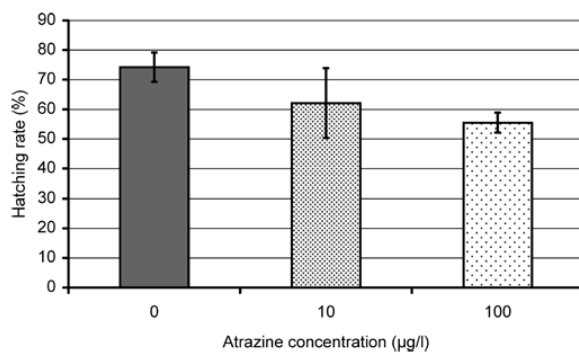


Fig. 2 *Crassostrea gigas*. Hatching rate (%) of the offspring of oysters previously exposed to different atrazine concentrations (0, 10 and 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Error bars: standard deviation of the mean

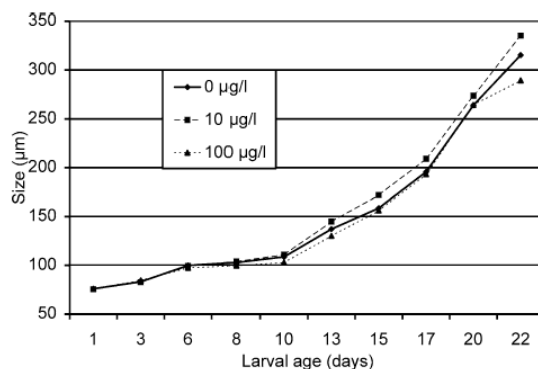


Fig. 3 *Crassostrea gigas*. Size ( $\mu\text{m}$ ) of larvae bred from parental oysters previously exposed to different atrazine concentrations (0, 10 and 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ )

three batches ( $F=69.33$ , 17.25 and 11.97) were all greater than the critical value (9.38). The *R*-values were 0.9920, 0.9968 and 0.9954. The offspring of previously exposed oysters did not show any difference in larval growth; however, the hatching rate differed significantly.

The aneuploidy results obtained for the offspring are presented in Table 1. Aneuploidy is a phenomenon frequently observed in natural oyster populations at a low level, which explains its presence in the control. The levels for treatments 0 (control), 1 (10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) and 2 (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) ranged from 11.4% to 12.8%, 15.7% to 16.4% and 14.9% to 16.9%, respectively. The statistical analysis showed that the aneuploidy level was not significantly different between replicates ( $F=0.711$ ,  $P=0.400$ ). However, treatment effect was significant ( $F=6.503$ ,  $P=0.002$ ). The aneuploidy levels for the parents had previously been shown to be significantly different between treatments (Bouilly et al. 2003). When comparing aneuploidy between parents and offspring (Fig. 4), statistical analysis revealed no significant differences ( $F=0.085$ ,  $P=0.771$ ).

The aneuploidy results obtained for the study of the contaminated juvenile oysters transferred to non-polluted conditions are also summarised in Table 1. The aneuploidy levels for treatments 0, 1, and 2 ranged, respectively, from 10.2% to 10.5%, 16% to 16.7% and 19% to 22.9%. They were not significantly different between the replicates ( $F=0.416$ ,  $P=0.521$ ); however, treatment effect was significant ( $F=17.242$ ,  $P<0.001$ ). The aneuploidy levels of the juveniles contaminated by atrazine for 3.5 months, with no period in non-polluted conditions, were also found to be significantly different according to the atrazine concentration (Bouilly et al. 2003). When comparing aneuploidy between these contaminated juveniles and the ones transferred for 2.5 months to non-polluted conditions (Fig. 5), statistical analysis showed no significant differences ( $F=0.546$ ,  $P=0.461$ ).

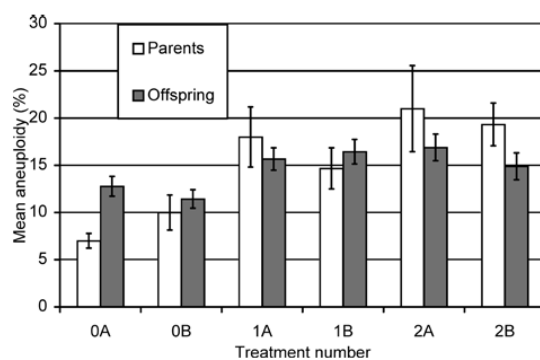
## Discussion

Investigation of the persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is of particular importance, since atrazine may cause irreversible damage to genetic material. The precise causes of aneuploidy are still unclear, but genetic and environmental factors have been shown to be involved in its origin (Dixon 1982; Bond and Chandley 1983; Verma 1990; Leitão et al. 2001a; Bouilly et al. 2003).

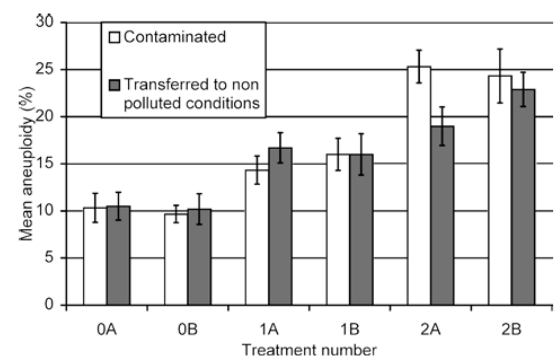
Considering the timing of application and the persistence of atrazine in habitats adjacent to application areas, pollution could negatively impact aquatic organisms during their breeding periods. Our first experiment is therefore important because the maturation of the parental adults occurred during atrazine exposure. We examined the offspring of an oyster population that had been exposed to atrazine for 2 months and saw a significant increase in the level of aneuploidy at the two

**Table 1** *Crassostrea gigas*. Observed aneuploidy of the offspring of parental Pacific oysters exposed to different atrazine treatments: treatments 0A, 0B (control,  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ); treatments 1A, 1B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ); and treatments 2A, 2B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) and observed aneuploidy of juveniles contaminated by atrazine then transferred to non-polluted conditions for an additional period of 2.5 months. Thirty metaphase cells per animal were studied. Standard error of the mean is indicated in parentheses

Population	Treatment	Number of animals studied	Total cells observed				Mean aneuploidy (%)
			2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	
Offspring	0A	30	785	64	32	19	12.8 (1.05)
	0B	30	797	57	26	20	11.4 (0.98)
	1A	30	759	88	33	20	15.7 (1.19)
	1B	30	752	75	41	32	16.4 (1.30)
	2A	30	748	96	35	21	16.9 (1.41)
	2B	30	766	75	40	19	14.9 (1.43)
Juvenile	0A	14	376	19	11	14	10.5 (1.48)
	0B	14	377	25	12	6	10.2 (1.62)
	1A	14	350	33	24	13	16.7 (1.60)
	1B	14	353	27	26	14	16.0 (2.19)
	2A	14	340	51	17	12	19.0 (2.05)
	2B	14	324	50	27	19	22.9 (1.81)



**Fig. 4** *Crassostrea gigas*. Comparison of mean percentage aneuploidy between parents exposed to atrazine and their offspring according to the different atrazine treatments of the parents: treatments 0A, 0B (control,  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ); treatments 1A, 1B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ); and treatments 2A, 2B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Error bars: standard deviation of the mean



**Fig. 5** *Crassostrea gigas*. Comparison of mean percentage aneuploidy between juveniles contaminated by atrazine and a sample of the same population transferred to non-polluted conditions for an additional period of 2.5 months according to the different atrazine treatments: treatments 0A, 0B (control,  $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ); treatments 1A, 1B ( $10 \mu\text{g l}^{-1}$ ); and treatments 2A, 2B ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Error bars: standard deviation of the mean

tested concentrations in comparison with the control treatments. A positive dose-dependent correlation between atrazine and aneuploidy has already been established for *C. gigas* adults and juveniles (Bouilly et al. 2003). Moreover, some evidence has been found for a heritable genetic basis for the control of the aneuploidy level in *C. gigas* (Leitão et al. 2001a). In this previous study, the possible inheritance of the level of aneuploidy was studied in four full-sib progenies originating from crosses within and between two different populations with contrasting levels of aneuploidy, and a genetic difference in aneuploidy could be attributed to the origin of the parental populations, since significant differences in aneuploidy were observed between progenies, based on individuals of the same weight.

Statistical analysis revealed no significant differences when comparing aneuploidy between parents and offspring in our study. In fact, the offspring from contaminated parents also showed higher aneuploidy levels than the offspring of controls. This result clearly shows that the observed atrazine impact on Pacific oyster aneuploidy persists to the next generation. Two hypotheses can be suggested: firstly, that this is an

induced heritable effect, or, secondly, that the negative effect was transmitted via the maternal egg reserves during larval development. It would be interesting to study the aneuploidy earlier in development, especially at larval stages, to know at what point the phenomenon appears. Our present results support a genetic basis for the aneuploidy level in the same way as do the results of Leitão et al. (2001a), in that the parents with higher aneuploidy have offspring of higher aneuploidy.

In our study, the presence of atrazine in the environment of the parents had an effect on the hatching rate of their offspring, but not on subsequent larval growth. Robert et al. (1986) demonstrated the toxicity of atrazine on the formation and growth of young larvae of *C. gigas*. They observed abnormal larval growth beyond  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  and mortality beyond  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ . This positive result, compared to our own, was probably found because the larvae themselves were directly exposed to atrazine and because the concentrations used were several times higher. Nevertheless, if the parents in our study had been exposed to atrazine for longer, this may have influenced the larval or juvenile growth. It would

also be interesting to directly expose larvae to different atrazine treatments from the beginning of their development, to access the effects of atrazine on aneuploidy during larval farming and in subsequent juvenile and adult stages.

In the present study, we also showed that the effects of atrazine persist in the absence of exposure. Significant differences in aneuploidy levels were already observed in a juvenile population of *C. gigas* exposed to atrazine for 3.5 months (Bouilly et al. 2003). We have now shown that the aneuploidy levels of a sample of the same population transferred to non-polluted conditions for an additional period of 2.5 months remained significantly different between the treatments applied. This result could indicate that the genetic damage caused by exposure to atrazine is irreversible. However, we only left the juvenile oysters in non-polluted conditions for 2.5 months, a longer period in a clean environment would show us if reversibility of aneuploidy increases as cells are replaced. Marine invertebrates accumulate atrazine essentially by filtering water (Moraga and Tanguy 2000). The compound does not bioaccumulate appreciably (Solomon et al. 1996), although some bioconcentration of atrazine by fish (Solomon et al. 1996), frogs (Allran and Karasov 2001) and algae (Shelton and Miller 2002) has already been established. Atrazine is quite water soluble and would be rapidly exchanged upon removal of the exposure source, although, if oysters accumulate atrazine but do not have mechanisms of detoxification, genetic damage may not be repaired even if the cells were replaced. Very few data are available about the accumulation of atrazine in oysters. Lehotay et al. (1998) did not detect atrazine in oysters from Chesapeake Bay, even when the concentration in the water was  $0.432 \mu\text{g l}^{-1}$ , although this concentration is lower than those we tested. To our knowledge, no detoxification process for this compound has yet been identified. We also might have irreversible genetic damage via gene expression. Because toxic substances have the potential to damage bivalve DNA (Steinert et al. 1998; Dixon and Wilson 2000), they might therefore damage genes and their expression.

In conclusion, our results demonstrate the persistence of the impact of atrazine on Pacific oyster aneuploidy in time, both within and between generations, and also seem to confirm the genetic basis previously found for this phenomenon. Although these effects need to be tested in the natural environment, they are potentially important for the oyster aquaculture industry and management of resources, because the lowest atrazine level we tested represents realistic potential exposure (a value three times higher has already been observed in Marennes-Oléron oyster ponds (Munaron, personal communication), but such concentrations are not observed very frequently in marine and estuarine environments). Moreover, in the natural environment, the length of exposure might be quite different from that used in our study because of tidal flushing and cycling in the systems, and thus the effect could be smaller. Our

findings support legislation limiting the use of atrazine in zones adjacent to shellfish farms. To expand on these results, the next steps will be to study the aneuploidy level of: (1) the third generation, to investigate the genetic basis of this phenomenon and the inheritance between generations; (2) oysters kept in non-polluted conditions for a longer additional period after their contamination, to gain a better understanding of the extent of reversibility of this phenomenon in time; and (3) oysters exposed to atrazine in early larval stages.

**Acknowledgements** Part of this research was supported by the Conseil Général of Charente-Maritime, the Programme Environnement, Vie et Sociétés from CNRS and the Région Poitou-Charentes (Plan Etat-Région 2001-RPC-A-212 and 2002-RPC-A-180). We thank R.B. Hamadou for statistical analysis. All experiments comply with French law.

## References

- Ahmed M, Sparks AK (1970) Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. Biol Bull (Woods Hole) 138:1–13
- Allran JF, Karasov WH (2001) Effects of atrazine on embryos, larvae and adults of anuran amphibians. Environ Toxicol Chem 20:769–775
- Auffret M, Oubella R (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp Biochem Physiol A 118:705–712
- Bond DJ, Chandley AC (1983) Aneuploidy. Oxford Monographs on Medical Genetics no. 11, Oxford University Press, Oxford
- Bouilly K, Leitão A, McCombie H, Lapègue S (2003) Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environ Toxicol Chem 22:219–223
- Dixon DR (1982) Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. Mar Biol Lett 3:155–161
- Dixon DR, Wilson JT (2000) Genetics and marine pollution. Hydrobiologia 420:29–43
- Galloway TS, Depledge MH (2001) Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 10:5–23
- Huber N (1993) Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. Environ Toxicol Chem 12:1865–1881
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical ecology. Elsevier Science, Amsterdam
- Lehotay SJ, Harman-Fetcho JA, McConnell LL (1998) Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake Bay tributaries. Mar Pollut Bull 37:32–44
- Leitão A, Boudry P, McCombie H, Gérard A, Thiriot-Quévieux C (2001a) Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquat Living Resour 14:233–237
- Leitão A, Boudry P, Thiriot-Quévieux C (2001b) Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Genome 44:735–737
- Leitão A, Boudry P, Thiriot-Quévieux C (2001c) Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. Aquaculture 193:39–48
- Li XX, Havenhand JN (1997) Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. Mar Biol 127:443–448
- Longwell AC, Stiles SS, Smith DG (1967) Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. Can J Genet Cytol 9:845–856



- Marchini S, Passerini L, Cesareo D, Tosato ML (1988) Herbicidal triazines: acute toxicity on *Daphnia*, fish and plants and analysis of its relationships with structural factors. *Écotoxicol Environ Saf* 16:148–157
- Martin RH, Rademaker A (1990) The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 53:103–107
- Martínez-Expósito MJ, Martínez-Lage AA, Pasantes JJ, Méndez J (1992) A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. *Cuad Cienc Mar Sem Estud Galegos* 6:49–55
- Moraga D, Tanguy A (2000) Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environ Toxicol Chem* 19:706–711
- Munsch C (1995) Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. PhD thesis, Université de Paris 6, Paris, France
- Rivière JL (2001) Ecotoxicological and toxicological aspects of pesticides: from regulatory risk assessment to environmental monitoring. Pesticides transfer diagnosis and corrective solutions. Cemagref, Antony, France, no. HS, pp 23–27
- Robert R, His E, Maurer D (1986) Toxicité d'un desherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis* 15:319–325
- Scherrer B (1984) Biostatistique. Gaëtan Morin, Montreal
- Shelton AD, Miller MC (2002) Herbicide bioconcentration in *Cladophora glomerata*: atrazine removal in a eutrophic agricultural river. *Hydrobiologia* 469:157–164
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry. Freeman, New York
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weiskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW Jr, Williams WM (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15:31–76
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat Res* 399:65–85
- Thiriou-Quévieux C (1986) Etude de l'aneuploidie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70:225–231
- Thiriou-Quévieux C, Ayraud N (1982) Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar Biol* 70:165–172
- Thiriou-Quévieux C, Pogson GH, Zouros E (1992) Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35:39–45
- US Environmental Protection Agency (1994) Pesticides industry sales and usage: 1992 and 1993 market estimates. EPA 733-K-94-001, Washington, DC
- Verma RS (1990) The genome. VCH, New York
- Wilkinson L (1990) SYSTAT: the system for statistics. SYSTAT, Evanston, Ill., USA



**Annexe 3:**

**Endonuclease banding reveals that atazine-induced  
aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in  
*Crassostrea gigas***

**Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H.,  
Boudry, P. & Lapègue, S.**

**Note acceptée dans :**

***Genome***



Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*

**Karine Bouilly, Alexandra Leitão, Raquel Chaves, Henrique Guedes-Pinto, Pierre Boudry, and Sylvie Lapègue**

**K. Bouilly, P. Boudry, and Sylvie Lapègue**<sup>1</sup>. IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France.

**A. Leitão**. IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France, and University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Centre of Genetics and Biotechnology, 5000-911 Vila Real, Portugal.

**R. Chaves, and H. Guedes-Pinto**. University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Centre of Genetics and Biotechnology, 5000-911 Vila Real, Portugal.

<sup>1</sup>Corresponding author (e-mail: [slapegue@ifremer.fr](mailto:slapegue@ifremer.fr). Tel: +33-5-46367619. Fax: +33-5-46363751)

---

**Abstract:**

Aneuploidy has previously been observed in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and shown to be negatively correlated with growth. Moreover, a significant impact of atrazine exposure has been described in *C. gigas* and a persistence of that effect has been observed between generations. Evidence of differential chromosome loss has been demonstrated in aneuploid karyotypes of *C. gigas* using the G-banding technique. Pairs 1, 5, 9, and 10 are characterised by the loss of one chromosome. As the restriction enzyme (RE) digestion chromosome banding allows a better identification of chromosome pairs, we used this technique to identify which chromosomes are affected when aneuploidy is increased by exposure to atrazine. Progeny of oysters contaminated by atrazine was analysed using the restriction enzyme *HaeIII*. The study of 26 RE-banded aneuploid karyotypes showed that the same chromosome pairs (1, 5, 9, and 10) were affected by the loss of one chromosome (61, 15, 42, and 42%, respectively). Further investigation is required to enable a better understanding of aneuploidy in oysters, especially with respect to why some chromosomes are more easily lost than others, and why cells tolerate the loss of these chromosomes.

*Key words:* aneuploidy, atrazine, restriction enzyme digestion chromosome banding, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

**Résumé :**

Des travaux précédents ont montré, chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, la présence d'aneuploïdie et sa relation négative avec la croissance. De plus, une exposition à l'atrazine a eu un impact significatif sur l'aneuploïdie de *C. gigas* et cet effet a persisté à la génération suivante. La preuve d'une perte chromosomique différentielle a été démontrée dans des caryotypes aneuploïdes de *C. gigas* en utilisant la technique de marquage en bandes G. Les paires 1, 5, 9 et 10 sont caractérisées par la perte d'un chromosome. Le marquage par digestion d'enzymes de restriction permettant une meilleure identification des paires de chromosomes, nous avons utilisé cette technique pour identifier quels chromosomes étaient affectés quand l'aneuploïdie est augmentée par une exposition à l'atrazine. La descendance d'huîtres contaminées par l'atrazine a été analysée en utilisant l'enzyme de restriction *HaeIII*. L'étude de 26 caryotypes marqués avec cette enzyme a montré que les mêmes paires de chromosomes (1, 5, 9 et 10) étaient affectées par la perte d'un chromosome (61, 15, 42 et 42% respectivement). Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre

l'aneuploïdie chez les huîtres, en particulier afin de comprendre pourquoi certains chromosomes sont plus facilement perdus que d'autres et pourquoi les cellules tolèrent la perte de ces chromosomes.

*Mots clés* : aneuploïdie, atrazine, marquage chromosomique par digestion d'enzymes de restriction, huître creuse, *Crassostrea gigas*

---

## Introduction

Aneuploidy is a phenomenon commonly observed in oysters (e.g. Leitão et al. 2001a). In the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the alteration of the normal diploid chromosome number ( $2n = 20$ ) leads to hypodiploid cells with  $2n = 19, 18$  or  $17$  (Thiriot-Quévèreux et al. 1992). The fact that somatic aneuploidy is negatively correlated to growth rate in this species (Leitão et al. 2001a) is of increasing concern for this economically important bivalve species. Moreover, a positive correlation between aneuploidy and atrazine (a selective herbicide widely used in agriculture) has been experimentally described in juvenile and adult *C. gigas* (Bouilly et al. 2003). This has environmental implications as *C. gigas* is primarily reared in estuarine areas, subject to various recurring pollutants from agricultural or industrial wastes. The most concern is the persistence of atrazine impact on Pacific oyster aneuploidy in time within and between generations (Bouilly et al., in press).

Evidence of differential chromosome loss has been demonstrated in aneuploid karyotypes of *C. gigas* using the G-banding technique, and has shown that four (1, 5, 9, and 10) out of the ten chromosome pairs of *C. gigas* are affected by the loss of one homologous chromosome (Leitão et al. 2001b). Application of the restriction endonuclease (RE) digestion chromosome banding technique to bivalves has yielded some success in mussels (Martínez-Lage et al. 1994), scallops (Gajardo et al. 2002), and in oysters (Leitão et al., in press). The digestion of bivalve chromatin with restriction enzymes produces specific chromosome bands (Martínez-Lage et al. 1994), and thus this technique may be useful in the understanding of the processes affecting chromosome loss. In this paper, we investigate which chromosomes are affected when aneuploidy is induced by exposure to an environmental factor (atrazine), compared to spontaneous aneuploidy with the *in situ* restriction enzyme technique.

## Materials and Methods

The studied animals are progeny of oysters exposed to different atrazine doses (10 and  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) for two months as described in Bouilly et al. (in press). Two controls with seawater from Marennes-Oléron Bay (Charente-Maritime, France) were used in this previous experiment and atrazine concentrations in seawater were validated by the Institut de Recherche pour l'Ingénierie de l'Agriculture et de l'Environnement (Bordeaux, France) throughout the treatment period. At the size of 30-40 mm, four and a half month post-fertilisation, the progeny was incubated for 7-8 h in seawater containing 0.005% colchicine. The gills were then dissected in seawater, treated for 40 min in 0.9% sodium citrate and fixed



---

in a freshly prepared mixture of absolute alcohol/glacial acetic acid (3:1) with two 10-min changes followed by two 20-min changes. Slides were made from a piece of an individual gill following the air-drying technique of Thiriou-Quévroux and Ayraud (1982). Air-dried slides from 14 animals were aged at 65°C for 6 h and then treated overnight with restriction endonuclease digestion. The restriction enzyme used for chromosome digestion was *HaeIII*, diluted in the buffer recommended by the manufacturer (Invitrogen, Life Technologies), to a final concentration of 30U of enzyme per 100 µl (Leitão et al., in press). The restriction enzyme solution (100 µl) was evenly dispersed on the preparations by use of a coverslip. Digestion was carried out in a moist chamber at 37°C overnight. After incubation, the slides were washed two times with water at room temperature and air-dried. The preparations were then stained for 20 min with Giemsa (1%). A Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope containing an Axiocam digital camera and Axio Vision software were used to visualise and photograph chromosome preparations. Digitised photos were printed from Adobe Photoshop (version 5.0) using only contrast, overlay and colour optimisation functions that affected the whole of the image. Chromosomes preparations were subjected to karyotype analysis by the standard measurements of chromosomes pairs (measurements of size and centromeric index) and restriction enzyme digestion chromosome banding technique. We analysed 26 RE-banded aneuploid karyotypes and the same number of standard aneuploid karyotypes. A  $\chi^2$  test was used to compare the percentage of loss found in a population originating from hatchery crosses which was not exposed to atrazine (that “natural” population is considered as a control) (Leitão et al. 2001b) and the one that we found in the population contaminated indirectly by atrazine. The  $\chi^2$  test is a suitable test to compare our observed percentages and the published ones as this test measures the random deviation between observed percentages and theoretical percentages (values from Leitão et al. 2001b).

## Results and Discussion

An increase of 32% was observed in the level of aneuploidy of the progeny originating from contaminated oysters (15,97%) in comparison with the control (12,11%). It was suggested that atrazine has an adverse effect on mitotic spindle fibre formation leading to aberrant chromosome loss in oysters. The analysis of all aneuploid karyotypes of the studied oysters showed that only 4 of the 10 chromosome pairs (1, 5, 9, and 10) were affected by chromosome loss. Chromosome loss from either one pair (Fig. 1A) or more than one pair (Fig. 1B) per karyotype was observed. The loss of both homologues of one pair was not

---

observed in any of the samples. Percentages of chromosome loss, independently calculated for each pair in the 26 RE-banded aneuploid karyotypes analysed, were 61, 15, 42, and 42% for pairs 1, 5, 9, and 10 respectively (Table 1). Among the 26 observed metaphases, 42 chromosomes were missing as we analysed 13, 10, and 3 metaphases with  $2n = 19, 18,$  and 17 chromosomes respectively (Fig. 2). It is interesting to note that the chromosome pair 1 was preferentially lost alone in comparison with pairs 9 and 10, and that chromosome pair 5 was not lost alone. To complete the analysis, we studied 26 standard karyotypes. The percentages of chromosome loss for these metaphases were 46, 4, 15 and 46% for pairs 1, 5, 9, and 10 respectively (Table 1). However, the identification of these chromosome pairs could not be done as precisely as with the banding, especially with regard to pairs 5, 9 and 10 which are difficult to differentiate with precision.

The *in situ* restriction enzyme procedure revealed clear and characteristic bands, so it was easier to identify each chromosome pair. This enabled the precise identification of each chromosome pair by comparison with standard karyotype. The percentage of chromosome loss observed for pair 5 was significantly lower than those for pairs 1, 9, and 10. Therefore, pairs 1, 9, and 10 can be considered to be those predominantly affected by exposure to atrazine. These results corroborate those of Leitão et al. (2001b) who observed in 95 G-banded aneuploid karyotypes 56, 19, 33, and 43% of chromosome loss for pairs 1, 5, 9, and 10 respectively (Table 1). These results obtained using the G-banding technique are close to the ones we obtained with RE-banding and a  $\chi^2$  test revealed that there are no significant differences between these two populations of karyotypes. RE-banding is more reliable than G-banding because this latter classical banding technique presents some disadvantages such as: limited repeatability, large time investment required and the fact the banding is lost during fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) procedure (Leitão et al., in press). Moreover, the RE-banding technique allows a better preservation of the chromosome morphology representing an additional advantage for chromosome identification of oysters.

Such a phenomenon of preferentially loss of chromosomes has already been observed in other species. Cieplinski et al. (1983) showed a statistically significant dependency among patterns of loss of specific chromosomes (both within and between cell lines from human-mouse myeloma), with certain chromosomes preferentially retained and others lost more often than expected under the assumption of randomness of segregation. Although several studies have showed that aneuploidy can be induced by chemicals especially in humans and in rodents (e.g. Leopardi et al. 1993; Güerci et al. 2000), there are few studies on identification of lost

---

chromosomes following chemical exposure. In humans, metabolites of benzene are highly effective in inducing loss of all or part of chromosomes 5 and/or 7 that are involved in the development of myeloid leukemia (Zhang et al. 1998). In invertebrates, no studies have yet reported the identification of chromosome pairs lost as a consequence of a contaminated environment, furthermore, there are also very few studies on chromosome identification in aneuploid karyotypes in this group of animals (Leitão et al. 2001b).

Relatively few studies have examined the biochemical and physiological effects caused by atrazine on hormonal systems. Atrazine can elevate the plasma thyroid hormones T<sub>4</sub> concentrations in salmonids (Waring and Moore 2004) and in salamanders (Larson et al. 1998). The mode of action for atrazine on oysters is poorly known but this herbicide may interact with the mitotic spindle to cause aneuploidy. It was shown that herbicides of several classes act by inhibiting mitosis through direct interaction with tubulin (Duke 1990). Moreover, Grossmann et al. (2001) suggested that some triazines in algae lead to mitotic disruption by a loss of spindle and inhibiting microtubule formation. Further experiments are needed to detail alternative mode of action for atrazine and its specific action in oysters.

In conclusion, there is no effect of atrazine on specific chromosome pairs lost in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. It would be of great interest to know why some chromosomes are more easily lost than others, and why the gill cells of *C. gigas* tolerate the loss of these specific chromosome pairs, to enable a better understanding of the aneuploidy phenomenon in *C. gigas*.

### **Acknowledgements**

Part of this research was supported by the Conseil Général de Charente-Maritime, the Ministère des Affaires Etrangères in France, and the French Embassy in Portugal. We thank R. Ben Hamadou for statistical analysis, and T. Sharbel for his scientific advice.

### **References**

- Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H., and Lapègue, S. 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environ. Toxicol. Chem. **22**: 219-223.
- Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A., and Lapègue, S. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Mar. Biol., in press.

- 
- Cieplinski, W., Reardon, P., and Testa, M.A. 1983. Non-random human chromosome distribution in human-mouse myeloma somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* **35**: 93-99.
- Duke, S.O. 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environ. Health Perspect.* **87**: 263-271.
- Gajardo, G., Parraguez, M., and Colihueque, N. 2002. Karyotype analysis and chromosome banding of the Chilean-Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* **21**: 585-590.
- Grossmann, K., Tresch, S., and Plath, P. 2001. Triaziflam and diaminotriazine derivatives affect enantioselectively multiple herbicide target sites. *Z. Naturforsch. C* **56**: 559-569.
- Güerci, A., Seoane, A., and Dulout, F.N. 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutat. Res.* **469**: 35-40.
- Larson, D.L., McDonald, S., Fivizzani, A.J., Newton, W.E., and Hamilton, S.J. 1998. Effects of the herbicide atrazine on *Ambystoma tigrinum* metamorphosis: duration, larval growth, and hormonal response. *Physiol. Zool.* **71**: 671-679.
- Leitão, A., Boudry, P., and Thiriote-Quévieux, C. 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth rate in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Ten years of evidence. *Aquaculture*, **193**: 39-48.
- Leitão, A., Boudry, P., and Thiriote-Quévieux, C. 2001b. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome*, **44**: 735-737.
- Leitão, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H., and Boudry, P. Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: Comparative karyological analysis within Ostreidae. *Genome*, in press.
- Leopardi, P., Zijno, A., Bassani, B., and Pacchierotti, F. 1993. In vivo studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutat. Res.* **287**: 119-130.
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, A., and Méndez, J. 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, **72**: 242-249.
- Thiriote-Quévieux, C., and Ayraud, N. 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar. Biol.* **70**: 165-172.

- 
- Thiriou-Quiévreux, C., Pogson, G.H., and Zouros, E. 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: Aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome*, **35**: 39-45.
- Waring, C.P., and Moore, A. 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquat. Toxicol.* **66**: 93-104.
- Zhang, L.P., Wang, Y.X., Shang, N., and Smith, M.T. 1998. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Res.* **22**: 105-113.

Table 1. Percentage of chromosome loss in *Crassostrea gigas* metaphase cells for each lost pair with three methods of karyotype analysis (Restriction enzyme RE-banding, standard method, and G-banding).

Technique	Number of metaphases	Number of missing chromosomes	Percentage of chromosome loss in pair:			
			1	5	9	10
RE-banding (this study)	26	42	61	15	42	42
Standard (this study)	26	29	46	4	15	46
G-banding (Leitão et al. 2001b)	95	143	56	19	33	43

---

**Figure legend**

**Figure 1:** Banded aneuploid karyotypes with the restriction enzyme *Hae*III in *Crassostrea gigas* contaminated indirectly by atrazine. (A) Chromosome loss in pair 9. (B) Chromosome loss in pairs 1 and 10. Scale bar = 5  $\mu$ m

**Figure 2:** Frequency of missing chromosomes in 26 RE-banded aneuploid karyotypes realised from progeny of oysters contaminated by atrazine.

Fig. 1.

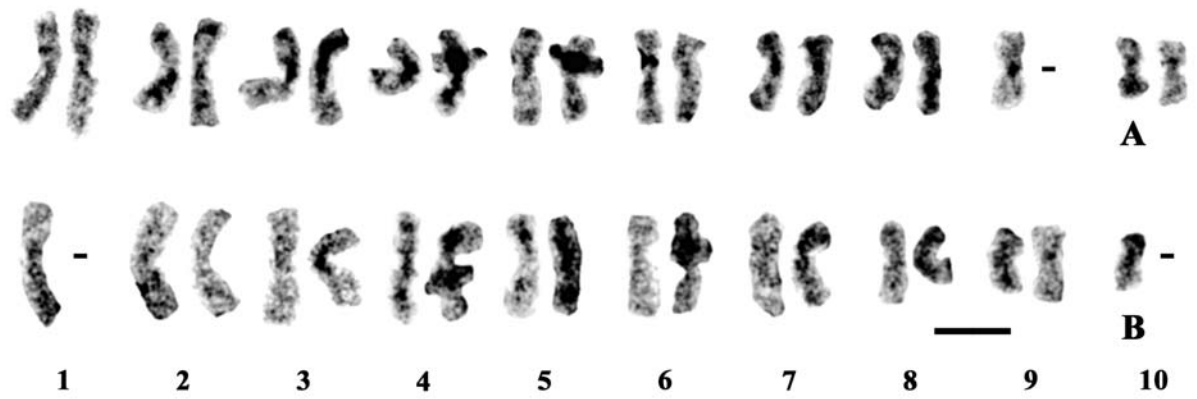
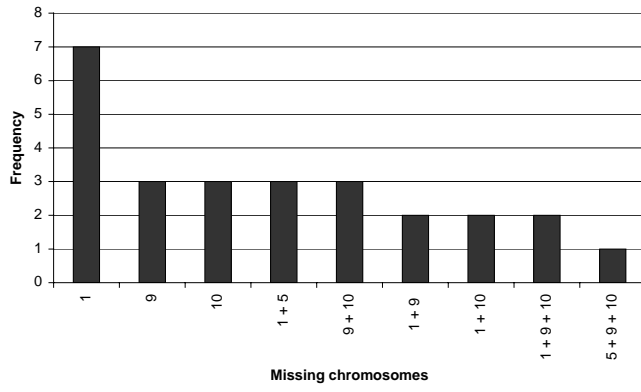




Fig. 2.





**Annexe 4 : Analyses de pesticides au niveau de l'eau interstitielle des sédiments sur la vasière de Brouage. Point 2 de la radiale du PEVS (3 premiers points) et Exutoire du chenal de Montportail (amont de la radiale PEVS) (3 derniers). nd : non détecté. Concentrations en  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Données du CEMAGREF de Bordeaux-Cestas.**

<b>Site de prélèvement :</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>Atrazine</b>	<b>Isoproturon</b>	<b>Diuron</b>
<i>Sédiments des Ruissons</i>	<i>nd</i>	<i>0.07</i>	<i>0.01</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
<i>Sédiments des Banquettes Surface (0-3cm)</i>	<i>nd</i>	<i>0.11</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
<i>sédiments des Banquettes Profondeur (3-10cm)</i>	<i>nd</i>	<i>0.14</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
<i>Sédiment Amont Vanne Montportail</i>	<i>0.07</i>	<i>0.12</i>	<i>0.13</i>	<i>0.25</i>	<i>0.01</i>
<i>Sédiment Aval Vanne Montportail</i>	<i>0.05</i>	<i>0.07</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>
<i>Canal de Montportail</i>	<i>0.02</i>	<i>0.09</i>	<i>0.15</i>	<i>0.02</i>	<i>nd</i>





---

**TITRE** Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron

---

**RESUME**

Afin d'étudier l'impact de facteurs environnementaux sur le taux d'aneuploïdie chez l'huître *Crassostrea gigas*, des expériences en milieu contrôlé ont tout d'abord été réalisées en exposant des huîtres adultes et juvéniles à divers polluants (l'atrazine, un herbicide et le cadmium, un métal lourd) fortement retrouvés dans le bassin de Marennes-Oléron. Une corrélation positive entre la présence d'atrazine et le taux d'aneuploïdie de *C. gigas* a été observée. De plus, l'impact de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie a persisté à la génération suivante et dans le temps, démontrant l'influence d'une pollution environnementale sur ce phénomène. Par contre, le taux d'aneuploïdie de *C. gigas* n'a pas été influencé par le cadmium, aux doses testées. Des différences significatives de taux d'aneuploïdie ont été observées chez des huîtres issues des mêmes familles sur des sites différents et chez des huîtres du milieu au cours du temps suggérant un effet site et un effet saison de l'aneuploïdie.

---

**TITLE** Impact of environmental factors on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Marennes-Oléron Bay

---

**ABSTRACT**

The impact of environmental factors on aneuploidy level in the oyster *Crassostrea gigas* was studied with experiments in controlled conditions which exposed adult and juvenile oysters to different pollutants (atrazine, a herbicide, and cadmium, a heavy metal) frequently found in Marennes-Oléron Bay. A positive correlation between atrazine concentration and aneuploidy in *C. gigas* was observed. Moreover, the impact of atrazine on aneuploidy level persisted in time both within and between generations, demonstrating the influence of an environmental pollution on this phenomenon. On the other hand, the aneuploidy level of *C. gigas* was not influenced at the cadmium concentrations tested. Significant differences in aneuploidy levels were observed in oysters originating from the same families on different sites, and in wild oysters collected over time, suggesting that both site and season affect aneuploidy.

---

**MOTS-CLES** *Crassostrea gigas*, aneuploïdie, facteurs environnementaux, atrazine, cadmium, bassin de Marennes-Oléron

---

**KEYWORDS** *Crassostrea gigas*, aneuploidy, environmental factors, atrazine, cadmium, Marennes-Oléron Bay

---

IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

---