

Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,  
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>

**ifremer**

**Direction Centre de Nantes  
Département Biogéochimie et Ecotoxicologie  
Laboratoire Ecotoxicologie**

**Françoise HUBERT-VINCENT**

**R.INT.DCN-BE-EX/2007.01/Nantes**

---

**Diversité génétique et adaptation des espèces  
aquatiques en milieu anthropisé**

**avril 2007**

## Sommaire

<b>Avant propos .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Problématique générale.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Conséquences écologiques des effets génotoxiques :   intérêts de la toxicologie évolutive.....</b>	<b>9</b>
2.1. Effets génotoxiques au niveau individuel .....	9
2.2. Intérêt de la toxicologie évolutive .....	10
<b>3. La variabilité génétique dans les populations naturelles.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Déterminismes de la variabilité dans les populations   naturelles .....</b>	<b>14</b>
4.1. Déterminisme des variations : le polymorphisme .....	15
4.2. Déterminisme épigénétique .....	15
4.3. Déterminisme génétique .....	15
4.4. Du génotype aux phénotypes .....	15
<b>5. Les différentes sources de la variabilité génétique.....</b>	<b>17</b>
5.1. Les mutations.....	17
5.2. La sélection, le coefficient de sélection ou fitness.....	18
5.3. La structuration des populations et les flux géniques.....	19
5.4. La dérive aléatoire des fréquences alléliques.....	20
<b>6. Méthodes d'étude de la variabilité génétique.....</b>	<b>20</b>
6.1. Polymorphisme morphologique .....	20
6.2. Polymorphisme des protéines : les allozymes .....	20
6.3. Polymorphisme de l'ADN : les marqueurs moléculaires.....	22



<b>7. Intérêts des marqueurs de diversité génétique dans la recherche des effets de stress environnementaux sur les populations .....</b>	<b>25</b>
<b>8. Profils génétiques des populations aquatiques et contamination chimique du milieu .....</b>	<b>29</b>
8.1. Altération de la structure génétique de la population : sélection ou adaptation .....	29
8.2. Variabilité génétique : bottleneck.....	31
8.3. Variabilité génétique : mutations .....	31
<b>9. Adaptation génétique ou tolérance?.....</b>	<b>32</b>
9.1. Adaptation génétique .....	32
9.2. Tolérance.....	32
9.3. Coût de la tolérance.....	33
<b>10. Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>11. Références bibliographiques .....</b>	<b>35</b>



## Avant Propos

Cette synthèse servira de base à la réflexion et à l'élaboration d'un projet de recherche dont l'objectif sera de rechercher les effets des polluants chimiques sur les organismes marins en milieu naturel au niveau de la population. Il fait suite aux travaux du laboratoire d'écotoxicologie en génotoxicologie au niveau individuel. Ce rapport rappelle les connaissances de base en génétique des populations et présente quelques études réalisées en France et au niveau international sur les modifications de la diversité génétique et l'adaptation des populations d'espèces aquatiques en milieu anthropisé.

## 1. Problématique générale

Depuis 30 ans la communauté scientifique et les agences d'états accumulent des connaissances sur les effets à long terme des stress environnementaux sur la santé humaine et les écosystèmes. Les changements au niveau de la diversité biologique des populations naturelles, conséquence des activités anthropiques, ont été plus rapides au cours des cinquante dernières années qu'à toute autre période de l'histoire de l'humanité. Les facteurs de changements qui sont responsables de l'appauvrissement de la biodiversité sont constants ou s'intensifient. La transformation des habitats (occupation des sols, modification physique des rivières ou prélèvement de leurs eaux), l'appauvrissement des récifs coralliens, la dégradation des fonds marins par la pêche au chalut de fond, les changements climatiques, les espèces exotiques envahissantes, la surexploitation des espèces et la pollution sont les facteurs les plus importants de l'appauvrissement de la diversité biologique et de la variabilité génétique des populations naturelles ou de l'extinction de certaines espèces (Vitousek *et al.*, 1997).

Parmi les facteurs responsables ou liés étroitement aux modifications des écosystèmes marins et estuariens, nous parlerons ici des contaminants chimiques. Plusieurs classes de contaminants potentiellement toxiques présentent de fortes concentrations en mer et dans les estuaires. Parmi ces contaminants inquiétants on peut citer: certains pesticides organochlorés, les polychlorobiphényles coplanaires (cPCBs), les diphényléthers polychlorés (PBDEs), les polychloro-p-dibenzodioxines et furanes (PCDD/F), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et certains métaux lourds (Cd, Pb, Hg). Des outils d'évaluation des effets de ces substances, appelés biomarqueurs, ont été développés depuis une trentaine d'années. Il s'agit de réponses biologiques indiquant l'exposition ou les effets d'un contaminant dans un organisme. La plupart des biomarqueurs couramment employés, ainsi que ceux en développement, sont des réponses d'intégration biologique au niveau individuel. On peut citer les études de mutagenèse: des effets directs sur le matériel génétique, tels les mutations et les dommages primaires de l'ADN, sont observés chez les organismes marins en milieu contaminé. Ces observations, limitées à l'échelle de l'individu, ne renseignent pas sur les effets à long terme tel que le maintien de la population ou de l'écosystème. Certains auteurs au début des années 2000 ont insisté pour que les recherches aient pour objectif « la compréhension des relations entre les différents niveaux d'organisation biologique » (ex. Adams *et al.*, 2001).

Un nombre limité d'approches existent pour évaluer les effets des contaminants chimiques sur les populations. Il s'agit de monitoring de populations sur le terrain, de modélisation de la dynamique des populations et de génétique des populations. Le monitoring des populations continue à être préféré bien qu'il fournisse des estimations très empiriques sur les effets des contaminants. Les modèles de dynamiques des populations sont de plus en plus utilisés, ils trouvent des applications essentiellement en analyse de risque et, la génétique des populations fournit des informations sur les changements du pool génétique de la population. Ces informations sont le reflet de processus non décelables dans l'approche individuelle. Ces processus ont été nommés « effets indirects » ou « effets émergents » (Bickham & Smolen, 1994 ; Belfiore & Anderson, 1998a-b). Ils sont le résultat de survie différentielle, de l'état de santé et du taux de reproduction des individus, se traduisant à terme par des différences de fitness et une réduction de la taille de la population. Quelques études de terrain montrent des modifications de la diversité génétique associée à un bottleneck (réduction de la taille de la population), des altérations des caractères de traits de vie ou fitness (croissance et reproduction diminuées), de dérive génétique et d'adaptation génétique par la sélection de génotypes tolérants (revue par Belfiore & Anderson, 2001).

La toxicologie évolutive est une approche de choix pour rechercher les effets des contaminants sur les populations. Les modifications de la diversité et de la structure génétique des populations peuvent rendre compte d'effets à long terme de la contamination chimique de l'environnement, cependant il faut rester vigilant car d'autres facteurs peuvent être impliqués. Le défi est de pouvoir faire la distinction entre les facteurs stochastiques et anthropiques.

## 2. Conséquences écologiques des effets génotoxiques: intérêts de la toxicologie évolutive

### 2.1. Effets génotoxiques au niveau individuel

L'IFREMER s'est engagé dans la recherche d'effets mutagènes au début des années 90. C'est un axe de recherche en écotoxicologie pour répondre aux problèmes que posent la présence dans l'environnement marin de nombreuses molécules classées mutagènes ou cancérigènes pour l'homme ou l'animal de laboratoire. Ces recherches sont rendues difficiles si on privilégie l'approche terrain, l'approche expérimentale étant plus adaptée. Parmi les propositions faites en 1992 à l'élaboration du projet, c'est l'approche terrain qui avait été retenue. Pour cela nous avons développé l'épidémiologie moléculaire du cancer pour deux espèces de poissons, le flet et le dragonet, afin d'évaluer la population atteinte de néoplasies et de valider les biomarqueurs de mutagenèse développés au laboratoire d'écotoxicologie (gènes ras et p53). Les résultats obtenus sont les suivants : les mutations du gène ras dans deux hyperplasies hépatiques de dragonet dans l'estuaire de la Seine sont corrélées à la bioaccumulation des PCB les plus toxiques et aux taux d'adduits à l'ADN dans le foie, adduits probablement liés aux HAP (Vincent *et al.*, 1998). Chez le flet, le gène p53 est muté dans une hyperplasie (flet de Mer Baltique) mais aucune mutation n'a été observée sur le gène ras2 (Cachot *et al.*, 1999; Vincent-Hubert, 2000).

- En comparant nos résultats à ceux de la littérature, on constate que le nombre de tumeurs disponibles et analysées jusqu'à ce jour chez les poissons marins, quelque soit l'espèce, est limité. Il est donc prématuré d'envisager que les mutations sur les gènes Ki-ras et p53 soient dépendantes de l'espèce ou de mutagènes de l'environnement. Cependant, les résultats obtenus sont prometteurs quant à l'intérêt de ras et p53 comme marqueur précoce de cancérogenèse.
- Il faut souligner que la faible fréquence de préneoplasies et l'absence de néoplasie sont observées dans un échantillonnage : cette fréquence observée ne reflète pas forcément la fréquence réelle de tumeurs. Comparées aux fréquences réelles de néoplasies hépatiques de la population humaine, les fréquences réelles de néoplasies hépatiques dans la population de poissons marins est probablement loin d'être négligeable. Pour cette raison, il conviendrait de continuer le suivi des pathologies tumorales.
- L'approche biomarqueur renseigne sur les altérations génotoxiques survenant dans quelques cellules et pour seulement quelques individus; en conséquence ces observations n'apporte pas de signification quant à l'impact de contaminants génotoxiques sur la population ou l'écosystème.
- Etant donné la difficulté à mettre en évidence des effets mutagènes lors d'études de terrain, la plupart des travaux en cours sont axés sur la recherche d'effets génotoxiques précoces et sur la caractérisation du potentiel génotoxique et mutagène de l'environnement. Le travail que nous avons réalisé dans le Programme Seine Aval en 1998 a montré le caractère mutagène (test d'Ames) et génotoxique (test comète) de l'eau dans la partie amont de l'estuaire de la Seine. Ce protocole développé pour la première fois dans un estuaire français présente un intérêt évident dans les études environnementales. Puisque l'environnement présente un caractère mutagène, ces résultats soulignent encore une fois les limites des études de terrain dans l'étude épidémiologique.
- D'autres effets, autres que génotoxiques, sont à prendre en compte en écotoxicologie: l'immunotoxicité et la reprotoxicité. Le premier est en lien direct avec les pathologies des espèces sauvages, phénomènes que nous avons observés dans l'estuaire de la Seine chez le flet (Burgeot *et al.*, 1999). Le deuxième est important pour le maintien des populations, mais difficile à observer dans les

études de terrain, à moins d'être en situation de pollution accidentelle ou face à des toxiques spécifiques en condition expérimentale (biocides ou perturbateurs endocriniens par exemple).

- Les travaux de recherches effectués au niveau international montrent que les effets génotoxiques des polluants sont différents chez les vertébrés et chez les invertébrés marins. Chez les invertébrés marins, la formation d'adduits est moins fréquente et la fréquence de néoplasies est en général faible. Depledge (1998) considère que des manifestations phénotypiques autres que les néoplasies sont probablement plus inquiétantes. C'est le cas du «syndrome de la maladie génotoxique» décrit par Kurelec (1993), qui se caractérise par des désordres enzymatiques associés à des altérations physiologiques graves (inhibition de croissance, immunodéficience, diminution de fécondité, vieillissement prématuré). Ces effets, semblables à ceux observés lors de cytotoxicité directe d'agents chimiques, vont perturber fortement le maintien des populations d'invertébrés.

## 2.2. Intérêts de la toxicologie évolutive

On sait depuis longtemps que l'apparition de populations résistantes sur des sites contaminés est le résultat de pressions sélectives qui favorisent certains génotypes plus que d'autres. Il s'agit là d'un mécanisme important par lequel la constitution génétique d'une espèce peut être modifiée; cette thématique à l'origine propre à la génétique des populations, rentre dans le domaine de la toxicologie évolutive (écotoxicologie génétique ou écogénotoxicologie).

D'autre part, on sait que des modifications de l'hétérozygotie des populations de végétaux et d'animaux peuvent être liées à des stress environnementaux. Les conséquences écologiques à long terme ne sont pas connues mais la diminution de diversité génétique peut conduire à une diminution de la fitness (Figure 1), une augmentation de la consanguinité et en théorie seulement, à l'extinction de l'espèce (Lynch *et al.*, 1995; Bickham *et al.*, 2000).

Certains auteurs suggèrent que l'apparition de mutations est une conséquence de l'exposition aux contaminants. Ils spéculent sur les effets à long terme de ce fardeau de mutations (Kondrashov, 1995). Cependant il n'existe pas de démonstration allant dans ce sens, à l'exception peut-être des populations de petite taille (Lynch *et al.*, 1995).

Depuis la fin des années 90, les recherches se recentrent sur l'étude des paramètres de fitness et des génotypes. C'est une préoccupation majeure au niveau international des écotoxicologues qui rejoint celles des écologistes pour le maintien à long terme de la santé des écosystèmes. Les objectifs du millénaire pour le développement sont fixés à 2015. L'objectif de 2010 consiste à réduire la perte de diversité biologique. Des efforts sans précédent seraient nécessaires pour réaliser, d'ici 2010, une réduction appréciable du rythme de perte de la diversité biologique. (UEC direction).

Partant de ce constat, il faut situer notre problème dans son contexte qu'est celui de la diversité génétique et de l'adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropisé. L'énigme de la diversité génotypes-phénotypes et de l'évolution de la diversité des gènes, génomes et phénomènes a été revue par Nevo (Nevo, 2001). Dans ces programmes, 1200 espèces ont été étudiées, des bactéries aux mammifères, quant à l'évolution de la biodiversité des gènes, génomes, phénomènes et leurs interactions avec des variables spatio-temporelles et des stress environnementaux. Il ressort de ces travaux qu'il existe une abondante diversité génotypique et phénotypique dans la nature. L'organisation, l'évolution moléculaire et la diversité des organismes, à l'échelle planétaire, régionale et locale sont structurées; elles montrent des régularités tout au long de la vie et sont corrélées positivement avec une hétérogénéité environnementale abiotique et biotique et des facteurs de stress. L'évolution de la diversité

génétique, même pour des populations isolées et de faible effectif, est d'abord régit par les événements déterministes et stochastiques.

Notre problématique est de rechercher les modifications de la diversité génétique dans les populations exposées chroniquement à des contaminants chimiques. Les questions qui se posent sont les suivantes:

- Existe-t-il un processus d'adaptation lors de tels stress environnementaux? Quelle est l'origine de l'évolution de cette adaptation? Quelles sont les conséquences pour la fitness de la population?
- Un stress environnemental ancien peut-il modifier la diversité génétique de la population? quelle force est à l'origine de cette modification ?

Dans ce document, nous présenterons dans un premier temps des rappels de génétique. Ensuite nous présenterons quelques résultats d'études des effets de la contamination chimique sur des populations d'espèces aquatiques animales et les intérêts des marqueurs de diversité génétique dans notre problématique.

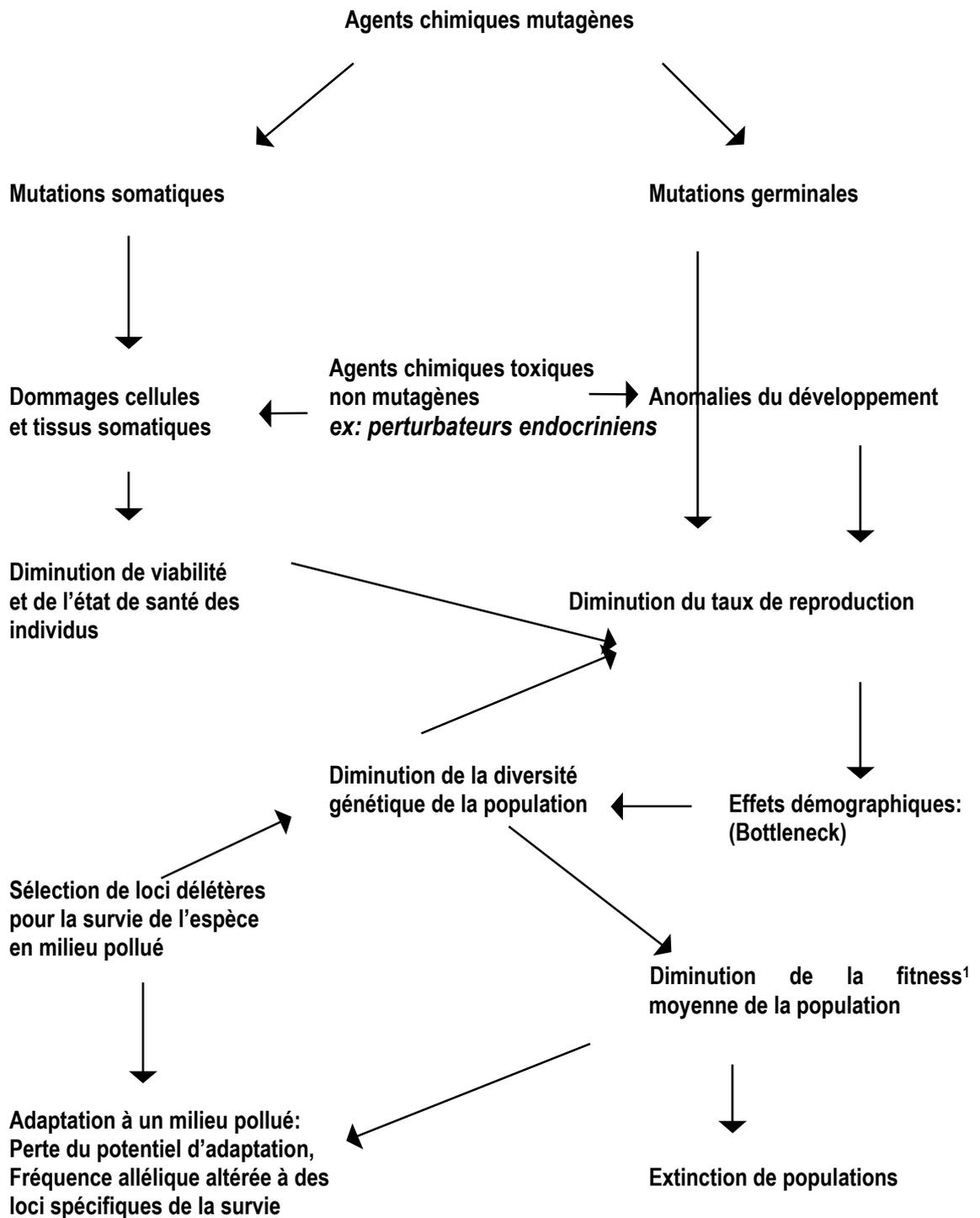


Figure 1 : Modèle pour illustrer les relations entre la contamination chimique de l'environnement et la diminution de diversité génétique des populations (d'après Bicham *et al.*, 2000).

Le modèle illustre comment des mutagènes et des non-mutagènes présents dans l'environnement altèrent le taux de reproduction des individus par des altérations du matériel génétique (dommages transmissibles) et des altérations des tissus somatiques. Une diminution du taux de reproduction peut conduire à la diminution de diversité génétique de la population, à la diminution de fitness et à l'extinction de la population.

<sup>1</sup>altérations de croissance, du niveau de reproduction, de la survie des descendants

### 3. La variabilité génétique dans les populations naturelles

La théorie de Darwin repose sur l'observation de la diversité des êtres vivants et de sa relation avec la variabilité géographique. Elle met aussi en évidence l'importance de l'environnement dans la reproduction et la survie. La génétique initiée ensuite par Gregor Mendel avait pour objectif de comprendre le déterminisme et la transmission des caractères par l'analyse de la descendance d'un croisement contrôlé entre individus de génotypes différents. Il établit les premières lois de l'hérédité et les publie en 1866. Elles mettent en évidence les bases de l'hérédité des variations qui manquaient à Darwin. Ce sont les travaux de Morgan en 1915, sur la drosophile, qui conduisent au développement de la théorie chromosomique de l'hérédité. Les gènes sont alors localisés sur les chromosomes. Les travaux d'identification du support de l'hérédité ont commencé en 1928 avec Griffith et se sont achevés avec la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick en 1953. La génétique moléculaire continue à rechercher les mécanismes fins du déterminisme, de l'expression et de la transmission des caractères. Elle trouve aujourd'hui de nombreuses extensions avec les programmes de génomique (séquençage des génomes et identification des gènes) et de protéomique (inventaire et fonctions des protéines d'un organisme). La compréhension du déterminisme et de la transmission des caractères doit aussi étudier les individus dans les conditions naturelles où ils sont génétiquement uniques et libres de se reproduire avec n'importe quel autre individu de la même espèce. Cette partie de la génétique, qui considère les individus en interaction avec leur environnement, est la génétique des populations.

La génétique des populations a été initiée dans les années 1920 à 1940 par R.A. Fisher, J.B.S. Haldane et S. Wright pour comprendre les mécanismes génétiques de l'évolution des espèces ou microévolution. Ces auteurs ont surtout réalisé des travaux théoriques pour comprendre comment les lois de Mendel pouvaient s'appliquer à l'échelle des populations. La génétique des populations, qui a permis de faire la synthèse entre la théorie Darwinienne de l'Evolution et les travaux de Mendel, est à l'origine de la théorie synthétique de l'Evolution ou Néodarwinisme. Elle a notamment permis de démontrer que l'évolution des espèces associe à la fois sélection naturelle et hasard (facteurs stochastiques) comme moteurs de l'évolution des espèces. L'application de ces principes aux populations naturelles permet de comprendre les phénomènes d'adaptation des espèces à leur environnement et d'identifier les mécanismes génétiques à l'origine de nouvelles espèces ou spéciation.

La génétique des populations étudie la variabilité génétique présente dans et entre les populations avec trois objectifs principaux :

1. mesurer la variabilité génétique, appelée aussi diversité génétique, par la fréquence des différents allèles d'un même gène ;
2. comprendre comment la variabilité génétique se transmet d'une génération à l'autre ;
3. comprendre comment et pourquoi la variabilité génétique évolue au fil des générations.

Si la génétique mendélienne se base sur des croisements contrôlés par un expérimentateur, la génétique des populations étudie les proportions des génotypes au sein d'un ensemble d'individus issus de croisements non contrôlés entre de nombreux parents. C'est donc une application des principes de base de la génétique mendélienne à l'échelle des populations.

On définit une [population](#) comme étant l'ensemble des individus de la même espèce qui ont la possibilité d'interagir entre eux au moment de la reproduction. La notion de population fait donc appel à des critères d'ordres spatiaux, temporels et génétiques et résulte du fait que les individus d'une même espèce n'ont pas tous la possibilité de se rencontrer et de se croiser à cause de l'éloignement géographique et de l'hétérogénéité de l'habitat. La population représente une communauté génétique constituée par l'ensemble des génotypes des individus qui la

composent. Elle se caractérise donc par un génome collectif ou patrimoine génétique, appelé aussi pool génétique qui est la somme des génotypes individuels pour chacun des gènes. Le pool génétique d'une population présente une continuité à travers les générations et peut varier au cours du temps. C'est cette évolution que la génétique des populations cherche à comprendre. La génétique des populations est donc centrale pour la conservation des espèces en voie de disparition au point de prendre le nom de génétique de la conservation. La disparition de certaines espèces n'est pas uniquement un problème de taille de population mais elle est aussi en partie la conséquence de leur faible diversité génétique (Figure 2).

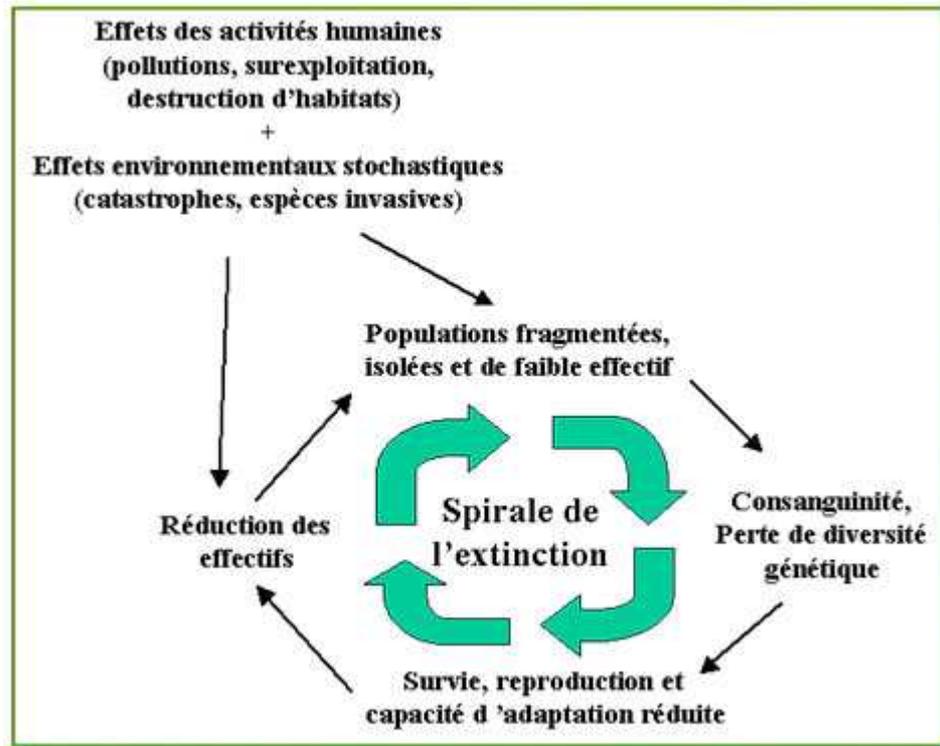


Figure 2 : Facteurs modifiant la diversité génétique.

#### 4. Déterminismes de la variabilité dans les populations naturelles

Une particularité du monde vivant est la variabilité des phénotypes individuels. À l'intérieur d'une espèce, il n'existe pas deux individus ayant exactement les mêmes caractéristiques phénotypiques: l'individu est unique. Si pour une espèce donnée on peut noter l'absence de variations pour certains caractères essentiels, il existe toujours de nombreux autres caractères pour lesquels des variations entre individus sont observées. Certaines de ces variations s'expriment au niveau phénotypique (morphologie, physiologie, comportement, etc) mais les autres restent "cachées" et leur mise en évidence nécessite l'utilisation de techniques adaptées (variabilité des protéines ou des séquences d'ADN). On considère que les variations du phénotype sont dues pour partie à des facteurs environnementaux (alimentation, climat, interactions avec les autres espèces, etc...) et pour partie à des différences entre les génotypes individuels, transmissibles à la descendance. Dans la plupart des cas, ces deux causes de variation interagissent fortement (interactions génotype-environnement), et il est difficile de mesurer leur part relative dans la variation phénotypique globale. La mise en évidence du déterminisme génétique des variations nécessite des études faisant appel soit à des expériences

de croisements, soit à des analyses de généalogie, soit, pour les caractères complexes déterminés par plusieurs gènes, à des comparaisons entre individus apparentés et non apparentés à l'aide de méthodes statistiques qui sont du domaine de la génétique quantitative.

#### 4.1. Déterminisme des variations : notion de polymorphisme

La génétique des populations s'intéresse principalement à la variabilité d'origine génétique présente dans les populations et que l'on désigne sous le nom de polymorphisme. L'utilisation de plus en plus répandue des techniques de biologie moléculaire permettant d'étudier la variabilité non exprimée au niveau phénotypique (portion non codante de l'ADN) a nécessité une définition plus large du polymorphisme définie par Ford dans les années 40 qui peut être la suivante : il y a polymorphisme si dans une même population une portion codante ou non codante d'ADN présente une variation de séquence correspondant à plusieurs formes alléliques dont la plus fréquente ne représente pas plus d'une certaine fraction de la population totale, fixée à 95 ou 99%. Par opposition, on appelle monomorphes les gènes qui ne présentent pas de variabilité (un seul allèle présent dans la population).

#### 4.2. Déterminisme épigénétique

Lorsque la variabilité d'un caractère n'a aucune base génétique, elle est qualifiée de variabilité épigénétique. Cette variabilité résulte souvent de l'action des facteurs environnementaux sur l'expression phénotypique d'un caractère (température, alimentation, physico-chimie de l'environnement, etc...). Dans certains cas, cette variabilité épigénétique peut être héritable et donc transmise à la descendance. On parle d'hérédité épigénétique. C'est le cas par exemple des effets maternels qui apparaissent lorsque l'environnement subi par les parents, souvent la mère, a des conséquences sur les caractéristiques des descendants par le biais d'enzymes, protéines, hormones ou d'ARNm transmis à la descendance via le cytoplasme des ovocytes ou pendant le développement embryonnaire précoce. La voie cytoplasmique peut être également un mode de transmission de nombreux microorganismes intracellulaires (bactéries, virus) appelés symbiotes qui peuvent être responsables d'importantes variations phénotypiques dans les populations naturelles de leurs hôtes.

#### 4.3. Déterminisme génétique

La variabilité d'un caractère est déterminée génétiquement lorsqu'elle est due, au moins en partie, à la présence de plusieurs formes alléliques dans la population. Dans certains cas, la variabilité phénotypique est due à la variation d'un seul gène, on parle de déterminisme monogénique. Cela ne veut pas dire que le caractère est contrôlé par un seul gène mais que la variation d'un seul de ces gènes est suffisante pour entraîner une variation phénotypique. On parle alors de caractères mendéliens. Chez l'homme, environ 5000 caractères mendéliens sont connus. Dans d'autres cas, la variabilité d'un caractère est déterminée par un grand nombre de gènes ayant chacun plusieurs allèles, on parle alors de déterminisme polygénique. C'est le cas de tous les caractères quantitatifs qui font l'objet d'une mesure comme la taille, le poids, etc. L'analyse génétique de ces caractères relève de la génétique quantitative qui sépare les effets des gènes en effets additifs, effets de dominance, effet d'épistasie ou d'interaction entre gènes.

#### 4.4. Du génotype aux phénotypes

L'expression phénotypique d'un génotype dépend des conditions environnementales dans lesquelles se sont développés les individus. Pour la plupart des caractères, le phénotype résulte des effets conjoints de 3 composantes, le génotype G, l'environnement E qui contribue toujours

pour une part au phénotype et l'interaction entre le génotype et l'environnement  $I_{G \times E}$ . Ceci est résumé dans une formulation additive:  $P = G + E + I_{G \times E}$

Cette interaction entre le génotype et l'environnement est très importante car elle signifie que l'expression d'un gène n'est pas indépendante du milieu dans lequel ce gène s'exprime. Une même mutation peut donc avoir des effets phénotypiques différents.

Il est possible chez certains organismes d'étudier la variabilité de l'expression phénotypique d'un même génotype appelée plasticité phénotypique qui est mesurée par sa norme de réaction. On définit la norme de réaction d'un génotype comme étant la gamme des phénotypes produits par un même génotype lorsque celui-ci est soumis à des conditions environnementales différentes. Pour un même caractère, la forme de la norme de réaction peut être variable entre génotypes ce qui est la conséquence des interactions génotype-environnement. On peut représenter ces interactions par 3 types de graphes où sont tracées les normes de réactions de deux génotypes G1 et G2:

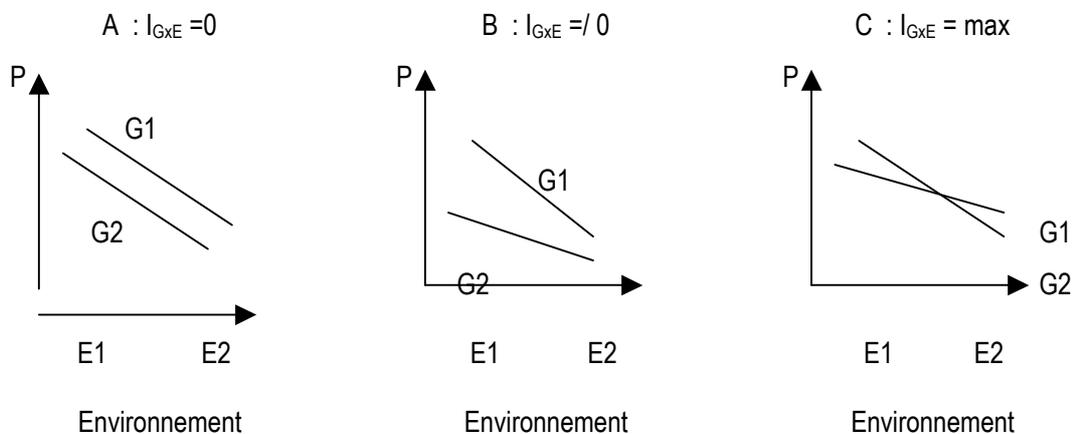


Figure 3 : Corrélation phénotype et environnement.

P: Phénotype, E: Environnement

- Le graphe A représente l'absence d'interaction GxE. Les 2 génotypes répondent de la même façon aux variations de l'environnement. Cela n'empêche pas un effet de l'environnement sur l'expression phénotypique du caractère, qui est représenté par la pente des droites.
- Le graphe B représente l'existence d'interaction GxE. La différence entre les 2 génotypes est plus importante dans l'environnement E1 que dans l'environnement E2. Le génotype G1 a cependant toujours une plus forte valeur du caractère quel que soit l'environnement considéré.
- Le graphe C représente une interaction GxE maximale. Il y a inversion des valeurs phénotypiques des 2 génotypes entre les environnements E1 et E2. Le génotype G1 a une plus forte valeur du caractère dans l'environnement E2 alors que c'est l'inverse dans l'environnement E1. Il faut noter qu'il existe des conditions environnementales particulières où la variabilité génétique ne s'exprime pas au niveau phénotypique (point d'intersection des droites).

## 5. Les différentes sources de variabilité génétique dans les populations

La diversité génétique répond aux changements dans l'environnement par les actions de la sélection, de la dérive génétique, du flux génique et des mutations.

### 5.1. Les mutations

La variabilité génétique peut être le résultat de mutations qui font apparaître de nouveaux allèles, auxquelles il faut ajouter les phénomènes de recombinaison, notamment pour les caractères quantitatifs. Les mutations peuvent affecter une portion plus ou moins grande d'ADN et, en fonction de leur localisation dans le génome, peuvent avoir ou non des effets phénotypiques. Il existe ainsi tous les intermédiaires entre les mutations neutres qui n'ont aucun effet sur l'organisme et les mutations létales, qui réduisent l'espérance de vie des individus. Il existe différents types moléculaires de mutations qui n'ont pas les mêmes conséquences phénotypiques :

- **les mutations ponctuelles** sont des modifications d'un nucléotide ou d'un faible nombre de nucléotides qui créent de nouveaux allèles. Il faut distinguer : *les insertions* de nucléotides qui, lorsqu'elles se produisent dans une portion codante de l'ADN, décalent le cadre de lecture et conduisent à une protéine anormale, *les délétions* de nucléotides qui ont les mêmes effets que les insertions, *les substitutions* d'une base par une autre qui peuvent être des transitions (remplacement purine/purine de A avec G ou pyrimidine/pyrimidine de C avec T) ou plus rarement des transversions (remplacement purine/pyrimidine). Les substitutions en 3<sup>ème</sup> position des codons sont silencieuses ou synonymes alors que la plupart des substitutions en position 1 et 2 des codons se traduisent par un remplacement d'acide aminé (non synonymes)
- **les remaniements chromosomiques** sont des modifications dans la structure des chromosomes. Les changements concernent un fragment chromosomique dont la taille peut correspondre à un, une partie ou plusieurs gènes; ces changements sont très défavorables. Les différents types sont: *les duplications* défavorables lorsqu'elles se produisent à l'intérieur d'un gène mais qui peuvent augmenter le nombre de copies d'un gène, *les inversions* qui correspondent à un changement d'orientation d'un fragment chromosomique et qui modifient l'ordre des gènes, *les délétions* qui sont des pertes d'un fragment chromosomique ayant le plus souvent des effets létaux et *les translocations* qui correspondent à des échanges de fragments entre chromosomes.
- **les changements du nombre de chromosomes** sont de deux types: *l'aneuploidie* : perte ou ajout d'un ou plusieurs chromosomes et *la polyploidie* : changement du nombre d'exemplaire du lot haploïde (passage diploïde = 2N à tétraploïde= 4N).

Cependant, les taux de mutation sont très faibles (de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$ ) et la répétition des mutations à chaque génération ne modifie que très lentement les fréquences de ces allèles. A une échelle de temps de quelques dizaines à quelques centaines de générations, l'effet des mutations sur l'évolution des fréquences alléliques est donc négligeable.

Les mutations observées chez les organismes aquatiques sont de type somatiques, elles ne sont donc pas transmises mais elles peuvent être à l'origine de pathologie tumorale. Leur fréquence est très faible et l'agent causal est généralement difficile à identifier, on parle alors de facteurs de risque. On peut citer le cas du B[a]P, agent mutagène associé au développement tumoral chez le poisson et les vertébrés supérieurs. Chez l'homme, il induit des mutations sur le gène p53; ces mutations ont un rôle dans le développement tumoral (Hollstein *et al.*, 1991).

## 5.2. La sélection, le coefficient de sélection ou fitness

La sélection naturelle est le concept de base de la théorie Darwinienne de l'évolution. Selon Charles Darwin, les individus les mieux adaptés à un environnement, sont les plus aptes à survivre et à se reproduire dans cet environnement. Ils transmettront mieux leurs gènes à la génération suivante. Cette participation différentielle des génotypes va modifier la fréquence des allèles impliqués et donc faire évoluer la structure génétique des populations au cours des générations, il s'agit de microévolution. Ce "tri" des "meilleurs" génotypes sur la base de leur valeur phénotypique a pour résultat une meilleure adaptation des populations à leur environnement puisque les allèles défavorables sont indirectement éliminés par sélection, les individus qui les portent se reproduisant moins bien ou pas du tout.

C'est le même principe de sélection artificielle qui a permis d'améliorer de nombreuses caractéristiques d'espèces animales ou végétales ayant une importance économique (production en graines, en lait, teneur en lipides,...). Dans ce cas, la sélection artificielle correspond à une différence de succès reproductif consécutive à un choix des individus reproducteurs effectué par l'homme.

On a établi différents modèles: le modèle génique où la valeur sélective des hétérozygotes est exactement intermédiaire entre celles des homozygotes, le modèle avec avantage des hétérozygotes : découvert par Fisher il offre une explication possible au polymorphisme des populations. Cette force évolutive conduit à une meilleure adaptation des organismes à l'hétérogénéité de l'environnement. Chez certaines espèces à durée de vie courte, les effets de la sélection sur la structure génétique des populations peuvent être rapides et observables à l'échelle d'une vie humaine. La contamination chimique de l'environnement constitue une force sélective capable d'éliminer les génotypes sensibles aux effets toxiques en induisant des changements adaptatifs rapides. Les effets de la sélection sont donc à considérer en écotoxicologie, ils peuvent concerner des changements génétiques au niveau d'un ou de multiples loci, résultant de la sélection d'allèles spécifiques, comme par exemple l'amplification d'un gène esterase responsable de la résistance aux insecticides chez le moustique (Mouche *et al.*, 1986), duplications du gène de la metallothionéine et tolérance au métaux -cadmium, cuivre- dans la population naturelle de *Drosophile Drosophila melanogaster* (Maroni *et al.*, 1987)

Le théorème de Fisher prévoit que l'adaptation d'une population à son environnement ne peut qu'augmenter au cours du temps sous l'action de la sélection naturelle et que cette augmentation est d'autant plus rapide que la variabilité génétique de la population est importante. La sélection naturelle éliminant les allèles défavorables, les populations devraient donc être plutôt monomorphes pour l'allèle le plus favorable dans un environnement donné, ce qui semble contradictoire avec la forte variabilité génétique observée dans la nature. L'analyse des conséquences de la sélection sur la composition génotypique des populations permet de comprendre pourquoi la composition génétique des populations n'est pas toujours optimale et comment le polymorphisme se maintient dans les populations naturelles.

### ○ Valeur sélective ou fitness

Lorsque les individus de génotypes différents montrent une viabilité ou une fécondité différente, chaque génotype est alors caractérisé par sa performance, c'est-à-dire sa capacité à participer à la génération suivante. Cette mesure est appelée valeur sélective ou fitness ou encore valeur adaptative.

La valeur sélective d'un génotype dépend principalement de sa survie entre le stade zygote et le stade adulte, et de sa fertilité (nombre de descendants viables capables de se reproduire). Ces deux paramètres déterminent le nombre de descendants produits en moyenne par cette catégorie génotypique. Une définition simple de la fitness peut donc être donnée par la formule :  $\text{Fitness} = \text{Survie} \times \text{Fécondité}$ .

Cette notion de fitness est très importante mais elle est difficile à mesurer car elle dépend de nombreuses caractéristiques individuelles et environnementales. La fitness d'un individu dépend en effet :

1. de la composition génétique à l'ensemble des loci. Il faut tenir compte du fait qu'un même gène affecte simultanément plusieurs caractères = effets pléiotropes et que les allèles des différents gènes interagissent entre eux = épistasie. Des phénomènes de compensation entre caractères peuvent donc exister.
2. des conditions environnementales. Un génotype peut être avantagé dans certains environnements alors qu'il sera désavantagé dans d'autres conditions (interaction génotype-environnement). La fitness d'un génotype varie donc d'une population à une autre et peut varier au cours de sa vie ou de génération en génération en raison des changements de l'environnement.
3. de la composition génétique de la population à laquelle appartient cet individu. La fitness d'un individu pourra en effet être soit faible soit élevée en fonction de la présence des autres génotypes de la population.

Finalement, de très nombreux caractères contribuent à la fitness d'un génotype (physiologiques mais aussi comportementaux, morphologiques etc.). C'est par exemple la capacité des mâles à trouver un partenaire sexuel ou la capacité des individus à élever leur descendance dans des conditions qui permettent leur survie et une fécondité optimale. La mesure directe de la fitness d'un génotype est difficile voire impossible. La fitness est donc mesurée de façon indirecte à partir des variations de la fréquence des allèles observées entre générations successives.

### 5.3. La structuration des populations et les flux géniques

Dans la nature, les populations d'une même espèce ne sont pas génétiquement isolées. Il se produit à chaque génération des échanges d'adultes, mais aussi d'embryons ou de gamètes, pour les animaux aquatiques, qui sont autant d'échanges de gènes, appelés flux géniques. Ces flux géniques sont généralement d'autant plus importants que les populations sont proches géographiquement. C'est le cas lorsqu'une population est subdivisée en sous-populations à cause d'une discontinuité de l'habitat ou des ressources. Ces échanges de gènes provoqués par la dispersion des individus entre sous-populations limitent alors leur divergence génétique. Les conséquences génétiques de ces phénomènes migratoires dépendent de l'organisation spatiale des populations, de la taille des populations et des nombreux facteurs environnementaux responsables de leur dispersion. La pollution chimique peut affecter les déplacements des organismes dans leur milieu en déclenchant des comportements de fuite, modifiant la distribution des espèces et leur abondance dans le milieu.

Le flux génique peut être considéré à la fois comme une force qui favorise et qui limite l'évolution. L'apport de nouveaux gènes dans une population peut limiter les effets de la consanguinité et aider au maintien de la diversité génétique essentielle à la conservation du potentiel adaptatif. Le processus de recolonisation de sites contaminés par des invasions de populations provenant de zones adjacentes moins polluées a permis de retrouver un niveau de diversité génétique important chez le dogwhelk après une pollution importante par le TBT (Colson & Hughes, 2004).

## 5.4. La dérive génétique

La variabilité génétique au sein des populations naturelles est influencée par des événements déterministes (mutations, sélection, flux géniques) et par des événements stochastiques telle que la dérive génétique. Il s'agit de fluctuations aléatoires des fréquences d'allèles à chaque génération résultant de la taille des populations et du nombre de générations. La fluctuation de la fréquence des allèles avec le temps devient non négligeable si la taille de la population est petite ou si le nombre de générations est important.

Tout événement naturel ou anthropique affectant la taille des populations et favorisant leur isolement peut modifier rapidement la dérive génétique et conduire à l'appauvrissement génétique des populations. Il s'ensuit une augmentation de la consanguinité et l'expression de mutations délétères récessives. L'expression du fardeau de mutations mène à une diminution de la fitness des individus consanguins appelé dépression de consanguinité.

Plusieurs études montrent une corrélation négative entre viabilité et consanguinité comme par exemple chez l'huître (Bierne *et al.*, 1998). Si une réduction importante de la taille de la population intervient, on observera une diminution de la diversité génétique; ce phénomène persiste dans le temps et peut être encore visible après restauration de l'habitat ou au contraire, la diversité génétique peut être restauré par recolonisation (Colson & Hughes, 2004).

## 6. Méthodes d'étude de la variabilité génétique

Historiquement, la recherche de variations génétiques dans les populations naturelles a concerné des caractères directement accessibles à l'observateur (morphologie, couleur, etc). Le développement des techniques de biochimie, cytogénétique et de biologie moléculaire a permis d'étudier la variabilité génétique à des échelles plus fines, jusqu'au niveau de la séquence d'ADN, permettant même l'étude du polymorphisme des régions non codantes.

### 6.1. Polymorphisme morphologique

C'est le polymorphisme de taille, de forme, de couleur etc. La variabilité génétique de la couleur de certaines espèces, appelée polychromatisme, est certainement l'un des polymorphisme qui a été le plus étudié. Un exemple célèbre est la variation de la couleur et de l'ornementation de la coquille de l'escargot du genre *Cepaea*. En un même endroit coexistent plusieurs formes phénotypiques déterminées par plusieurs gènes polymorphes: des escargots à coquille rose, jaune ou brune, et des escargots sans bande et avec bandes dont le nombre varie entre 1 et 5.

### 6.2. Polymorphisme des protéines: les allozymes

Depuis les années 1960, la variabilité des protéines est étudiée par électrophorèse. Les protéines sont des molécules chargées qui se déplacent dans un support poreux (gel d'agarose, d'amidon, de polyacrylamide, d'acétate de cellulose) lorsque celui-ci est soumis à un champ électrique.

La vitesse de migration dépend de la charge globale de la protéine, de sa taille et de sa conformation. Toute mutation dans la séquence d'un gène codant pour une protéine peut modifier le sens d'un codon, altérer la séquence d'acides aminés donc la charge électrique de la protéine et sa vitesse de migration. Ce changement de structure primaire peut être détecté par électrophorèse qui sépare les variants protéiques ayant des vitesses de migration différentes appelées souvent F (fast) et S (slow).

La mise en évidence de différents allèles d'un même gène est possible pour les enzymes grâce à la spécificité de la réaction enzyme-substrat visualisée par une réaction colorée. L'existence de variations génétiques à un locus donné est détectée par la présence de différents

niveaux de migration dans le gel d'électrophorèse, qui sont associés à des allèles différents appelés allozymes (Figure 4).

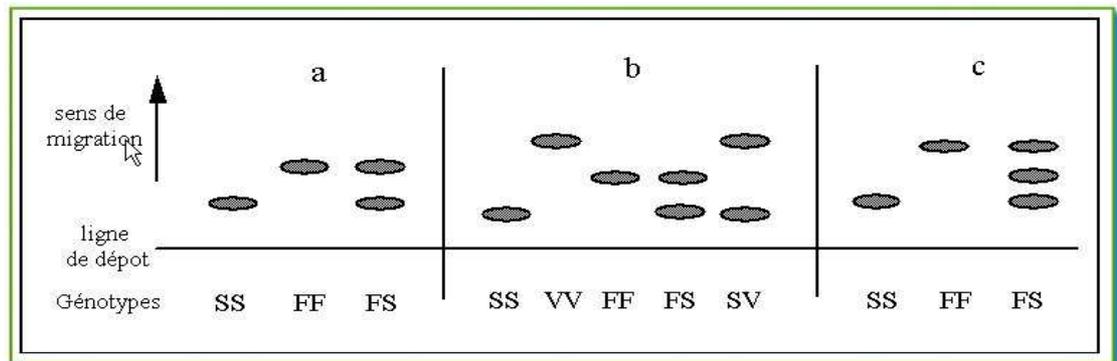


Figure 4 : Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse pour différents systèmes génétiques.

- a) cas d'une protéine monomérique codée par un gène à deux allèles (F = Fast et S = Slow);
- b) cas d'une protéine monomérique codée par un gène à trois allèles (V = very Fast, F = Fast et S = Slow);
- c) cas d'une protéine dimérique codée par un gène à deux allèles (F = Fast et S = Slow) ou les hétérozygotes sont représentés par 3 bandes.

L'utilisation intensive des techniques d'étude des allozymes dans les dernières décennies a montré un niveau élevé de variation génétique dans les populations naturelles et une corrélation entre les changements génétiques et les facteurs environnementaux (Nevo, 1993; Hummel, 1995). Les allozymes sont utilisés comme marqueurs neutres. Ce sont des protéines connues pour leur rôle physiologique fondamental dont il est peu probable que les variants soient sélectivement différents.

L'étude d'un lot d'individus permet d'identifier les génotypes individuels à plusieurs loci lorsque les enzymes ont des niveaux de migration différents. Les allèles sont en effet codominants et chaque individu est caractérisé par la position et le nombre de bandes pour chaque locus étudié. Pour une enzyme monomérique, les homozygotes seront caractérisés par une seule bande alors que les hétérozygotes présenteront 2 bandes. Pour les enzymes plus complexes (dimères, tétramères), le nombre de bandes se multiplie et la lecture des gels d'électrophorèses devient plus difficile. C'est le cas par exemple de l'alcool déshydrogénase (ADH) et de l'alpha glycérophosphate déshydrogénase (GPDH) qui sont toutes les deux des enzymes dimériques et polymorphes chez la *Drosophile*.

La diversité de la plupart des isozymes et des allozymes dans les populations naturelles est apparemment maintenue par une sorte de sélection naturelle. Les allozymes les plus souvent étudiées sont: Alcool déshydrogénase, Aspartate aminotransferase, Glucose-6-phosphate isomerase, Isocitrate dehydrogenase, Mannose-6-phosphate isomerase, et la Phosphoglucomutase .

### 6.3. Polymorphisme de l'ADN : les marqueurs biologiques

Pour répondre aux problèmes de la diversité dans le génome, il n'est pas suffisant de mesurer la diversité enzymatique. Les techniques issues de la biologie moléculaire permettent de rechercher des variations dans les séquences nucléotidiques de l'ADN (codant et non codant). Ces techniques sont de plus en plus utilisées pour étudier le fonctionnement génétique des populations. Cette variabilité peut être recherchée dans des régions codantes de l'ADN et non codantes qui composent la grande majorité des génomes (ADN non codant = 95% de l'ADN total des eucaryotes). Cette variabilité, qui n'est généralement pas exprimée au niveau phénotypique, est utilisée pour définir des marqueurs permettant soit de caractériser des individus (empreinte génétique ou finger print), soit de caractériser des populations, soit de cartographier des gènes. D'après Nevo, les estimations de la diversité moléculaire des microsatellites (short sequence repeats or SSR), des single nucleotide polymorphism (SNP) et les comparaisons de séquences sont nettement plus fortes que la diversité enzymatique (Nevo, 2001).

Parmi l'ensemble des techniques disponibles, il faut distinguer celles qui permettent de mettre en évidence une variabilité dispersée dans tout le génome. Les marqueurs révélés sont alors multilocus et dominants. D'autres techniques permettent de révéler une variabilité à des endroits plus limités du génome. Les marqueurs sont qualifiés de monolocus et souvent codominants.

Il faut également distinguer parmi ces techniques celles qui nécessitent uniquement une extraction de l'ADN des individus étudiés de celles qui nécessitent une amplification *in vitro* d'une portion définie d'ADN par PCR (polymerase chain reaction). Les principaux marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations sont les suivants:

#### **Polymorphisme RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism)**

Après extraction, l'ADN est soumis à une ou plusieurs enzymes de restriction qui coupent la molécule à des endroits précis, définis par une séquence de bases, appelé sites de restriction. Toute modification par mutation dans la séquence du site de restriction empêche l'action de l'enzyme. Cette non-coupeure de l'ADN est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments d'ADN (fragments de restriction) obtenus après digestion enzymatique, puis séparation par électrophorèse et visualisation par hybridation avec une sonde radioactive ou fluorescente (Figures 5 et 6). Ce type de marqueur est codominant si le nombre d'enzymes utilisées est faible et s'il y a peu de sites d'hybridation de la sonde dans le génome. En faisant agir simultanément plusieurs enzymes de restriction, on étudie le polymorphisme à autant de sites particuliers qui se répètent tout au long de la molécule d'ADN.

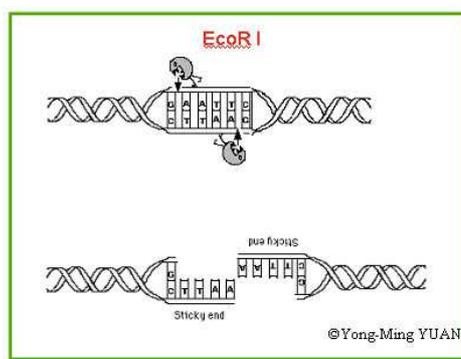


Figure 5: Site de restriction de l'enzyme Eco RI.

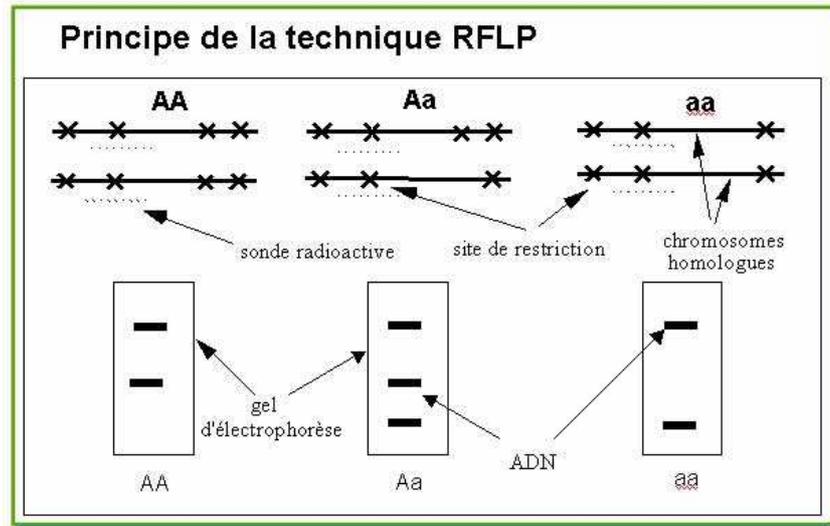


Figure 6: Principe de la technique RFLP.

### PCR-RFLP

L'utilisation de la PCR permet d'amplifier une région définie du génome puis d'appliquer la technique RFLP au produit PCR. Cette méthode appelée PCR-RFLP permet d'obtenir facilement des marqueurs codominants et évite l'étape d'hybridation et l'utilisation de sonde radioactive. Le produit PCR digéré par une (ou plusieurs) enzymes de restriction est simplement mis à migrer dans un gel d'agarose et le polymorphisme de la position et du nombre de bande est visualisé par une réaction colorée au Bromure d'éthidium.

### Les séquences répétées en tandem (VNTR)

Il existe dans les génomes des séquences nucléotidiques répétées en tandem les unes à la suite des autres. Le nombre de répétition est extrêmement variable entre individus d'où leur nom de VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). Cette variation du nombre de répétitions est à l'origine d'un important polymorphisme dans les populations naturelles. On distingue 2 grands types de séquences répétées :

- les minisatellites qui sont des répétitions de motif ayant 10 à 60 paires de bases (pb)
- les microsatellites (short sequence repeat ou SSR) qui sont des répétitions de motif ayant 1 à 6 paires de bases (pb): par exemple ATATATATATATATATAT soit (AT) $n$ ,  $n$  variable entre individus ou encore, CAGACAGACAGACA soit (CAGA) $n$ .

Les microsatellites ont une importance fonctionnelle dans la régulation de l'activité des gènes (transcription, traduction), organisation de la chromatine, taille du génome, recombinaison, réplication de l'ADN, cycle cellulaire, etc... Certains microsatellites auraient une grande importance dans le processus d'adaptation des populations au stress environnemental. Les minisatellites peuvent être détectés par RFLP en utilisant des enzymes de restriction qui coupent un grand nombre de fois le génome mais jamais dans les minisatellites. Un polymorphisme de longueur de fragment est alors révélé par l'existence d'un nombre de répétitions différent entre individus, ce qui produit des fragments de différentes tailles. Ces marqueurs sont donc multilocus et codominants. Les minisatellites sont révélés après PCR ce qui nécessite la mise au point d'amorces spécifiques. Cette étape est souvent longue et laborieuse mais permet d'obtenir des marqueurs monolocus et codominants.

### **RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)**

Cette technique consiste à réaliser une amplification PCR avec des amorces d'environ 10 pb définies de façon aléatoire. Si les 2 sites d'hybridation sont suffisamment proches, l'amplification par PCR est possible. Une variabilité dans la séquence des sites entre individus sera détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés. Cette technique a l'avantage d'être rapide avec peu de mise au point et révèle un polymorphisme important mais ce marqueur est dominant et les conditions de PCR sont très sensibles (Figure 7).

Une variante de la technique RAPD est d'utiliser des microsatellites comme amorces ce qui permet d'amplifier des régions comprises entre deux microsatellites (ISSR = Internal simple sequence repeat). Les primers sont choisis en fonction des profils satisfaisants obtenus entre différentes espèces (bactéries, végétaux, animaux). Les primers qui ne produisent pas de changements de profils RAPD ne sont pas retenus dans l'interprétation des résultats, qui sont exprimés en *genomic template stability* (GST). Le pourcentage de GST est calculé selon la formule  $100-(100a/n)$ , où  $n$  est le nombre de bandes détectées dans le témoin et  $a$  est la moyenne du nombre de changements dans les échantillons exposés à un toxique.

### **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Cette technique est une combinaison des RFLP et des RAPD. L'ADN est dans un premier temps digéré par des enzymes de restriction puis des adaptateurs vont venir se fixer à chaque extrémité des produits de digestion. Une amplification PCR est ensuite effectuée à l'aide d'amorces qui s'hybrident avec les adaptateurs et qui comportent en plus quelques bases choisies au hasard afin d'amplifier de façon sélective uniquement certains fragments. Une seconde PCR peut ensuite être effectuée pour réaliser une amplification plus sélective. Cette technique est très efficace pour révéler rapidement et facilement un polymorphisme.

### **Séquençage**

La technique la plus performante est évidemment le séquençage complet des gènes, qui fournit le maximum de renseignements sur des fractions limitées et précises du génome, mais cette technique est peu compatible avec l'analyse d'un grand nombre d'individus d'une population. Quoi qu'il en soit, même si une partie seulement du génome a été explorée chez les eucaryotes, le polymorphisme trouvé est suffisant pour entraîner une infinie diversité des génotypes individuels. Chaque génotype individuel correspond à un certain arrangement des divers allèles présents à chaque locus dans la population.

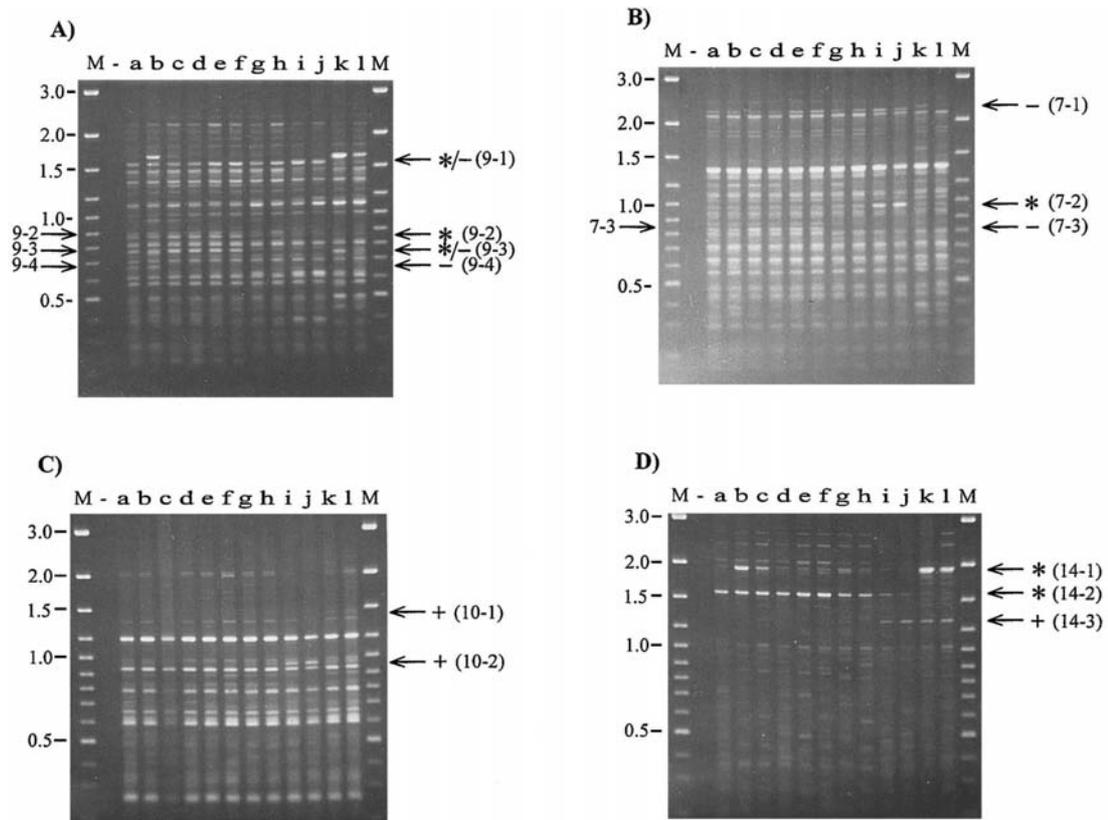


Figure 7: Profiles RAPD de *Daphnia magna* exposés au cuivre (d'après Atienzar *et al.*, 2001).

M, marqueur de taille d'ADN en kb. – absence de témoin ADN. Les profiles RAPD sont générés en utilisant les primers de 10 pb, un type de primers par gel. Les daphnies ont été exposés à des concentrations croissantes de cuivre allant de 0 (a-b), 15 (c-d), 30 (e-f), 60 (g-h), 90 (i-j) à 120 (k-l) µg/l. Les changements sont indiqués par rapport au profil témoin : \* variation d'intensité, + bande supplémentaire, - bande manquante.

## 7. Intérêts des marqueurs de diversité génétique dans la recherche des effets de stress environnementaux sur les populations aquatiques

Si le but recherché est d'évaluer la qualité de l'environnement, le plus fort potentiel d'un indicateur de diversité génétique est la caractérisation de la structure des populations composant l'écosystème. La taille effective de la population et la connexion des populations sont des attributs fondamentaux qui peuvent être diagnostiqués uniquement avec des marqueurs génétiques. Etant donné que les populations sont les unités de base biologique qui répondent aux changements environnementaux, la délimitation des frontières des populations est critique pour un monitoring de l'écosystème. Un des principaux avantages des mesures de diversité génétique dans les populations aquatiques lotiques est qu'elles sont très organisées sur le plan géographique, ce qui est moins le cas des écosystèmes aquatiques estuariens. Les tests de différenciation génétique des populations (F-statistics et test de Nei) sont donc très appropriés à ses structures très hiérarchisées.

Lorsque la diversité génétique est réduite, elle va rester basse assez longtemps avant que les mutations ou le flux génique la renfloue; cependant cela reste théorique pour ce qui est de la capacité des mutations à renflouer la diversité génétique. Etant donné que les effets de la sélection et de la dérive génétique s'accumulent au cours des générations, il y a un décalage

dans le temps avant de révéler des changements dans la diversité génétique. Un indicateur de diversité génétique permettra de rendre compte d'une exposition sur plusieurs années. Seules exceptions, les pressions de sélection sévères ou lorsque la population subit un bottleneck ce qui induit un changement rapide dans la diversité génétique. Ce dernier phénomène est observé expérimentalement (Hartl & Clark, 1999). Les populations subissant un bottleneck naturel présentent une remarquable correspondance avec la théorie génétique (Cabe, 1998 ; Hoesel, 1999).

Un grand nombre d'études montrent une corrélation positive entre les niveaux de diversité génétique et l'exposition aux contaminants chimiques. Dans la plupart des cas, la fréquence d'un allèle ou d'un génotype est modifiée dans les populations exposées par rapport aux populations de référence, suggérant une sélection à ce marqueur particulier (Gillespie & Gutman, 1999). La diversité génétique des populations exposées est souvent plus faible par rapport aux populations de référence suggérant que la taille de l'effectif a diminué.

De nombreux facteurs peuvent contribuer aux différences de fréquences d'allèles, les contaminants chimiques ne sont pas directement responsables. Cependant, il existe un lien entre sensibilité et résistance aux contaminants et diversité génétique. Ceci a été observé en mésocosme et en exposition au laboratoire (Gillespie & Guttman, 1989). Cependant, d'autres études montrent aussi un manque de corrélation entre diversité génétique et exposition aux contaminants chimiques.

La figure 8 présente les effets au niveau de la population de divers stress environnementaux et les conséquences sur la diversité génétique. Il existe une relation claire entre la diversité génétique et les stress écologiques qui va dans le sens de la théorie génétique. Ainsi, la perte de l'habitat qui diminue le niveau de migration (fragmentation) entre populations est attendue pour augmenter la composante de diversité génétique parmi les populations qui peut être mesurée par une augmentation de la  $F_{ST}$ . Si la fragmentation produit une réduction du nombre de géniteurs cela entraîne une diminution de l'hétérozygotie ( $H$ ) et de la fréquence d'allèles ( $N_a$ ). De même, avec une dégradation de l'habitat due par exemple à la contamination chimique ou à d'autres stress qui réduisent la taille de la population, on s'attend à observer une diminution de la diversité génétique dans les populations, les marqueurs génétiques liés à l'adaptation sont encore plus concernés par cette diminution. L'introduction d'espèces est un facteur potentiel de diminution de l'hétérozygotie et de la fréquence d'allèle, cela dépend de la possibilité de croisements entre espèces. Enfin l'exposition aux mutagènes de l'environnement est sensée augmenter le nombre d'allèles à un locus donné ( $N_a$ ); étant donné que l'occurrence des mutations est rare dans la population, l'hétérozygotie est peu affectée.

La diversité génétique des populations renseigne sur le maintien des populations et leur fitness. La diversité génétique est à la fois l'input et l'output de l'écosystème. En tant qu'input elle renseigne sur le caractère durable de l'écosystème, en tant qu'output elle renseigne sur ce qui se passe dans l'écosystème. Etant donné l'augmentation des pressions humaines, les modifications que subit l'environnement risquent d'être parmi les plus importantes de l'époque moderne. Pour les populations à faible diversité génétique, on s'attend à ce que le taux d'adaptation à un environnement altéré soit lent. Si le taux des changements environnementaux est important, ces populations auront de plus en plus de mal à se maintenir. Des changements anthropogènes rapides comme le réchauffement climatique mettront en évidence le rôle de la diversité génétique dans le maintien des populations dans le futur (Lande, 1999).

En plus de la perte de potentiel d'adaptation, la faible diversité génétique des populations peut avoir un effet immédiat sur la fitness. Des observations expérimentales suggèrent que les espèces diploïdes aient des allèles létaux récessifs. Si la diversité génétique est réduite rapidement, il s'ensuit une dérive génétique forte et de nombreux individus seront homozygotes pour les allèles létaux ou sublétaux et si la population diminue en taille, ces allèles seront fixés ce qui causent un risque accru d'extinction (Soule, 1980; Franklam, 1995).

Cet effet est appelé «dépression de consanguinité» puisqu'il est associé avec les populations consanguines observées au laboratoire.

La relation entre perte de diversité génétique à un loci et réduction de la fitness a été difficile à documenter dans les populations naturelles. Néanmoins, des observations en faveur de cette relation existent (revue par Allendorf et Leary, 1986) (Tableau 1). Cependant, il n'existe qu'un seul cas où on observe une relation entre la diversité génétique et l'extinction d'une population.

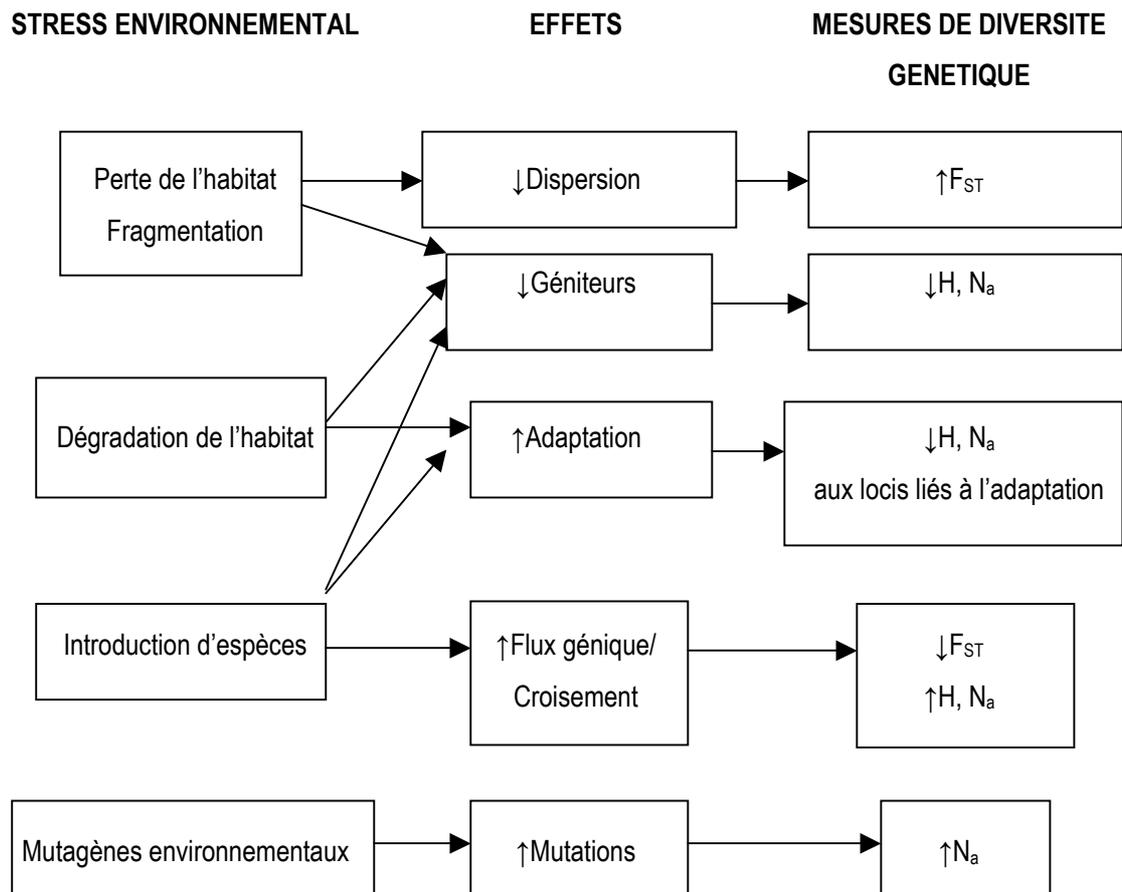


Figure 8: bases théoriques des effets au niveau de la population de divers stress environnementaux et conséquences sur la diversité génétique.  $F_{ST}$  indique la subdivision des populations, H : Hétérozygotie, N nombre d'allèles ségrégeants.

Effets	Marqueurs moléculaires	Taxon	Références
Extinction population locale	Allozymes, Microsatellite	Papillon	Saccheri <i>et al.</i> , 1998
Succès de reproduction	Microsatellite	Cerf commun rouge	Slate <i>et al.</i> 2000
Croissance et survie des colonies	Allozyme	Fourmi	Cole & Wiernsasz, 1999
Fertilité, taux d'éclosion	Microsatellite	Poule	Westerneir <i>et al.</i> , 1998 ; Bouzat <i>et al.</i> , 1998
Mortalité, croissance, fécondité, stabilité du développement	Allozyme	Poisson, Topminnow	Quattro & Vrijenhoek, 1989
Succès de reproduction des mâles	Allozyme	Gastéropodes	Rolan-Alvarez <i>et al.</i> , 1995
Succès de reproduction des mâles	Allozyme	Papillon	Carter & Watt, 1998
Stabilité du développement	MtDNA, microsatellites	Eléphant de mer	Hoelzel <i>et al.</i> , 2002

Tableau 1 : Exemples d'études montrant une association entre diversité génétique et fitness.

## 8. Profils génétiques des populations aquatiques et contamination chimique du milieu

En théorie, il existe quatre mécanismes par lesquels un toxique peut avoir un effet sur la diversité génétique. Il peut induire soit une augmentation directe du taux de mutations, soit une augmentation indirecte du taux de mutations par modification de la réparation de l'ADN, soit favoriser certains génotypes plus tolérants ce qui entraîne un changement réel de composition génétique de la population en faveur d'une tolérance plus élevée au toxique et enfin il peut produire un bottleneck. Ce bottleneck peut résulter de mortalité à certains stades du cycle de vie ou d'une diminution de la reproduction. Les deux premiers mécanismes augmentent la diversité génétique, les deux derniers la diminuent, on parle d'«érosion génétique». L'exposition aux contaminants peut induire l'un ou l'autre de ces changements ou l'ensemble.

Il faut noter que les espèces ayant une communauté importante de part leur nombre, principalement marines, présentent généralement des niveaux élevés d'hétérozygotie et sont sensées être plus résistantes à la pollution; les hétérozygotes multi-locus montrent toujours une fitness élevée par rapport aux homozygotes (Nevo *et al.*, 1986 ; Anderson *et al.*, 1994).

### 8.1. Altération de la structure génétique de la population : sélection ou adaptation

La structure génétique d'une population se définit comme étant le profil génétique par lequel des populations sont subdivisées en groupes de reproduction. Elle tient compte de leurs tailles, du nombre de géniteurs et du niveau de flux génique. Des paramètres permettent de caractériser la structure de la population tels que les indices de fixation d'allèles et la distance génétique ( $F_{ST}$ ). Un certain nombre d'études montrent une altération de la structure génétique de la population (revue dans Gillespie & Gutman, 1999).

Les métaux lourds affectent fortement la sélection d'allèles ou de génotypes chez les invertébrés (Vilsom, 1983; Ben-sholomo & Nevo, 1988). La toxicité du Cadmium a été testée sur des moules provenant de deux sites (Kattegat et Baltic). Après exposition au cadmium, on observe une fréquence d'allèles PGI significativement différente entre les moules mortes et les survivantes (Vilsom, 1983). Chez la crevette, *Palaemon elegans*, on a étudié les effets du cadmium et du mercure. Des génotypes différents et spécifiques pour chacun des métaux et pour les deux métaux associés sont observés pour PGM. Ces résultats reflètent la nature adaptative des génotypes. Au regard de ces résultats, les auteurs suggèrent que les génotypes des allozymes soient utilisés pour détecter la pollution par les métaux (Ben-sholomo & Nevo, 1988). Des travaux plus récents chez les clams *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* provenant de sites contaminés par les métaux lourds, montrent une forte diminution de la fréquence d'allèle PGM<sup>105</sup> et une augmentation de la fréquence de PGM<sup>95</sup>. L'allèle PGM<sup>105</sup> est contre-sélectionné, et PGM<sup>95</sup> est favorisé par les métaux lourds ; les auteurs suggèrent qu'ils peuvent être utilisés comme marqueur génétique de pollution (Moraga *et al.*, 2002). Chez l'escargot d'eau douce, *Pleurocera canaliculatum*, on a également observé des fréquences d'allozyme et de génotype significativement différentes entre les populations provenant des sites les plus contaminés par le mercure (North Fork Holston River, Virginia, USA): l'hétérozygotie à trois loci (MDH-2, PEP-2, TPI-1) est significativement plus faible (Benton *et al.*, 2002). Le taux de cassures double brin de l'ADN est corrélé à la concentration de mercure dans l'organisme. Déjà observées dans des études environnementales, notamment chez la moule (Steinart *et al.*, 1998), ces corrélations peuvent être expliquées par le caractère génotoxique du mercure (Ariza *et al.*, 1994; Stohs & Bacchi, 1995). Les contaminants semblent sélectionner les individus aux génotypes d'enzymes résistants ce qui entraîne une diminution ou une perte de certains allèles ou génotypes dans la population. Ces études présentent l'intérêt des allozymes comme marqueur dans l'étude des sites contaminés.

Une étude réalisée en France sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* montre une survie différentielle suite à l'exposition expérimentale au cuivre, au cadmium, au TBT et à deux pesticides (atrazine, isotroturon). Les individus ont pu être classés en sensible (S,) résistant (R) et modérément résistant au TBT et en deux groupes, S et R, pour les autres toxiques. Certains génotypes ont une survie différentielle significative (ex: Aat-2 90/100 pour le TBT, Pgm 98/105 et 105/105 pour l'isotropuron). D'autre part, les populations d'huîtres de la Baie d'Arcachon exposées à l'atrazine et à l'isotropuron ont un déficit en hétérozygotes au loci Ak, Cap-1 et Pgm. Celles de la Baie de Brest ont un déficit aux loci Ak, Pgm, Pgdh. La sensibilité des allozymes aux stress environnementaux reflète la nature adaptative des individus et conforte l'hypothèse de l'utilisation des allozymes comme marqueurs génétiques chez l'huître (Moraga & Tanguy, 1997).

Souvent ces données ne sont pas une preuve suffisante de l'effet des contaminants car ces variations de structure peuvent refléter une subdivision de population causée par d'autres facteurs. Un certain nombre d'autres études ont apporté plus d'informations (cf. Tableaux 2 et 3, annexe du document). C'est le cas des travaux de Pasteur et Sinègre (1975). Dans cette étude chez les larves de moustiques *Culex pipiens*, les populations exposées ont un allèle à un locus esterase nouveau, ce qui apporte une preuve de la fixation d'allèle corrélée à la résistance aux organophosphates. Les changements génétiques ne sont pas toujours causés par la sélection d'allèles, il convient donc de s'assurer que les fréquences d'allèles et de génotypes sont identiques dans les populations exposées. Patarnello *et al.* (1991) ont observé que les fréquences d'allèles et de génotypes diffèrent dans les populations adultes de barnacles, *Balanus amphitrite*, entre sites plus exposés par rapport aux sites moins exposés dans la lagune de Venise.

Chez le poulamon atlantique, *Microgatus Tomcod*, en utilisant deux marqueurs moléculaires, ADNmt et oncogène c-abl, Wirgin *et al.* ont montré que l'origine du polymorphisme de c-abl et les variations de fréquences entre deux populations distantes géographiquement (Hudson River et Maine Rivers, USA) sont des événements génétiques récents (revue dans Wirgin & Waldman, 2004). Cette étude est un exemple d'application pour élucider la structuration génétique des populations de poissons dans le temps. Pour cette espèce, la pollution chimique de Hudson River est un facteur influençant également l'incidence de cancers du foie puisqu'il est retrouvé dans 90% des poissons de Hudson River contre 5% dans Maine River. Un polymorphisme du gène du cyt P450 1A existe dans 10% des poissons de Hudson River alors qu'il n'a pas été détecté chez les poissons de Maine River (délétion de 606 pb dans l'exon 7). Cet allèle variant n'est observé qu'à l'état hétérozygote. L'absence d'homozygote pour ce variant est une preuve que la sélection a opéré dans la population de poissons de Hudson River. La preuve que cet allèle n'est pas un pseudogène a été apportée par les auteurs.

Chez la gambusie, *Gambusia affinis*, exposée aux radionucléides, Shugart et Theodorakis montrent que la structure génétique des populations exposées est plus similaire que celle des populations des sites de références, ces conclusions reposent sur le calcul de la distance génétique après analyse RAPD et allozymes à 8 loci polymorphes. Les populations exposées sont génétiquement divergentes des populations de référence. Dans une autre étude, les mêmes auteurs observent une plus faible incidence des cassures de l'ADN dans les populations exposées ; ces populations présentent par ailleurs des Contaminant-Indicative Bands (CIBs)(Fragments d'ADN amplifiés par RAPD et présents uniquement dans les populations exposées) qui confèreraient un avantage sélectif puisque les individus ont une meilleure fécondité et une meilleure survie (Shugart & Theodorakis, 1997-1998). Cependant les CIBs devront être séquencées pour connaître leur identité moléculaire.

On peut citer l'étude de Ross *et al.* qui montre une application intéressante dans les études environnementales. Une étude sur site présentant une contamination métallique ancienne datant de la fin du 19<sup>ième</sup> siècle offre une opportunité unique pour examiner l'impact des polluants sur les caractéristiques génétiques des populations. Utilisant la RAPD, les auteurs de

cette étude ont observé que la diversité génétique de crevettes, *Leander intermedius*, et d'isopodes, *Platynympha longicaudata*, est diminuée dans le site très pollué de Port Pirie (Sud de l'Australie) par rapport aux trois sites de références (Ross *et al.*, 2002). Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer cette baisse de diversité génétique : (i) une mortalité massive due à la toxicité des métaux, indépendante du génotype et (ii) une extinction passée suivie d'une colonisation et expansion par une autre population (autre forme de dérive génétique). La réduction de diversité d'espèces et de densité a déjà été observée sur ce site. L'hypothèse que l'exposition aux métaux est responsable de la diminution de diversité génétique dans la population d'isopodes est renforcée par le fait suivant: lors d'exposition au laboratoire, les isopodes pré-exposés (vivant initialement sur le site de Port Pirie) sont plus résistants aux métaux par rapport aux isopodes des sites de référence. Par contre dans les expériences de toxicité aiguë, les populations de *L. intermedius* de Port Pirie et des sites de référence présentent des réponses identiques, ce qui suggère qu'il n'y aurait pas eu de sélection pour la tolérance aux métaux comme l'a montré Kovatch (2000) chez les copepodes. Les auteurs insistent sur l'intérêt d'avoir plusieurs sites de référence et plusieurs espèces pour rechercher les effets des polluants sur la diversité génétique.

## 8.2. Variabilité génétique : bottleneck

Certaines études montrent un maintien de la diversité génétique ; d'autres une modification de la diversité génétique. Dans ces derniers cas, les populations ne sont plus à l'équilibre de Hardy-Weinberg<sup>1</sup> car le taux d'hétérozygotes est diminué comme le montre l'étude de Battaglia dans les populations de moules échantillonnées le long d'un gradient de pollution de moules (Battaglia *et al.*, 1980). Patarnello observe lui une plus forte proportion de multi-homozygotes chez les barnacles vivants sur sites contaminés par les métaux lourds par rapport aux sites de références (Patarnello *et al.*, 1991). Ces résultats sont expliqués par un bottleneck dû à une diminution de la taille de la population suite à l'effet des contaminants.

Les modifications de diversité génétique se traduisent parfois par une augmentation des individus hétérozygotes sur sites pollués comme le montre Roark et Brown (1996) chez les poissons vivants sur sites contaminés par les métaux. Ceci peut-être expliqué par différents mécanismes : bottleneck, sélection d'allèles spécifiques dû soit à une altération de la fréquence des gènes ou à un phénomène d'hétérosis, l'hétérosis étant défini comme un avantage des hétérozygotes.

De nombreuses études montrent une corrélation entre variabilité génétique et sensibilité aux polluants ou indice biotique (revue dans Belfiore & Anderson, 2001).

## 8.3. Variabilité génétique : mutations

En théorie, les mutations augmentent la variabilité génétique. Cependant, aucune étude présente de telle conclusion. Seuls les travaux de Yauk et Quinn chez la mouette montrent une modification des profils RAPD chez les jeunes vivants sur des sites urbains et industriels (Hamilton Harbour, Ontario, Canada) (Yauk & Quinn, 1996). Les mêmes auteurs ont par la suite observé une augmentation du taux de mutations germinales de minisatellites chez les individus à proximité d'aciéries (Yauk *et al.*, 2000). La technique des minisatellites est prometteuse pour mesurer le taux de mutations car le taux de mutations dans ces régions non codantes est en général élevé et corrélé au taux de mutations dans les régions codantes (Dubrova *et al.*, 1998). Au niveau de la population, une augmentation du taux de mutation doit entraîner une fréquence élevée d'allèles rares. En pratique, il faut mesurer l'accumulation de nouvelles mutations en évaluant: le génotype des parents et de la progéniture ou la fréquence de nouveaux génotypes dans les gamètes.

<sup>1</sup> La loi de Hardy-Weinberg stipule que les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques (c'est à dire la structure génétique de la population) restent stables de génération en génération. On dit alors que la population est à l'équilibre et il existe une relation simple entre les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques.

## 9. Adaptation génétique ou tolérance ?

On sait que l'exposition chronique à un toxique entraîne parfois un phénomène de résistance. On distingue deux formes possibles de résistance :

- L'adaptation génétique intervient au niveau de la population. Il y a sélection génétique d'individus plus résistants contribuant à une deuxième génération encore plus résistante ; la constitution génétique de la population est donc modifiée. Même si les échelles de temps sont élevées lorsqu'il s'agit de processus d'évolution, l'adaptation à l'exposition de toxique peut être plus rapide que les changements stochastiques ou les pressions de sélection. L'adaptation génétique par la sélection doit être vérifiée expérimentalement dans les générations suivantes par des expériences de croisement.
- L'acclimatation ou tolérance : elle intervient au niveau individuel. Les organismes deviennent plus résistants à des toxiques, il s'agit d'une conséquence à des expositions passées. C'est un mécanisme physiologique ou épigénétique. Il peut disparaître après transfert des organismes en milieu moins pollué.

Il est important de faire la différence entre ces deux processus car les conséquences ne sont pas les mêmes pour les populations. L'adaptation génétique doit être vérifiée par des tests sur plusieurs générations. La tolérance est détectée par la survie ou par des réponses physiologiques différentielles.

### 9.1. Adaptation génétique

Cette adaptation génétique peut intervenir car la sélection intervient à un ou à très peu de loci et parce que les génotypes sont dominants. Chez le poisson, la gambusie est devenue résistante aux insecticides organochlorés, dont le DDT, après exposition à des effluents agricoles (Vinson *et al.*, 1963); la résistance a été confirmée sur la progéniture et celle-ci est résistante à sept insecticides (Boyd & Ferguson, 1964). Chez un oligochète benthique d'eau douce, *Limnodrilus hoffmeisteri*, exposé naturellement à des concentrations élevées de contaminants métalliques d'origine industrielle, l'acquisition de résistance intervient en trois ou quatre générations (Klerks & Levinton, 1987). Les invertébrés ont une durée de vie plus courte, ils sont moins mobiles et souvent plus exposés à de plus fortes concentrations que les populations de vertébrés. C'est donc un taxa de choix pour la recherche d'adaptation génétique.

### 9.2. Tolérance

Chez les organismes à durée de vie plus longues, une tolérance à la contamination chimique est observée pour plusieurs espèces de poissons (revue dans Wirgin & Waldman 2004). On peut citer le cas du Mummichog, *Fundulus heteroclitus*, qui a une tolérance élevée au mercure (Weis & Weis, 1989), à la dioxine aux PCBs et aux HAPs (Prince & Cooper, 1995). Les sédiments de Elizabeth River dans la zone de Atlantic Wood Industries ont des concentrations 2500 fois plus élevées en HAPs que celles trouvées en amont. Les poissons vivants sur ces sites sont adaptés alors que des poissons vivants dans un site de référence présentent 100% de mortalité s'ils sont exposés à ces sédiments toxiques. Cette tolérance aux HAPs peut s'expliquer génétiquement. Une étude des allozymes a montré que ces poissons sont distincts par rapport à ceux d'autres sites de Elizabeth river (Mulvey *et al.*, 2002; 2003) et cela en tenant compte du facteur migration. De même l'ADNmt utilisé comme marqueur moléculaire montre une corrélation significative entre la distance génétique ( $F_{ST}$ ) et la concentration en HAPs.

### 9.3. Coût de la tolérance

La résistance ne doit pas se traduire sans un coût au niveau de l'évolution des populations en terme de fitness. L'énergie investie dans les mécanismes adaptatifs n'étant pas investie dans d'autres processus comme la croissance et la reproduction. Les conséquences d'un tel compromis énergétique, trade-offs énergétique, sont chez ces individus une fitness réduite. Cela peut aussi inclure une plus forte sensibilité aux autres stress environnementaux ou une fitness réduite en absence de contaminants, voir une mortalité comme chez *Chironomus riparius* (Groenendijk *et al.*, 1999). La fécondité, le taux de croissance et les facteurs démographiques sont altérés dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles. Ce phénomène est décrit dans les études expérimentales. On peut citer les travaux réalisés par Xie et Klerks chez la fondule, *Heterandria formosa*, où une résistance au Cadmium est observée après sélection au laboratoire (Xie & Klerks, 2003). Le coût de la résistance se traduit par une diminution du nombre de descendants dans la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération par rapport aux populations de référence et une baisse de la fécondité en moyenne de 18%. La première reproduction intervient plus tard et la durée de vie des femelles est plus courte également. Les auteurs concluent que le coût de la fitness et les trade-offs sont associés à l'évolution de la résistance au cadmium. Ils doivent résulter de la maintenance des mécanismes de résistances ce qui entraîne des changements dans l'allocation des ressources chez les poissons adaptés (Xie & Klerks, 2004).

Chez le flet, la réponse génétique et physiologique a été étudiée dans plusieurs estuaires contaminés (Seine, Loire, Gironde, Vilaine) et un estuaire moins contaminé, le Ster. Des populations tolérantes sont observées, ce phénomène de tolérance à la contamination chimique est associé à une réduction de la fitness (baisse de fécondité, taux de croissance, indice de condition) suggérant que la survie se traduit par un coût (Marchand *et al.*, 2004). Les populations tolérantes présentent une diminution d'hétérozygotie multi-locus (allozymes : PGM, GPI-2, MPI, IDHP, AAT-1, AAT-2), plus particulièrement pour les allèles PGM 85 et AAT-1 95 en estuaire de Loire, Gironde et Vilaine ; en estuaire de Seine l'hétérozygotie est maintenue. En sites pollués, ces allèles sont portés par des individus qui présentent une bonne fitness et leur ADN est moins altéré dans les cellules sanguines (Laroche *et al.*, 2002 ; Marchand *et al.*, 2003). Cette étude montre l'évolution de populations de flets en estuaires très contaminés : deux populations sont mises en évidence, «sensible» et «résistante». La résistance ici pourrait être la réponse à des expositions passées plus qu'à une pression de sélection. Néanmoins ce phénomène n'a pas été démontré expérimentalement.

## 10. Conclusion

Rechercher les effets des contaminants chimiques sur les populations aquatiques est un projet difficile et ambitieux comme on le voit à travers cette synthèse. Depuis plus de quarante ans, les relations entre diminution d'hétérozygotie, modification des fréquences de génotypes et fitness préoccupent les biologistes. Cette relation possible fait toujours l'objet de débats et aucun consensus n'a été trouvé.

La technique des allozymes a permis d'observer des modifications de profils génétiques corrélées à la présence de contaminants chimiques, en particulier des métaux lourds. Ces observations restent intrigantes et frustrantes car la nature génétique des modifications n'est pas identifiée.

L'adaptation génétique des espèces en milieu contaminé a été observée à plusieurs reprises. Ces études sont des exemples concrets des effets des contaminants chimiques au niveau des populations. Ces études sont difficile à mener sur le terrain car elles nécessitent d'être réalisées sur plusieurs générations.

La tolérance peut être détectée expérimentalement par la survie ou par des réponses physiologiques différentielles entre les organismes adaptés et non adaptés à une contamination chimique. Cette approche se distingue de l'étude de la diversité génétique à l'échelle de la population car elle tient compte de réponses physiologiques individuelles. L'objectif étant d'établir des relations «génotype-phénotype».

En France des études sont réalisées chez le flet et l'huître en utilisant les allozymes. Chez le flet, une étude de terrain montre une modification d'hétérozygotie multi-locus associée à une diminution de fitness, sans démonstration expérimentale de tolérance. L'huître, après étude expérimentale, est plus ou moins sensible aux polluants étudiés; il s'agit là d'une approche au niveau de l'individu plus qu'au niveau de la population.

Les marqueurs de diversité génétique ne sont pas à appliquer comme des biomarqueurs. Comme leur nom l'indique, ils caractérisent le pool génétique d'une population et non l'effet d'un xénobiotique. Ils présentent l'intérêt de rendre compte de phénomènes non décelables comme la survie différentielle et l'histoire des populations. On recherchera un bottleneck, un phénomène de sélection ou des mutations. Le choix des marqueurs génétiques intervient à ce niveau. Les microsatellites et la technique AFLP sont des marqueurs neutres qu'il faut privilégier car ils sont plus informatifs sur le polymorphisme que ne le sont les allozymes. Néanmoins, certains auteurs utilisent les gènes impliqués dans les mécanismes de défense spécifique d'un contaminant (ex: métallothionéine) ou la fitness pour rechercher le polymorphisme sur ces gènes là (méthode du gène candidat).

Le choix de l'espèce est à considérer sur le plan des informations sur les séquences de gènes, des possibilités de maintenir les organismes en aquarium, du temps de génération d'un adulte et du niveau d'exposition aux contaminants chimiques.

En dehors des considérations scientifiques, il faut savoir que le coût en investissement matériel est élevé pour les microsatellites et les marqueurs moléculaires en général.

## 11. Références bibliographiques

- Adams S.M., Giesy J.P., Tremblay L.A., Eason C.T., 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology, *Biomarkers*, 6 : 1–6.
- Allendorf F.W., Leary R.F., 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In Soule (ed) *Conservation Biology: The science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, M.A., 57-76.
- Anderson S., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G., 1994. Genetic and molecular ecotoxicology: a research framework. *Environ. Health Perspect.*, 102 : 3–8.
- Ariza M.E., Holliday J., Williams M.V., 1994. Mutagenic effect of mercury (II) in eukaryotic cells. *In vivo*, 8 : 559-564.
- Atienzar F.A., Cheung V.V., Jha A.N., Depledge M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.*, 59 : 241-50.
- Battaglia *et al.*, 1980. Studies on the genetic effects of pollution in the sea, Rapp. P.-V. Reun. Const. Int. Explor. Mer., 179 : 267-274.
- Beardmore J.A., Barker C.J., Battaglia B., Berry R.J., Longwell A.C., Payne J.F., Rosenfield A., 1980. The use of genetical approaches to monitor biological effects of pollution. Rapp. P.-V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer. 179, 299–305.
- Belfiore N.M., Anderson S.L., 1998a. Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: the example of genetic ecotoxicologie. *Environ. Monit. Asses.*, 51 : 465-479.
- Belfiore N.M., Anderson S.L., 1998b. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review, *Mutat. Res.*, 489, pp 97-122.
- Belfiore N.M., Anderson S.L., 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review, *Mutat. Res.*, 489 : 97-122.
- Ben-shlomo R., Nevo E. 1988. Isozyme polymorphism as monitoring of marine environments — the interactive effect of cadmium and mercury pollution on the shrimp, *Palaemon elegans*. *Mar. Poll. Bull.*, 19 : 314–317.
- Benton M.J., Malott M.L., Trybula J., Dean D.M., Guttma S.I., 2002. Genetic effects of mercury contamination on aquatic snail populations: allozyme genotypes and DNA strand breakage. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 : 584-589.
- Bickham J.W., Smolen M.J., 1994. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Env. Health Perspect.*, 102 : 25-28.
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F., 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analysis on *ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 148 : 1893-906.
- Bouzat J.L., Cheng H.H., Lewin H.A., Westemeier R.L., brawn J.D., Paige K.N., 1998. Genetic evaluation of a genetic bottleneck in the greater prairie chicken. *Conserv. Biol.*, 12 : 836-843.
- Boyd C.E., Ferguson D.E., 1964. Spectrum of cross-resistance to insecticides in the mosquitofish *Gambusia affinis*. *Mosquito news*, 24 : 19-21.

- Burgeot T., Minier C., Bocquené G., Vincent-Hubert F., Munschy C., Cachot J., Loizeau V., Abarnou A., Jaouen A., Tybarczyk H., Lessueur P., Miramand P., Guyot T., Rochard, E., Boet P., 1999. Des organismes sous stress. Colloque final du Programme National Seine Aval, Rouen, 17-19 novembre 1999
- Cabe P.R., 1998. The effects of founding bottlenecks on genetic variation in the European starling (*Sturnus vulgaris*) in North America. *Heredity*, 80 : 519-525.
- Cachot J., Cherel Y., Galgani F., Vincent F., 2000. Evidence of p53 mutation in an early stage of liver cancer in European flounder. *Mutat. Res.*, 464 (2) : 279-287.
- Cattini O., Serra R., Isani G., Raggi G., Cortesi P., Carpene E., 1996. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labras* exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Phys., C*, 113 : 193-199.
- Cole B.J., Wiernasz D.C., 1999. The selective advantage of low relatedness. *Science*, 285 : 891-893.
- Coltman D.W., Bowen W.D., Wright J.M., 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proc. Biol. Sci.*, 265 : 803-9.
- Carter P.A., Watt W.B., 1988. Adaptation at specific loci. V. Metabolically adjacent enzyme loci may have very distinct experiences of selective pressures. *Genetics*, 119 : 913-924.
- Depledge M.H., 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res.*, 399 : 109-122.
- Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J., Fennely Bois P., Goodhead D., Jeffreys A.J., 1998. Stage specificity, dose response, and doubling dose for mouse minisatellite germ-line mutation induced by acute radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 6251-6255.
- Fisher R.A., 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press. New York.
- Frankham R., 1995. Inbreeding and extinction : A threshold effect. *Conserv. Biol.*, 9 : 792-799.
- Gillespie R.B., Guttman S.I., 1989. Effects of contaminants on the frequencies of allozymes in populations of the central stoneroller. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 : 309-317.
- Gillespie R.B., Guttman S.I., 1999. Chemical-induced changes in the genetic structure of populations: effects on allozymes. In: Forbes, V.E. (ed.) *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor and Francis, Philadelphia, 55-77.
- Groenendijk, D., van Opzeeland B., Bionisio Pire, L.M, Postma, J.F., 1999. Fluctuating Life-history parameters indicating temporal variability in metal adaptation in riverine chironomids. *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 37 : 175-181.
- Hartl D.J., Clark A.G., 1997. *Principles of population genetics*. 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C.C., 1991. p53 mutations in human cancer. *Science*, 253 : 49-53.
- Hummel H., Bogaards R.H., Amiard-Triquet C., Bachelet G., Desprez M., Marchand J., Rybarczyk H., Sylvand B., de Wit Y., de Wolf L., 1995. Uniform variation in genetic traits of a marine bivalve related to starvation, pollution and geographic clines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 191 : 133-150.
- Hummel H., Amiard-Triquet C., Bachelet G., Desprez M., Marchand J., Sylvand B., Amiard, J.C., Rybarczyk H., Bogaards R.H., Sinke J., De Wit Y., De Wolf L., 1996. Sensitivity to

- stress of the estuarine bivalve *Macoma balthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gironde). *J. Sea Res.*, 35 : 315-321.
- Hoezel A.R., 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biol. J. Linn Soc.*, 68, 23-39.
- Hoezel A.R., Fleischer R.C., Campagna C., Le Boeuf B.J., Alvord G., 2002. Impact of a population bottlenecks on symmetry and genetic diversity in the northern elephant seal. *J. Evol. Biol.*, 15 : 567-575.
- Klerks P.L., Weiss J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Poll.*, 45 : 173-205.
- Kondrashov A.S., 1995. Contamination of the genome by very slightly deleterious mutations: why have we not died 100 times over? *J. Theoret. Biol.*, 175 : 583-594.
- Kovatch C.E., Schizas N.V., Chandler G.T., Coull B.C., Quattro J.M., 2000. Tolerance and genetic relatedness of three meiobenthic copepod populations exposed to sediment-associated contaminant mixtures: role of environmental history. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18 : 504-508.
- Kurelec B., 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.*, 35 : 341-348.
- Lande R., 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In L.F. Landweber & Dobson A.P. (eds) Genetic and the extinction of species. Princeton University press. Princeton, N.J. pp 1-22.
- Laroche J., Quiniou L., Juhel G., Auffret M., Moraga D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder *Platichthys flesus* populations to chemical contaminants in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 : 2705-2712.
- Lynch M., Conery J., Bürger R., 1995. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *Am. Nat.*, 146 : 489-518.
- Marchand J., Tanguy A., Laroche J., Quiniou L., Moraga D., 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the atlantic coast of France. *Marine Ecol. Progress series*, 260 : 273-284.
- Marchand J., Quiniou L., Riso R., Thebaud M.T., Laroche J., 2004. Physiological coast of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus* along the french Atlantic coast. *Aquatic toxicol.*, 70 : 327-343.
- Maroni G., Wise J., Young J.E., Otto E., 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 117 : 739-744.
- Mouche C., Pasteur N., Berge J.B., Hyrien O., Raymond M., Robert De Saint Vincent B., De Silvestri M., Georghiou G.P., 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, 233 : 778-780.
- Moraga D., Tanguy A., 1997. Effects of anthropogenic factors on genetic diversity in the marine bivalve *Crassostrea gigas*: search for genetic markers. *Vie et milieu*, 47 : 355-365.
- Moraga D., Mdelgi-Lasram E., Romdhane M.S., Abed A.El., Boutet I., Tanguy A., Auffret, M., 2002. Genetic responses to metal contamination in two clams: *Ruditapes decussates* and *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environ. Res.*, 54 : 521-525.
- Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C., 1915. The mechanism of mendelian heredity. New-York.

- Mulvey M, Newman M.C., Vogelbein WK, Unger MA, 2002. Genetic structure of *Fundulus heteroclitus* from PAH-contaminated and neighboring sites in the Elizabeth and York Rivers. *Aquat. Toxicol*, 60 : 195-209.
- Mulvey M, Newman M.C., Vogelbein WK, Unger MA, 2003. Ownby DR Genetic structure and mtDNA diversity of *Fundulus heteroclitus* populations from polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 : 671-677.
- Nevo E., Noy R., Lavie B., 1986. Genetic diversity and resistance to marine pollution. *Biol. J. Linn. Soc.*, 29 : 139-144.
- Nevo E., 1993. Evolutionary processes and theory: the ecological-genetics interface. *Water Sci. Technol.*, 27 : 489-496.
- Nevo E., 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 6233-6240.
- Patarnello T., Guinez R., Battaglia B., 1991. Effects of pollution on heterozygosity in the barnacle *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 70 : 237-243.
- Pasteur N., Sinègre G., 1975. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorous insecticide in *Culex pipiens* populations, *Biochem. Genet.*, 13 : 789-803.
- Prince R., Cooper K.R., 1995. Comparisons of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on chemically impacted and non-impacted subpopulations of *Fundulus heteroclitus*: II. Metabolic considerations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 :589-595.
- Quattro J.M., Vrijenhoek R.C., 1989. Fitness differences among remnant populations of the endangered Sonoran topminnow. *Science*, 245 : 976-978.
- Roark S., Brown K., 1996. Effects of metal contamination from mine tailing on allozyme distributions of populations of great plains fishes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 : 921-927.
- Rolan-Alvarez, E., Zapata C., Alvarez G., 1995. Multilocus heterozygosity and sexual selection in a natural population of marine snail *Littorina mariae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Heredity*, 75 : 17-25.
- Ross K., Cooper N., Bidwell J.R., Elder J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 : 671-679.
- Saccheri I., Kuussaari M., Kankare M., Vickman P., Fortelius W., Hanki I., 1998. Inbreeding an extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392 : 491-494.
- Slate J., Kruuk L.E.B., Marshall T.C., Pemberton J.M., Clutton-brock T.H., 2000. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proc. Biol. Sci.*, B, 267 : 1657-1662.
- Soule M.E., 1980. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In M.E. Soule & B.A. Wilcox (eds), "conservation biology" An evolutionary-ecological perspective. Sinauer, Sunderland, M.A. pp 151-169.
- Steinard S.A., Streib-Montee R., Leather J.M., Chadwick D.B., 1998. DNA mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.*, 399 : 65-85.
- Stohs S.J., Bagchi D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, 18 : 321-336.

- Theodorakis C.W., Shugart L.R., 1997. Genetic ecotoxicology. Part II. Population genetic structure in radionuclide-contaminated mosquitofish (*Gambusia affinis*), *Ecotoxicology*, 6 : 335-354.
- Theodorakis C.W., Shugart L.R., 1998. Genetic ecotoxicology. Part III. The relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquitofish exposed to radiation. *Ecotoxicology*, 7 : 227-236.
- UEC direction in: Ecosystems & Human Well-being: Biodiversity Synthesis, Millenium Ecosystem Assessment).
- Vilsom M.M., 1983. Copper-induced differential mortality in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 76 : 291-295.
- Vincent F., de Boer J., Pfohl-Lezkowicz A., Cherel Y., Galgani F., 1998. Two cases of *ras* mutation are associated with liver hyperplasia in *Callionymus lyra* exposed to polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mol. Carcinogen.*, 21, 121-127.
- Vincent-Hubert F. 2000. cDNA cloning and expression of two Ki-ras genes in the Flounder, *Platichthys flesus*, and analysis of hepatic neoplasms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126 : 17-27.
- Vinson S.B., Boyd C.E., Ferguson D.E., 1963. Resistance to DDT in the mosquitofish *Gambusia affinis*. *Science*, 139 : 217-218.
- Vitousek P.M., Mooney H.A., Lubchenco J., Melillo J.M., 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science*, 277 : 494-499.
- Weis J.S., Weis P., 1989. Tolerance and stress in a polluted environment: the case of the mummichog. *Bioscience*, 39 : 89-95.
- Xie L., Klerks P.L., 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formaosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 : 313-320.
- Xie L., Klerks P.L., 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish, *Heterandria formaosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 : 1499-503.
- Westemeier R.L., Brawn J.D., Simpson S.A., Esker T.L., Jansen R.W., Walk J.W., Kerchner, E.L., 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282 : 1695-1698.
- Wirgin I., Waldman J.R., 2004. Resistance to contaminants in North American fish populations. *Mutat. Res.*, 552 : 73-100.
- Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16 : 97-159.
- Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 37 : 498-509.
- Yauk C.I., Quinn J.S., 1996. Multilocus DNA fingerprinting reveals high rate of heritable genetic mutation in herring gulls nesting in an industrialized urban site. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 93 : 12137-12141.
- Yauk C.L., Fox G.A., McCarry B.E., Quinn J.S., 2000. Induced minisatellite germline mutations in herring gulls (*Larus argentatus*) living near steel mills. *Mutat. Res.*, 452 : 211-218.