

BAFFARD Vincent

Maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes: mention environnement.

Université de La Rochelle

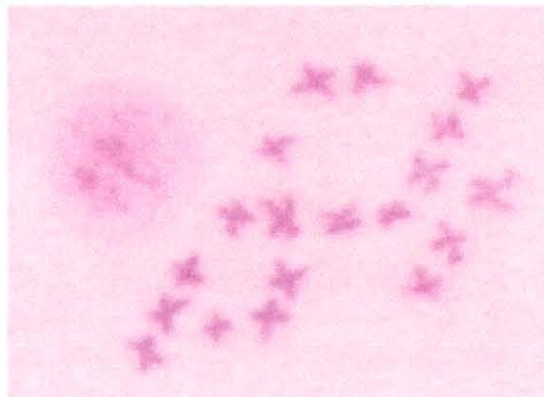
Année 2001/2002



IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

**Influence des facteurs environnementaux
sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse,
Crassostrea gigas.**

69077
E600-BAF.I
OLN 2636.



Ifremer

Encadrement:

Sylvie Lapègue et Karine Bouilly

IFREMER

Laboratoire de génétique et de pathologie des mollusques

B.P.133

17390 La Tremblade

INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
PARTIE I : ETUDE DE L'ANEUPLOÏDIE CHEZ DES ADULTES SOUMIS À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE MERCURE.	5
Introduction.	6
Matériel et méthodes.	6
1-Matériel biologique.	6
2-Méthode d'étude.	6
Résultats et discussion	7
PARTIE II : ETUDE DE LA CROISSANCE POUR DES LARVES ISSUES D'UN CROISEMENT D'INDIVIDUS SOUMIS À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM.	9
Introduction.	10
Matériel et méthodes.	10
1-Géniteurs	10
2-Croisements.	10
3-Elevage larvaire.	11
3 –Suivi de la croissance.	12
4-Analyse statistique.	13
Résultats et discussion.	13
1-Taux d'éclosion.	13
2-Croissance larvaire.	14
3-Mortalités	15
PARTIE III : ETUDE DE LA CROISSANCE POUR DES LARVES SOUMISES À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'ATRAZINE.	16
Introduction.	17
Matériel et méthodes.	17

1-Géniteurs.	17
2-Croisement.	17
3-Elevage larvaire et suivi de la croissance.	17
4-Analyse statistique.	17
Résultats et discussion.	18
1-Résultats du test F.	18
CONCLUSION GÉNÉRALE.	20
BIBLIOGRAPHIE	22
ANNEXE	25

Introduction générale

L'activité ostréicole dans le bassin de Marennes Oléron est très développée. En terme de production commercialisée elle est la plus importante d'Europe. Une seule espèce est exploitée de façon générale sur tout le bassin, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Cette espèce est la plus représentée dans le monde et a progressivement remplacé l'huître portugaise *Crassostrea angulata* au début des années 70 qui était cultivée sur le bassin de Marennes Oléron (S. Lapègue et al. 2000). Par conséquent de nombreux programmes de recherche ont été mis en place pour obtenir des connaissances concernant la physiologie, la reproduction, ou la croissance de cette espèce.

Différents travaux menés depuis 1984 chez l'huître creuse en particulier, montrent qu'il existe, dans les branchies (Thiriot-Quiévreux.C.,1982), une certaine proportion de cellules possédant un nombre de chromosomes inférieur au nombre habituel $2N=20$. Ce phénomène est l'aneuploïdie. Cette anomalie cytogénétique est mise en évidence par un comptage des chromosomes d'une suspension cellulaire obtenue à partir des branchies. Il est apparu que le taux d'aneuploïdie affectait négativement les taux de croissance (Leitão et al., 2001 a). Il existe deux types d'origines possibles à l'aneuploïdie. La première peut être génétique (Leitao et al 2001 b), et la seconde environnementale. L'effet de l'atrazine sur l'aneuploïdie a déjà fait l'objet de travaux. Il existe une relation positive entre le taux d'aneuploïdie et la concentration d'atrazine, chez l'huître creuse adulte et au stade naissain, et ce dès la concentration de 0,01 mg/l, valeur pic que l'on retrouve en sortie de marais (Bouilly et al., 2002). Au sein du Laboratoire de Génétique et de Pathologie de la station IFREMER de la Tremblade d'autres facteurs environnementaux sont également étudiés. Dans le cadre du programme « Dynamo » ce sont les différentes profondeurs de culture qui sont prises en compte. La recherche sur l'effet des polluants tels que le cadmium ou le mercure sur l'aneuploïdie est particulièrement importante dans le contexte géographique du bassin de Marennes-Oléron puisque ces deux métaux lourds y sont présents.

A cause de la lourdeur et du manque de temps, je n'ai pu mener à terme une étude complète. Toutefois, pendant les trois mois de présence au LGP, j'ai participé à toutes les manipulations qui composent un protocole d'étude de l'aneuploïdie.

Il y a particulièrement trois expériences auxquelles j'ai consacré le plus de temps. La première concerne les effets du mercure sur le taux d'aneuploïdie d'adultes. La deuxième concerne les effets du cadmium sur la croissance d'une descendance au stade larvaire issue d'adultes soumis à différentes concentrations de cadmium. La troisième enfin concerne les effets de l'atrazine sur le développement larvaire.

Partie I : Etude de l'aneuploïdie chez des adultes soumis à différentes concentrations de mercure.

Introduction.

Un suivi de la qualité des eaux démontre que du mercure est présent dans le bassin de Marennes-Oléron. Ce mercure provient pour une partie de l'estuaire de la Charente. Cependant, l'apport de 12 kg/an par la Charente, ne suffit pas à expliquer les concentrations élevées du bassin. (Gonzales et al., 1991). Des travaux ont montré une relation entre la concentration en méthyl mercure dans l'organisme de certains bivalves et leur taille (Najdec et Sapunar., 1987). Il apparaît donc intéressant de voir s'il existe un effet de ce polluant sur l'aneuploïdie.

Matériel et méthodes.

1-Matériel biologique.

Les animaux sont des adultes de trois ans qui sont originaires de Normandie. Ils ont été fournis par un exploitant de la Tremblade. Ils ont été exposés pendant un mois à du méthyl-mercure, à des concentrations de 0, 50 et 250 ng/l, après une période d'acclimatation d'une semaine. La nourriture a été pendant toute la durée de l'expérience constituée de pâte d'algues. Enfin, l'oxygénation a été assurée par un système de bullage.

2-Méthode d'étude.

La méthode de préparation chromosomique retenue est la méthode de suspension cellulaire de Thiriot-Quiévreux et Ayraud (1982), elle comporte plusieurs étapes successives (détail en annexe)

2.1- Préparation du matériel biologique.

Le but de cette étape a été de bloquer les cellules qui se divisaient au stade métaphase et d'assurer la conservation des tissus.

La première étape a consisté à mettre les animaux en présence de colchicine pendant 8 heures. L'action de la colchicine, qui est un alcaloïde, est d'empêcher la formation des fibres de tubuline constituant les fuseaux achromatiques auxquels se fixent les chromosomes appariés au moment de l'anaphase. Ceux-ci demeurent dans une cellule qui ne peut plus se diviser. Cette opération a été effectuée de nuit. En effet, l'activité mitotique y est plus élevée et la colchicine est un produit photosensible.

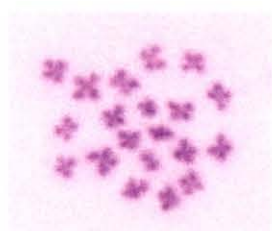
Le lendemain, les animaux ont été ouverts et disséqués afin de prélever les branchies. Ces dernières ont été plongées dans différents bains successifs. Tout d'abord les branchies ont été placées pendant 40 minutes dans une solution de citrate afin de provoquer un choc hypotonique favorisant la dispersion des chromosomes. Les bains suivants (10', 10', 20', 20'), sont composés du fixateur (éthanol absolu-acide acétique (3 :1)), qui servira à la préservation des structures internes des cellules. Le stockage des échantillons se fait au réfrigérateur.

2.2- Préparation des lames microscopiques.

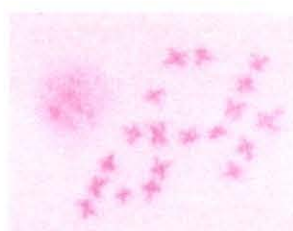
Le but de cette étape est d'étaler les cellules sur les lames porte-objets pour permettre la visualisation des métaphases au microscope.

A partir d'une branchie, il a été prélevé un petit échantillon qui a été placé dans une lame à dépression circulaire contenant de l'eau acidifiée (1/2 acide acétique, 1/2 eau distillée). L'eau acidifiée permet la libération des noyaux. Les noyaux ont été récupérés à l'aide d'une pipette pasteur. L'étalement a été effectué sur les lames placées sur une plaque chauffante réglée sur 44°C. Le détail de ces opérations est présenté en annexe.

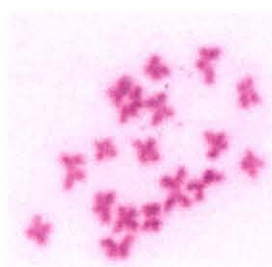
2.3-Observations microscopiques.



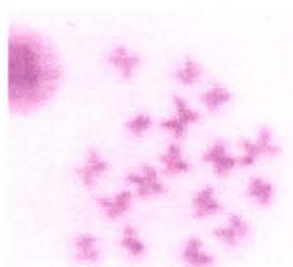
2n=20



2n=19



2n=18



2n=17

Résultats et discussion

Pour l'expérience, il y avait 6 lots comprenant chacun 10 individus. Pour obtenir des statistiques fiables, 10 individus par lot est le minimum et l'idéal serait de travailler avec 30 individus par lot.

Sur les 60 animaux, il a été réalisé une lecture pour six d'entre eux. Et il n'a pu être recensé 30 métaphases que pour seulement trois d'entre eux et ceci a nécessité la lecture de six lames. Pour les trois autres, six lames n'ont pas suffi pour obtenir les 30 métaphases requises. Il est impératif de compter 30 métaphases par individus pour que les résultats puissent être exploités statistiquement (Stallars et al, 1981 ; Wenger et al, 1984).

La première raison de ces résultats, est la faible activité mitotique chez les adultes, ce qui réduit les chances d'observer des métaphases en nombre suffisant. La seconde raison est la structure d'accueil de l'expérimentation qui n'était pas adaptée. L'aération des bacs n'était pas assurée de façon optimum et comme il n'y a pas de production de phytoplancton sur place la nourriture était constituée exclusivement de pâte d'algues.

Dans ces conditions, pour compter 30 métaphases par individu il aurait fallu faire pour chaque animal 6 lames, ce qui dans le temps prévu de mon stage était impossible.

Enfin, ces résultats mettent en avant le décalage de temps entre le début de l'expérience et les premiers résultats. Il y a deux mois (un mois dans ce cas) d'exposition au polluant, la fixation, la préparation des lames et la lecture qui permet d'obtenir des taux d'aneuploïdie et qui nécessite en moyenne une heure par animal. Le temps augmente avec le nombre d'individus.

Sachant que la faible activité mitotique pour les adultes est une constante, pour renouveler cette expérience il faudrait s'attacher à optimiser les conditions d'exposition en apportant une nourriture adéquate, et en ayant la possibilité de contrôler au mieux l'environnement afin que les huîtres soient «en pousse », donc en croissance. Il serait possible d'étudier des huîtres juvéniles qui sont normalement plus riches en métaphase.

**Partie II : Etude de la croissance pour des larves
issues d'un croisement d'individus soumis à
différentes concentrations de cadmium.**

Introduction.

Le cadmium, de part son utilisation dans la composition d'alliages, dans les accumulateurs, dans les traitements de surface les pigments et les stabilisants, justifie une production mondiale de 20 000 tonnes. De façon générale, le cadmium contenu dans les eaux a deux origines : (1) une origine atmosphérique où le polluant est sous forme d'aérosol. Les émissions sont issues de la métallurgie, de la combustion du pétrole ou de l'incinération des déchets urbains.

(2) la deuxième source de cadmium provient des fleuves et des estuaires ou celui-ci est principalement sous forme dissoute. (Marchand et Kantin, 2000.)

Le cadmium présent dans le bassin de Marennes-Oléron provient des eaux de la Gironde qui arrivent par les pertuis d'Antioche et de Maumusson. La pollution de la Gironde est due à la production de zinc par des usines situées dans l'Aveyron. Il a été déversé dans les eaux du Lot de grandes quantités de métaux par le biais des terrils non stabilisés. Le polluant suit le cours de la rivière jusqu'à la Gironde en passant par la Dordogne (Kantin.,2001). Le suivi de la croissance est l'une des étapes de l'étude de l'aneuploïdie, puisqu'il a été démontré une corrélation négative entre l'aneuploïdie et le taux de croissance dans la descendance d'huîtres cultivées *Crassostrea gigas*. (Leitão et al., 2001 a)

Matériel et méthodes.

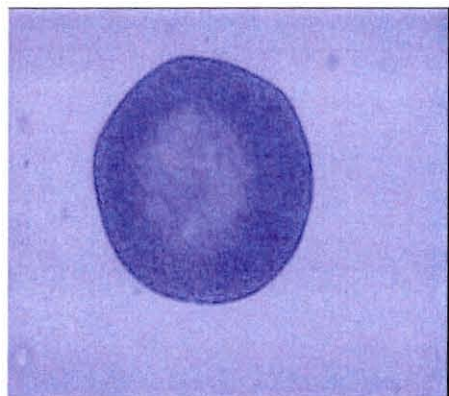
1-Géniteurs

Les animaux adultes ont été fournis par un producteur du bassin de Marennes Oléron. Ils ont été soumis à deux concentrations de cadmium : la première de 50 ng/l qui est proche des valeurs trouvées dans le milieu et la deuxième de 500 ng/l. Il a été constitué plusieurs lots comprenant chacun 70 individus : deux lots témoins (1A et 1B), deux lots exposés à 50 ng/l (2A et 2B) et deux à 500 ng/l (3A et 3B). La durée de la manipulation a été de 2 mois.

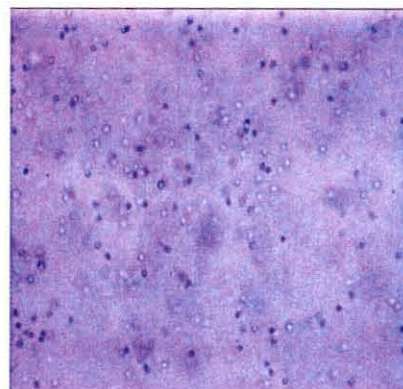
2-Croisements.

Il a été réalisé un croisement par lot, et à chaque croisement correspond deux réplicats en élevage larvaire. Les gamètes mâles ont été obtenus par scarification de la gonade («stripping»). Le sperme a été dilué dans de l'eau de mer filtrée. Sa concentration a été estimée sur cellule de Thoma (coloration préalable à l'éosine) couplé à un système d'analyse d'image (SAMBA/Comptage). Les gamètes femelles ont été prélevés suivant la même

procédure mais comptés sur cellule de Malassez (Collet 1999). Pour chacun de ces croisements, il a été mis en présence un rapport de 1 ovule pour 200 spermatozoïdes. Pour chaque lot il a été mélangé 3 millions d'ovocytes avec 600 millions de spermatozoïdes.



Ovocyte.



Spermatozoïdes.

3-Elevage larvaire.

A chaque croisement est affecté deux jarres de trente litres en élevage larvaire afin de pouvoir tester s'il y a un effet bac. Il a été ainsi obtenu 12 lots tel que le montre le tableau 1.

Lots adultes	1A		2A		3A	
Lots larvaires	1	7	2	8	3	9
Lots adultes	1B		2B		3B	
Lots larvaires	4	10	5	11	6	12

Tableau 1.



Salle d'élevage larvaire.

Trois fois par semaine, il a été effectué un échantillonnage qui a été observé à la loupe binoculaire pour constater le bon état et le bon développement des larves. Chacun des échantillons a été compté sur cellule quadrillée (Graticule Ltd). Dans le même temps le diamètre maximum a été mesuré pour 50 individus à l'aide de l'analyseur d'image (SAMBA/Morphométrie). Ces mesures ont été réalisées pour chaque lot.

A chacune de ces manipulations, l'eau des bacs a été renouvelée et il a été ajouté à titre préventif un antibiotique (érythromycine). La densité larvaire est progressivement ajustée pour suivre la croissance des animaux.

La nourriture quotidienne était composée d'algues. Les espèces utilisées sont *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans*.



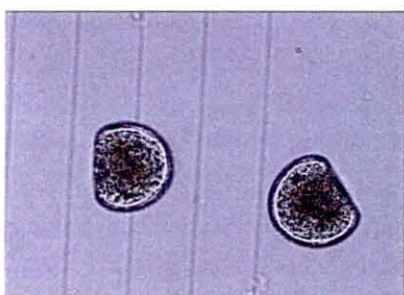
Salle de production du phytoplancton.

3 –Suivi de la croissance.

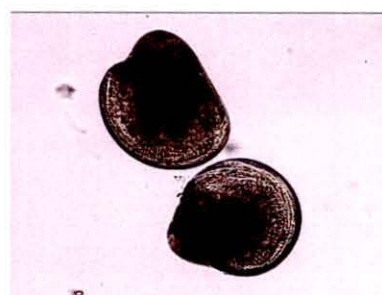
Le suivi se fait jusqu'au stade de fixation, qui est la dernière phase importante du cycle de développement de l'espèce (Huvet., 2002). A ce stade l'élevage est plus sensible.

Le diamètre maximum des larves est la donnée biométrique qui a été utilisée pour le suivi de la croissance. Les moyennes de chaque série de mesure ont été calculées et ont servi à déterminer les taux de croissance en $\mu\text{m}/\text{j}$.

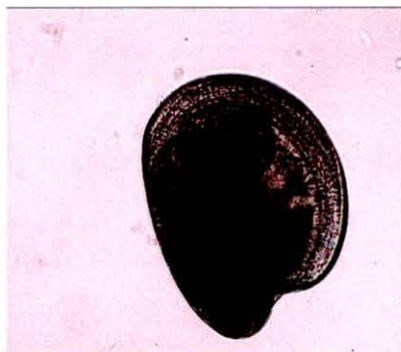
4-Différentes observations pendant le suivi de la croissance.



Larve à J1.



Larves à J15.



Larve à J20

5-Analyse statistique.

L'analyse statistique des données a été effectuée sous «STAT GRAPHIC». Les taux d'éclosion obtenus pour chaque concentration ont été traités par une analyse de variance à un facteur avec la fonction «analyse de variance» de «STAT GRAPHIC». Pour les taux de croissance, l'idée a été de les comparer pour mettre en évidence un effet sur le développement des larves. Mais avant il a fallu tester différents facteurs, à savoir l'effet jarre au niveau de l'élevage larvaire et l'effet bac au niveau de la contamination des adultes. Les régressions ont été comparées entre elles à ces différents niveaux en utilisant la fonction «Multiple Regression Analysis».

Résultats et discussion.

1-Taux d'éclosion.

Le tableau ci-après contient la probabilité qu'il y ait ou non un effet de la contamination des parents par le cadmium sur les taux de fécondation. Lorsque $P < 0.05$ l'hypothèse de l'égalité des moyennes est rejetée avec une probabilité de 95% qu'il y ait une différence significative.

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyens	F	Proba
Inter-groupes	0,203387	2	0,101694	6,03	0,0218
Intra-groupes	0,151846	9	0,0168717		
Total	0,355233	11			

Tableau : résultat de l'analyse de variance sur les taux d'éclosion.

Comme $P < 0.05$, il y a un effet du cadmium sur le taux d'éclosion des descendants des adultes exposés.

2-Croissance larvaire.

Les tableaux ci-après contiennent les probabilités qu'il y ait ou non une différence de croissance suivant le niveau d'observation où l'on se place. Il est admis qu'il existe une différence significative lorsque $P > 0.05$ et que dans ces conditions, l'effet du paramètre considéré n'est pas à prendre en compte.

Paramètre	Valeur de T	P
Jarre 1/2	5,27	0,00
Jarre 3/4	0,56	0,57
Jarre 5/6	0,73	0,47
Jarre 7/8	0,50	0,62
Jarre 9/10	-0,62	0,53
Jarre 11/12	1,21	0,23

Tableau 2 : résultat de la comparaison des croissances au niveau des jarres.

Il n'apparaît un effet jarre qu'entre les lots 1 et 2 ce qui traduit une différence de croissance larvaire entre ces deux lots.

Concentrations	Paramètre	Valeur de T	P
500	Bac 1/2	1,47577	0,14
50	Bac 1/2	0,985629	0,3243
0	Bac 1/2	-0,368765	0,7123

Tableau 3 : résultat de la comparaison des croissances au niveau des bacs qui ont servi à la contamination des parents.

Il n'apparaît aucun effet bac. Donc il est possible de comparer directement les croissances larvaires en fonction des différentes concentrations de cadmium.

Paramètre	Valeur de T	P
Concentration 0/50	0,670481	0,5025
Concentration 0/500	0,543669	0,5867

Tableau 4 : résultat de la comparaison des croissances en fonction des concentrations.

Enfin les différentes concentrations auxquelles ont été soumis les adultes n'ont eu aucun effet sur le développement de la descendance.

L'effet jarre relevé entre les lots 1 et 2 est expliqué par un problème de bullage qui a privé d'oxygénation le lot n°1 le premier jour. Celui-ci a subi des pertes importantes.

Par ailleurs, aucun effet n'a été observé tant au niveau de l'élevage larvaire qu'au niveau de la contamination des parents. Ceci révèle que les expérimentations ont été effectuées dans de bonnes conditions.

Enfin, il n'y a aucun effet du facteur concentration sur la croissance larvaire même à des concentrations de 500 µg/l, qui est une valeur 10 fois supérieure à celles trouvées dans le milieu.

3-Mortalités

Quelque soit les lots, aucune mortalité anormale n'a été à déplorer. D'autres travaux ont montré que des larves de *Crassostrea gigas* directement soumises à des concentrations de cadmium du même ordre de grandeur subissaient de plus grandes pertes (His et Robert, 1985).

**Partie III : Etude de la croissance pour des larves
soumises à différentes concentrations d'atrazine.**

Introduction.

L'essor de l'agriculture a entraîné une utilisation croissante des pesticides, que l'on retrouve pour certains dans le milieu naturel. Parmi ces produits, il y a l'atrazine, qui est un herbicide de la famille des triazines, très utilisé dans les cultures céréalières, notamment le maïs.

L'atrazine est un produit phytosanitaire qui possède des propriétés mutagènes (Hazardous Substances Data Bank, 1995). Il est surtout présent dans le milieu en période de traitement des cultures jusqu'à une concentration de 0,01 mg/l (Munsch, 1995), mais aussi en dehors des périodes d'épandage. La présence de l'atrazine dans le bassin ainsi que l'importance de l'activité conchylicole et en particulier la production de naissain (Gouletquer et Héral, 1981) pour les autres régions, rendent indispensables les travaux sur l'impact de ce polluant sur la croissance des larves de l'huître creuse. De plus, Robert et al. (1986), ont montré son impact sur la formation et la croissance des jeunes larves.

Matériel et méthodes.

1-Géniteurs.

Il s'agit de 20 adultes âgés de 2 à 3 ans, provenant de la salle de maturation. Ils ont été fournis par un exploitant du bassin.

2-Croisement.

Il a été constitué à partir de ces 20 adultes un pool de 6 mâles et 6 femelles, choisis pour la qualité de leurs gamètes. La méthodologie est la même que celle décrite dans la partie II.

3-Elevage larvaire et suivi de la croissance.

Il a été appliqué 6 concentrations d'atrazine et à chacune d'elles correspond 2 réplicats en élevage larvaire comme l'indique le tableau suivant.

Concentration	0	0,1	0,4	1	10	100
Jarres	1 et 2	3 et 4	5 et 6	7 et 8	9 et 10	11 et 12

Tableau x : la concentration est exprimée en $\mu\text{g/l}$.

Le suivi de l'élevage larvaire a été fait selon les mêmes modalités que celles vues dans la partie III et avec les mêmes matériels. Il n'a été ajouté au milieu de l'érythromycine qu'à partir de J17, où ont eu lieu les premières fixations.

4-Analyse statistique.

Les moyennes des diamètres maximum obtenues après analyse d'image, ont été comparées par une analyse de variance à un facteur.

Résultats et discussion.

1-Résultats du test F.

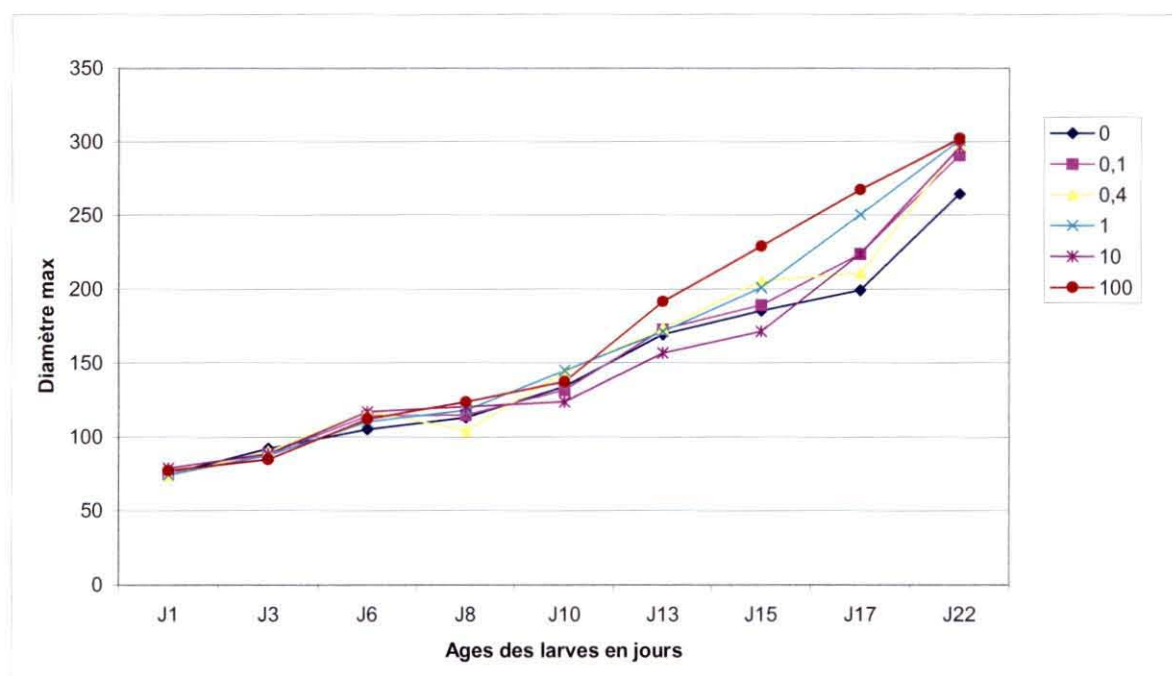
Les résultats de l'ANOVA sont consignés dans le tableau ci-dessous.

SOURCE	SC	DDL	Carrés moyens	Fcalc	Fcrit
TOTAL	489818,4	107	4577,7		
Intergroupe	3732,2	11	339,3	0,07	1,90
Intragroupe (erreur)	486086,2	96	5063,4		

Tableau : Résultats de l'ANOVA pour les croissances.

Si, la valeur de F calculé est inférieure à la valeur de F critique, l'hypothèse H0 où il y a égalité des moyennes est acceptée avec un risque $\alpha=5\%$.

Par conséquent, les croissances des larves soumises à l'atrazine dans le cadre de cette expérimentation suivent les mêmes lois, et il est possible de dire qu'aucun effet de l'atrazine n'a été mis en évidence.



Graphique : Croissances des larves soumises à différentes concentrations de cadmium.

Le graphique met en évidence des valeurs moyennes de diamètre maximum plus faibles pour les lots étant soumis aux concentrations les plus basses. En effet, pour des raisons autres que la présence d'un polluant, le développement des larves peut être modifié. Cet élevage, commencé le 25 Juin 2002, a soumis les larves à des conditions physico-chimiques plus

instables qu'au début de la période de reproduction naturelle. Il a été observé des mortalités importantes dans les lots les plus pauvres en atrazine en début d'élevage, qui ne peuvent être causées par le polluant. Toutefois, des travaux précédant ont montré des effets significatifs de l'atrazine sur la mortalité. Moragua et Tanguy (2000), ont remarqué un taux de mortalité de 60% dès la concentration de 0,1 mg/l.

Mais, comme l'indique le test statistique et les allures des courbes de croissance, le développement larvaire n'est pas affecté par l'atrazine, même à des concentrations qui n'existe pas dans le milieu. Ces résultats ne sont pas satisfaisants mais peuvent être expliqués soit par l'origine de l'atrazine utilisée soit par l'origine des animaux. Il été démontré qu'il existe des différences de croissance et de survie au stade larvaire pour des souches différentes d'une même espèce (Newkirk et al., 1977 ; Mallet et Haley, 1983). Les animaux fournis appartiennent peut être à une souche particulièrement robuste.

Conclusion générale.

Il n'a pu être obtenu aucun résultat de l'expérimentation concernant la contamination d'huîtres creuses adultes par du mercure. Différents facteurs n'ont pu être contrôlés de façon optimum comme le type de nourriture et l'oxygénation de l'eau par bullage.

Les descendants d'adultes contaminés par du cadmium n'ont montré aucune anomalie de croissance de J1 à J20. De même pour les larves directement mises en présence d'atrazine, leur croissance de J1 à J20 s'est déroulée normalement.

Toutefois, ces deux suivis de croissance sont des expérimentations faites dans un milieu protégé, qui ne présente peut être pas toutes les contraintes auxquelles doivent faire face les animaux par rapport au milieu naturel. Il est possible qu'en mer l'animal supporte l'hydrodynamisme, de plus grandes variabilité de salinité ou une disponibilité en nourriture fluctuante et que la présence d'un polluant modifie son développement.

Il a été démontré qu'il existe un impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie. Ceci sera étudié pour des animaux élevés dans le bassin de Marennes-Oléron où il existe des concentrations en atrazine pouvant atteindre 0,01 mg/l en sortie de canaux de marais.

Néanmoins, si le suivi de croissance n'a révélé aucun effet de l'atrazine sur le développement, il n'est pas exclu une action différée du polluant. En effet, les données concernant l'évolution du diamètre maximum des larves ne vont que de J1 à J20. Il est possible qu'après la fixation, le développement de l'animal soit affecté. Si tel était le cas, l'action de l'atrazine s'exercerait sur une partie du génome qui ne s'exprime qu'au delà du stade précoce, c'est à dire au stade juvénile ou adulte. Pour le vérifier il aurait fallu suivre l'évolution des diamètres maximum jusqu'à l'âge adulte.

Bibliographie

- Bouilly.K, Leitão.a, McCombie.H, Lapègue.S** ; 2002 ; Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* ; Environmental Toxicology & Chemistry Vol 22, n°1
- Collet.B** ; 199x. Bases génétiques des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique Paris-Grignon.
- Gonzales. J.L ; Jouanneau. J. M ; Dominik. J ; Boutier. B.** ; 1991. Environmental Technology
- Gouletquer.P ; Héral.M** ; 1981. Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. The ecology of *C.gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State. Oyster Ecology Workshop, Annapolis, USA :12-19.
- .Güerci A., Seonane F.N.** , 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. Mutation research 469 : 345-40.
- Gunkel.G, Streit.B** ; 1980. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancilus fluviatilis* Müll.) and a fish (*Coregonus fera* Jurine). Water Research, vol. 14 : 1573-1584.
- Huvet.A** ; 2002. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites. Thèse de doctorat de l'université François Rabelais de Tours.
- Hazardous Substances Data Bank.** ; 1995
- IFREMER.** ;2001.Suivi des teneurs en cadmium et processus conditionnant la bioaccumulation en cadmium dans les huîtres du bassin de Marennes-Oléron.
- Leitão A., Boudry P., Thiriot-Quiévreux C.**, 2001. Negative corrélation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : ten years of evidence. Aquaculture 193 : 39-48
- Leitao A., Boudry P., Mc Combie H., Gérard A., Thiriot Quiévreux C.**, 2001. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Aquatic Living Resources 14 : 233-237
- Lapègue.S, McCombie.H, Leitão.A, Heurtebise.S, Boudry.P, Thiriot.C, Gérard.A**, 2000. Etudes des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas* ; IFREMER : Programmes 3 : Gestion durables des productions ostréicoles : les apports de la génétique.
- Marchand. M; Kantin.R.** ; 2000. Contaminants chimiques en milieux aquatiques. Océanis 24 : 517-695.

- Mallet AL, Haley LE.** ;1983. Growth rates seed clam *Mercenaria mercenaria* (Linne) in an upflow nursery system and the economics of culling slow growing animals. *J. Shelfish Res.* 7(3) : 359-365.
- Moraga.D ; Tanguy.A.** ; 2000. Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.19, N°. 3 : 706-711.
- Munschy.C** ; 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de doctorat de l'université de Paris 6.
- Najdec.M ; Sapunar.J** ;1987.Total and methyl mercury content in bivalves, *Mytilus galloprovincialis* Lalarck and *Ostrea edulis* Linnaeus : relationship of biochemical composition and body size ; *Bulletin of environmental contamination and toxicology*.
- Newkirk GF, Haley LE, Waught DL, Doyle R.** ; 1977. Genetics of larvae tolerance to reduced salinities in two populations of oysters, *Crassostrea virginica*.
- Robert.R ; His.E ; Maurer.D** ; 1986.Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis* 15 : 319-325.
- Stallard.R ; Haney.N.R ; Frank.P.A ; Styron.P ;Juberg.R** ; 1981. Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring : preliminary observations. *Cytogenet. Cell* 30 :50-53.
- Thiriot-Quévieux.C ; Ayraud.N** ; 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 70 : 165-172.
- Wenger.S.L ; Golden.W.L ; Denis.S.P ; Steele.M.W** ; 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant ? *Am. J. Med Genet.* 19 :715-719.

Annexe

Aneuploïdie:

Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.

1- Solutions

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

a) Les solutions suivantes :

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

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

CITRATE : Solution de citrate de sodium à 0,9%, donc :

900 mg de citrate de sodium dans
100 ml H₂O **distillée (stockage au réfrigérateur)**

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

e.g. Les bocaux ont la capacité de 150ml et il y en a 4 :

$$150\text{ml} \times 4 = 600\text{ml}$$

Si on a 900 mg de citrate de sodium dans 100 ml H₂O distillée

On a besoin de 6 x 900 mg

$$= 5400 \text{ mg sodium citrate pour } 600 \text{ ml H}_2\text{O distillée}$$

COLCHICINE 'MERE' : Solution 'Mère' de colchicine à 0,1%, donc :

100 mg colchicine

100ml H₂O de mer filtrée (stockage au réfrigérateur)

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

100 ml solution 'fille'
= 5 ml solution 'mère'
+ 95 ml H₂O de mer avec *Isochrysis*

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

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

Si on fait 4 litres de solution 'fille'
 $4000 \text{ ml} / 100 = 40$
 $40 \times 5 \text{ ml} = 200 \text{ ml}$

Donc 200 ml de solution 'mère' est requis. Et si on a 100 mg de colchicine dans 100 ml de H₂O de mer, dans 200 ml on va avoir besoin de 200 mg.

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

b) Numéroté les bocaux qui seront utilisés.

A préparer le matin juste avant le fixation

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

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

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

$$3000/4=750$$

Donc 2250 ml éthanol absolu

Et 750 ml acide acétique glacial

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

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

Aneuploïdie:

Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.

2- Manip de nuit (automatisée).

A préparer l'après-midi ou le soir.

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

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

Dans l'exemple ci-dessus, 4000 ml de solution 'fille' est requis

Dont 200 ml de solution mère de colchicine (5%)

Et du mélange (2/1) de 2550 ml d'eau de mer filtrée/1250 ml Isochrysis,

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

Pour le matin (à préparer le soir précédent):

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

Aneuploïdie:

Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.

3- Dissection et fixation le matin

Les démarches décrites ci-dessous sont à faire suite à la manip détaillée en fiche 2: Manip de nuit. Elles sont à faire le matin suivant le traitement des huîtres à la colchicine. Pour une

visualisation du nombre de chromosomes, la manip est arrêtée entre 8 à 10 heures plus tard pour du comptage (6 heures pour du banding).

La fixation concerne les solutions suivantes:

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

Dissection

Les branchies des huîtres sont découpées dans de l'eau de mer propre et mises dans les bocaux (si manipulés en groupe) ou eppendorfs (si manipulés individuellement) ou récipient de taille adéquate avec le citrate (volume 20 x supérieur à celui du tissu étudié) pendant 40 minutes. Puis le citrate est enlevé par aspiration avec une pipette pasteur et remplacé par du fixateur.

Pour découper les branchies, l'huître est ouverte avec un scalpel et regardée avec le microscope de dissection. Le manteau et les branchies sont découpés ensemble en prenant soin de ne pas abîmer la glande digestive ni la gonade si il y en a. Les branchies (et peut-être le manteau avec!) sont enlevées ensemble puis le manteau (plus épais avec les poils) est découpé afin de garder seulement les lamelles des branchies qui sont entre les deux couches de manteau. Avant de mettre le tissu dans le citrate, 2 (ou plus selon la taille des branchies) petites coupures sont faites du haut vers le bas des branchies pour faciliter la pénétration du citrate.. Ces coupures ne sont pas faites sur la totalité mais seulement deux tiers de la largeur des branchies. Ceci permet d'éviter que les branchies ne se séparent en morceaux. Elles restent attachées les unes avec les autres à la base.

Fixation

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

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

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

Aneuploïdie:

Préparation des lames microscopiques.

1- Fixation des chromosomes

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

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

Microscope de dissection binoculaire

Une table chauffante pour lames (mis à 44°C)

Lames 'porte objets' (lavées à l'acide chlorhydrique, voir ci-dessous)

Lame avec dépression circulaire (ou petit verre de cristallisation)

Pincettes fines

Ciseaux fins

2 Pipettes pasteur et poires (et un stock de pipettes pour renouveler après chaque animal)

Eprouvettes non graduées pour les solutions d'eau acidifiée

Boîte pétri

Bol poubelle

Les solutions suivantes sont également nécessaires :

1/1 Acide Acétique/ Eau distillée

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

Méthodologie

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

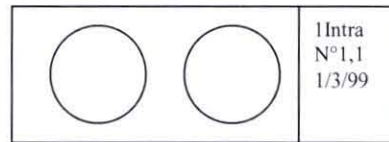
Les bocal ou tubes eppendorf contenant les branchies sont retirés du réfrigérateur. Une branchie est mise sur la boîte de pétri avec son fixateur et un petit morceau est découpé. Ce morceau mesure 2-3mm de longueur. Les extrémités des branchies sont plus riches en mitoses (lieux d'attache des 4 lamelles).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

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

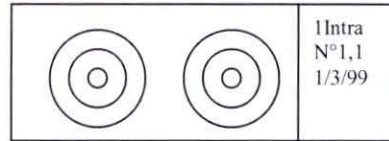
Le morceau découpé est séché sur de papier absorbant et mis sur la lame avec la dépression avec le mélange 1/1 Acide/Eau de façon à remplir cette dépression (Utilisation de la pipette Pasteur n°1). La lame est posée sous le microscope de dissection. Après quelques minutes il apparaît de petites bulles autour du morceau. Le morceau peut être agité dans la solution avec la pince pour libérer ces bulles. Enfin le morceau, qui est devenu transparent, est enlevé et jeté. Le liquide restant contient les noyaux. Le liquide est aspiré avec une pipette pasteur (Pipette Pasteur n°2) et laissé tombé sur la lame de la manière suivante:

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

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



A



B

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

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

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

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

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

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

Aneuploidie:
Préparation des lames microscopiques.
2- Coloration des lames

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

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

Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

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

Méthodologie 1: Préparation du tampon phosphate.

Le tampon est composé de deux solutions stock qui sont mélangées afin de produire une solution à pH 6,8.

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

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

Le mélange est fait à partir de 51ml de A et 25ml environ de solution B et le pH est mesuré avec le pHmètre. De la solution B (prévoir 25 autres ml) est ajoutée progressivement jusqu'à

ce que le pH voulu (6.8) soit atteint. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour donner 200ml au total.

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

Les solutions de base sont stockées.

Méthodologie 2: Coloration des lames.

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

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

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

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

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

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