



**Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006  
Convention 2002-RPCA212 "Génétique"  
Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les  
apports de la génétique  
Année 2002**

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

**K. Bouilly , H. McCombie, A. Leitao, S. Lapège**



**IFREMER  
Laboratoire de Génétique et Pathologie**

**Ronce-Les-Bains  
17390 La Tremblade  
Tél. 05 46 36 98 36  
Fax. 05 46 36 37 51**



## SOMMAIRE

<b>1. CONTEXTE DES ETUDES MENEES EN 2002 .....</b>	<b>4</b>
<b>2. IMPACT DE L'ATRAZINE SUR L'ANEUPLOÏDIE CHEZ LES HUITRES CRASSOSTREA GIGAS. 5</b>	<b>5</b>
2.1. MATERIEL ET METHODES .....	5
2.1.1. <i>Origine des huîtres étudiées</i> .....	5
2.1.2. <i>Protocole expérimental</i> .....	5
2.1.3. <i>Fécondations</i> .....	5
2.1.4. <i>Elevage larvaire</i> .....	6
2.1.5. <i>Etude de l'aneuploïdie</i> .....	6
2.1.6. <i>Analyse des données</i> .....	7
2.2. RESULTATS .....	7
2.2.1. <i>Persistance de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie à la génération suivante</i> .....	7
2.2.2. <i>Persistance de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie dans le temps</i> .....	8
2.2.3. <i>Impact du cadmium sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse Crassostrea gigas</i> .....	10
<b>3. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>13</b>
<b>4. ANNEXES .....</b>	<b>14</b>
4.1. RESULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVES CHEZ LES DESCENDANTS D'HUITRES CRASSOSTREA GIGAS EXPOSEES A L'ATRAZINE.....	14
4.2. RESULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVES CHEZ LES HUITRES CRASSOSTREA GIGAS JUVENILES EXPOSEES A L'ATRAZINE PENDANT TROIS MOIS ET DEMI ET REMIS DANS DES CONDITIONS NON POLLUEES PENDANT DEUX MOIS ET DEMI.....	20
4.3. TAUX D'ECLOSION DES LARVES ISSUES DE CROISEMENTS D'HUITRES EXPOSEES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CADMIUM. ....	23
4.4. TAILLES DES LARVES ( $\mu\text{M}$ ) EN FONCTION DES DIFFERENTS LOTS ET DES JOURNEES D'ELEVAGE (J).....	24

## 1. Contexte des études menées en 2002

Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ( $2n = 19, 18$  ou même  $17$  au lieu de  $2n = 20$ ). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial. Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les "lots de queue", c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre plus de 30 %. Cette corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite à de nombreuses reprises (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitão *et al.*, 2001a ; Zouros *et al.*, 1996).

Bien que les causes environnementale et /ou génétique de l'aneuploïdie restent encore largement inconnues, des études récentes ont permis de poser l'hypothèse d'une base génétique large dans la détermination de ce caractère (Leitão *et al.*, 2001b). De plus, un effet toxique direct de l'atrazine (herbicide couramment utilisé dans la région) sur le génome d'une population d'huîtres creuses a été mis en évidence en milieu contrôlé (Bouilly *et al.*, 2003). Nous nous sommes alors intéressés à l'étude de la persistance de cet impact dans le temps (sur des animaux remis dans des conditions normales, et sur la génération suivante). De plus, l'impact du cadmium, métal lourd pouvant être présent à des concentrations non négligeables dans la région, a été également étudié selon la même approche.

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

### 2.1. Matériel et Méthodes

#### 2.1.1. Origine des huîtres étudiées

Des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, âgées d'environ 3 ans et demi, provenant de Bretagne et étant en claire sur le bassin de Marennes-Oléron, avaient été placées dans le conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade. Ces huîtres ont été reproduites afin d'étudier leur descendance. Du naissain, provenant d'un croisement qui avait été effectué au sein de l'écloserie de La Tremblade, avait été mis dans les mêmes conditions que les huîtres adultes. Ce naissain, après contamination à l'atrazine pendant trois mois et demi, a été replacé dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi.

#### 2.1.2. Protocole expérimental

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

L'atrazine avait été fournie par l'INRA de St-Laurent-de-la-Prée avec une concentration de 500 g/l. Le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas, au laboratoire de l'U. R. Qualité des eaux, avait réalisé régulièrement des analyses d'atrazine et de ses produits de dégradation à partir de prélèvements d'eau de chaque lot tout au long de l'expérience. Chaque bac contenait 157 litres d'eau de mer. Cette eau, ainsi que l'atrazine étaient renouvelées chaque jour. Les bacs ainsi que les filtres biologiques étaient vidés puis remplis en eau chaude ( $19,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). 157ml d'atrazine à 10 mg/l et à 100 mg/l dilués dans 5 litres d'eau de mer étaient rajoutés dans les lots 2A, 2B et 3A, 3B respectivement. Les huîtres avaient été nourries quotidiennement avec pour chaque lot: 8 litres d'*Isochrysis galbana* à  $6.10^6$  cellules/ml et 3,5 litres de *Tetraselmis suecica* à  $1,5.10^6$  cellules/ml.

#### 2.1.3. Fécondations

Pour chacun des 6 lots, des fécondations ont été réalisées à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Les gamètes de chaque animal mâture ont été observés au microscope afin de choisir 6 mâles et 6 femelles ayant la meilleure activité reproductrice. Les gonades de chaque individu ont été scarifiées afin de récupérer les gamètes dans des béchers. Les gamètes ont ensuite été filtrés. Les gamètes mâles ont été dilués avec de l'éosine puis placés sur une cellule de Thoma avant d'être dénombrés. Les gamètes femelles ont également été dénombrés après avoir été disposés sur des cellules de Mallasez. Les fécondations ont eu lieu dans des béchers en verre d'un litre contenant, pour chaque lot, de l'eau de mer filtrée, 3 millions d'ovocytes et 600 millions de spermatozoïdes. Des réplicats de chaque lot ont été réalisés. Le développement s'est poursuivi dans des jarres de 30 l en salle d'élevage larvaire. Les

croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été identifiés lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 respectivement et leurs réplicats: lots 7, 8, 9, 10, 11 et 12 respectivement.

#### **2.1.4. Elevage larvaire**

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

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

Les préparations chromosomiques ont été effectuées selon la méthode de suspension cellulaire de Thiriot-Quévieux et Ayraud (1982). Cette méthode consiste en les étapes suivantes:

##### Arrêt des cellules en métaphase

Afin d'étudier l'aneuploïdie, les animaux sont tout d'abord incubés dans une solution de colchicine diluée dans de l'eau de mer à 0,005%. La colchicine est un alcaloïde qui détruit la tubuline inhibant ainsi la formation des fibres du fuseau achromatique auxquelles se fixent les centromères de chaque chromosome et empêchant de cette façon l'ascension anaphasique. La colchicine permet donc le blocage en métaphase des mitoses. Le temps d'action de la colchicine varie de 7 à 8 heures. Cette expérience se déroule la nuit car les huîtres ont une plus grande activité mitotique et donc une plus grande filtration et absorption de colchicine. Les huîtres sont ensuite disséquées afin de récupérer les branchies.

##### Choc hypotonique

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

##### Fixation

Les suspensions cellulaires sont ensuite fixées par plusieurs bains successifs d'éthanol absolu-acide acétique (3: 1) (10/10/20/20 minutes) pour préserver les structures internes des cellules.

##### Exécution des préparations chromosomiques

De l'eau acidifiée est ajoutée à une branchie ou à un morceau de branchie selon la taille afin de faciliter la libération des noyaux. La suspension cellulaire ainsi obtenue est étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm environ sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. La suspension cellulaire est aspirée puis les lames obtenues sont séchées à l'air.

### Coloration

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

#### **2.1.6. Analyse des données**

Le pourcentage d'aneuploïdie est estimé en comptant 30 métaphases (directement au microscope optique Olympus à l'objectif 40) choisies au hasard par individu montrant un étalement chromosomique similaire. Nous considérons comme aneuploïdes les cellules présentant  $2n = 19, 18$  ou  $17$  chromosomes. Pour chaque lot, un minimum de 10 individus sera étudié. 30 métaphases par individu représente le nombre statistique minimal habituellement accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984). Dans notre étude, la probabilité que les cellules aneuploïdes soient le résultat d'artefacts de la méthode de suspension cellulaire est réduite par le nombre élevé de métaphases.

## **2.2. Résultats**

### **2.2.1. Persistance de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie à la génération suivante**

Les descendances des huîtres *Crassostrea gigas* ayant été exposées aux différentes concentrations d'atrazine n'ont pas montré de différence au niveau de leur croissance larvaire. Toutefois, la présence d'atrazine dans le milieu où étaient les géniteurs a montré un effet sur le taux d'éclosion (Lapègue *et al.*, 2001).

Pour la descendance d'huîtres contaminées par l'atrazine, nous avons étudié 30 huîtres par lot. Les lots dont les parents ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 (A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3 (A et B, 0,1 mg/l) ont varié de 11,44 à 12,78%, 15,67 à 16,44% et 14,89 à 16,89% respectivement (Annexe 4.1., Figure 1). Des analyses statistiques ont aussi révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F = 0,711$ ;  $P = 0,400$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F = 6,503$ ;  $P = 0,002$ ).

Nous avons aussi souhaité comparer les résultats de la descendance avec ceux obtenus avec les parents (Figure 1). Pour ces derniers, 10 huîtres par lot avaient été étudiées. L'analyse de variance à trois facteurs a montré que le taux d'aneuploïdie n'était pas statistiquement différent entre les parents et les descendants ( $F = 0,085$ ;  $P = 0,771$ ), qu'il existait bien une différence significative entre les traitements ( $F = 18,516$ ;  $P < 0,000$ ) et que les réplicats n'étaient pas statistiquement différents ( $F = 0,492$ ;  $P = 0,484$ ).

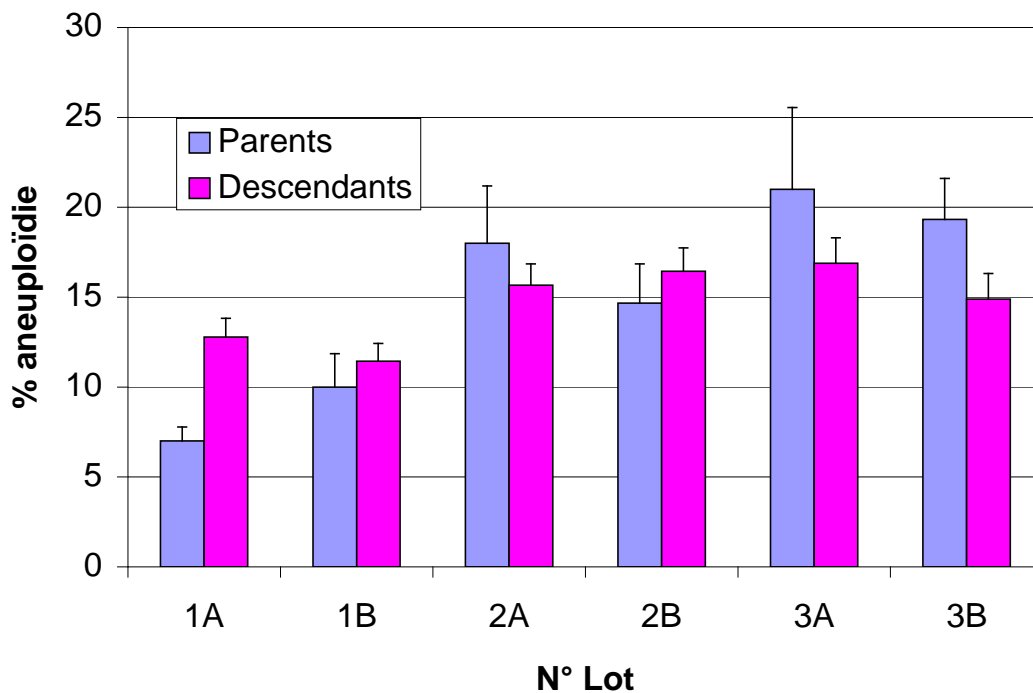


Figure 1: Comparaison entre le pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées à l'atrazine pendant deux mois et celui de leur descendance en fonction du lot: lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l).

### 2.2.2. Persistance de l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie dans le temps

Nous avons étudié 14 animaux par lot et nous avons fait des réplicats pour chaque traitement. Le taux d'aneuploïdie de ces animaux a été évalué afin de savoir si l'effet observé (Bouilly *et al.*, 2003) persiste dans le temps. Les lots qui ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 (A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3 (A et B, 0,1 mg/l) varient de 10,2 à 10,5%, 16 à 16,7% et 19 à 22,9% respectivement (Annexe 4.2., Figure 2). Des analyses statistiques ont révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ( $F = 0,416$ ;  $P = 0,521$ ) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ( $F = 17,242$ ;  $P < 0,001$ ).



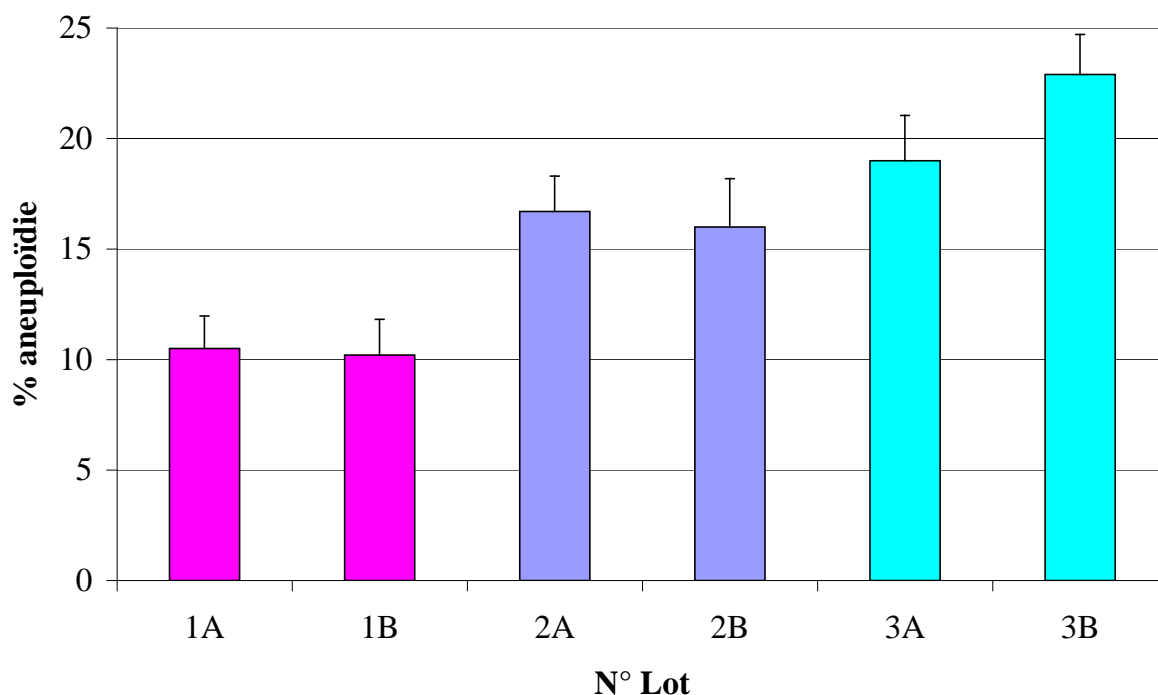
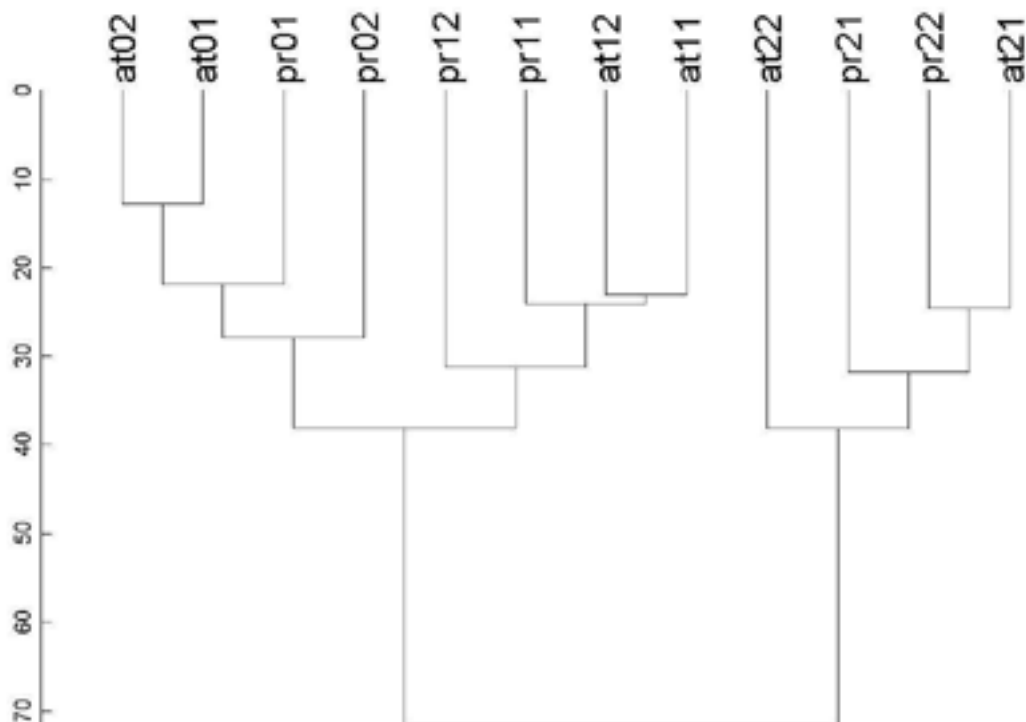


Figure 2: Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine pendant trois mois et demi puis remises dans des conditions non polluées pendant deux mois en fonction du lot: lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l).

Nous avons aussi souhaité comparer les résultats obtenus avec le naissain exposé à l'atrazine pendant trois mois et demi avec ceux obtenus après avoir remplacé la quantité restante de naissain dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi (Figure 3). L'étude de l'aneuploïdie du naissain exposé à l'atrazine pendant trois mois et demi avait porté sur 10 animaux par lot. Nous avons permuté les données et réalisé une HCA (hierarchical clustering analysis) avec une distance euclidienne simple métrique. Après la remise en eau propre, les valeurs d'aneuploïdie des groupes ayant subi des traitements d'atrazine restent plus proches des valeurs de leur groupe que des valeurs du groupe contrôle (qui a toujours été en eau propre). Ce résultat nous montre que l'effet observé au bout de trois mois et demi a persisté même après remise dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi.



**Figure 3:** Dendrogramme de comparaison du naissain d'huîtres *Crassostrea gigas* exposé pendant trois mois et demi à l'atrazine (at) et du naissain remis dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi (pr).

Légende: Les premiers chiffres, 0, 1, 2 représentent les lots 1 (0 mg/l), 2 (0,01 mg/l) et 3 (0,1 mg/l) respectivement. Les seconds chiffres, 1, 2 représentent les répliquats A et B respectivement.

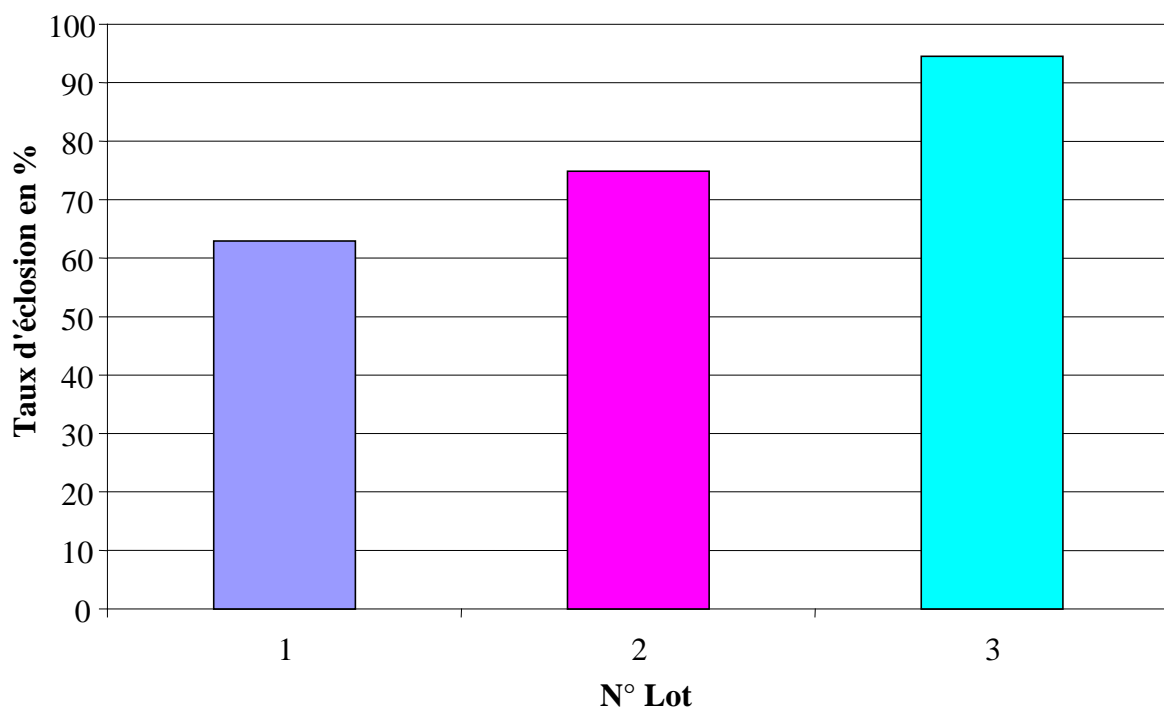
### 2.2.3. Impact du cadmium sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Le cadmium est un des métaux lourds le plus fortement retrouvé dans le bassin de Marennes-Oléron. Nous savons que les huîtres bioaccumulent ce polluant dans leurs tissus donc nous aimerions savoir si ce facteur environnemental pourrait aussi avoir un impact sur le génome des huîtres *Crassostrea gigas*. Pour cela, nous avons suivi le même protocole établi pour l'atrazine. Six lots ont été établis: 3 lots (un lot témoin (lot 1), un lot représentant la valeur pic retrouvée dans le bassin de Marennes-Oléron: 50 ng/l (lot 2) et un lot représentant une valeur dix fois supérieure: 500 ng/l (lot 3)) et leurs répliquats.

Le taux d'aneuploïdie sera évalué sur des animaux aux stades adulte et juvénile après au moins deux mois d'exposition au cadmium. Dans chaque lot étudié, le cadmium sera quantifié. Les adultes ont été exposés au cadmium pendant deux mois. Cette durée correspond au temps de maturation des huîtres. Les animaux évoluaient dans un circuit fermé avec renouvellement d'eau, de cadmium et de nourriture chaque jour. Les animaux ont été fixés au mois de mai. L'impact du cadmium sur la mortalité a été évalué. Les taux de mortalité dans les lots 1, 2 et 3 étaient de 27%, 39% et 18% respectivement. Il semblerait donc que le cadmium n'ait pas d'impact sur la mortalité aux concentrations testées. Des croisements ont été établis fin mai afin d'étudier l'impact sur la descendance. L'annexe 4.3. et la figure 4 montrent les taux d'éclosion en fonction des différents traitements réalisés sur les parents. Au

vu des résultats, il semblerait qu'il y ait eu un effet du cadmium sur le taux d'éclosion de larves dont les parents ont été contaminés au cadmium. Un suivi de la croissance pendant le développement larvaire a été réalisé (Annexe 4.4., Figure 5). Il semblerait qu'il n'y ait pas eu d'impact de la contamination au cadmium des parents sur la croissance des larves. Actuellement, la descendance est au stade juvénile. Elle a été transférée de micronurserie en salle de maturation puis en claire.

Des juvéniles ont été exposés au cadmium pendant trois mois et demi. Les mêmes concentrations de cadmium que pour les huîtres adultes ont été choisies. Ces juvéniles ont aussi évolué dans un circuit fermé avec renouvellement d'eau, de cadmium et de nourriture chaque jour (Figure 6). La fixation de 30 huîtres juvéniles par lot a été réalisée. L'impact du cadmium sur la mortalité des huîtres juvéniles a été évalué. Les taux de mortalité dans les lots 1, 2 et 3 étaient de 23%, 33% et 16% respectivement. Le constat fait précédemment sur les huîtres adultes semble donc se confirmer. Si un impact est observé sur le taux d'aneuploïdie, nous regarderons aussi si l'effet persiste dans le temps.



**Figure 4:** Taux d'éclosion en pourcentage des descendance d'huîtres *Crassostrea gigas* contaminées au cadmium en fonction du lot: lot 1 (0 ng/l), lot 2 (50 ng/l) et lot 3 (500 ng/l).



Figure 5: Taille des larves en µm en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.



Figure 6: Huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées au cadmium pendant trois mois et demi.

### 3. Bibliographie

- Bouilly K., Leitão A., McCombie H., Lapègue S., 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(1): 219-223.
- Lapègue S., McCombie H., Leitão A., Heurtebise S., Boudry P., Thiriote C., Gérard A., 2001. Etudes des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Rapport Contrat Région Poitou Charentes 2001. Programme 3: Gestion durable des productions ostréicoles: les apports de la génétique.
- Leitão A., Boudry P., Thiriote-Quévieux C., 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193:39-48.
- Leitão A., Boudry P., McCombie H., Gerard A., Thiriote-Quévieux C., 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic living resources* 14:233-237.
- Stallard R., Haney N.R., Frank P.A., Styron P., Juberg R.C., 1981. Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. *Cytogenet Cell Genet* 30:50-53.
- Thiriote-Quévieux C., Ayraud N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Marine Biology* 70:165-172.
- Thiriote-Quévieux C., Noël T., Bougrier S., Dallot S., 1988. Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75:89-96.
- Thiriote-Quévieux C., Pogson G.H., Zouros E., 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35:39-45.
- Wenger S.L., Golden W.L., Dennis S.P., Steele M.W., 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Am J Med Genet* 19:715-719.
- Zouros E., Thiriote-Quévieux C., Kotoulas G., 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genetic Research* 68:109-116.

## 4. Annexes

### 4.1. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les descendants d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à l'atrazine.

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
1A	1	29	1	0	0	1	3,333333333		1
1A	2	28	1	0	1	2	6,666666667		1
1A	3	24	3	1	2	6	20		1
1A	4	28	1	1	0	2	6,666666667		1
1A	5	27	1	2	0	3	10		1
1A	6	25	5	0	0	5	16,66666667		1
1A	7	27	1	2	0	3	10		1
1A	8	25	4	1	0	5	16,66666667		1
1A	9	27	3	0	0	3	10		1
1A	10	26	2	2	0	4	13,33333333		1
1A	11	22	7	1	0	8	26,66666667		1
1A	12	27	1	1	1	3	10		1
1A	13	28	2	0	0	2	6,666666667		1
1A	14	27	1	1	1	3	10		1
1A	15	23	3	2	2	7	23,33333333		1
1A	16	24	2	2	2	6	20		1
1A	17	24	3	1	2	6	20		1
1A	18	26	1	3	0	4	13,33333333		1
1A	19	23	5	2	0	7	23,33333333		1
1A	20	28	2	0	0	2	6,666666667		1
1A	21	26	3	0	1	4	13,33333333		1
1A	22	28	1	0	1	2	6,666666667		1
1A	23	27	2	1	0	3	10		1
1A	24	27	0	2	1	3	10		1
1A	25	26	2	2	0	4	13,33333333		1
1A	26	26	1	2	1	4	13,33333333		1
1A	27	27	1	1	1	3	10		1
1A	28	26	4	0	0	4	13,33333333		1
1A	29	27	1	1	1	3	10		1
1A	30	27	0	1	2	3	10	<b>12,78</b>	1

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
1B	1	26	2	1	1	4	13,33333333		1
1B	2	25	5	0	0	5	16,66666667		1
1B	3	27	3	0	0	3	10		1
1B	4	27	2	0	1	3	10		1
1B	5	28	0	1	1	2	6,66666667		1
1B	6	27	2	0	1	3	10		1
1B	7	27	2	0	1	3	10		1
1B	8	25	2	2	1	5	16,66666667		1
1B	9	30	0	0	0	0	0		1
1B	10	27	2	1	0	3	10		1
1B	11	27	1	1	1	3	10		1
1B	12	26	1	2	1	4	13,33333333		1
1B	13	26	3	1	0	4	13,33333333		1
1B	14	27	1	0	2	3	10		1
1B	15	26	2	1	1	4	13,33333333		1
1B	16	25	3	1	1	5	16,66666667		1
1B	17	29	1	0	0	1	3,33333333		1
1B	18	26	3	0	1	4	13,33333333		1
1B	19	24	6	0	0	6	20		1
1B	20	26	0	2	2	4	13,33333333		1
1B	21	26	1	3	0	4	13,33333333		1
1B	22	29	1	0	0	1	3,33333333		1
1B	23	26	3	1	0	4	13,33333333		1
1B	24	22	4	3	1	8	26,66666667		1
1B	25	27	1	1	1	3	10		1
1B	26	28	1	1	0	2	6,66666667		2
1B	27	27	1	1	1	3	10		1
1B	28	29	1	0	0	1	3,33333333		1
1B	29	27	1	2	0	3	10		1
1B	30	25	2	1	2	5	16,66666667	<b>11,44</b>	1

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
2A	1	27	1	0	2	3	10		1
2A	2	27	1	1	1	3	10		1
2A	3	25	5	0	0	5	16,66666667		1
2A	4	27	2	0	1	3	10		1
2A	5	27	2	0	1	3	10		1
2A	6	27	2	0	1	3	10		1
2A	7	23	4	1	2	7	23,33333333		1
2A	8	26	3	0	1	4	13,33333333		1
2A	9	27	2	1	0	3	10		1
2A	10	21	6	3	0	9	30		1
2A	11	28	1	1	0	2	6,66666667		1
2A	12	25	3	2	0	5	16,66666667		1
2A	13	26	2	2	0	4	13,33333333		1
2A	14	26	3	0	1	4	13,33333333		1
2A	15	25	4	1	0	5	16,66666667		1
2A	16	23	4	3	0	7	23,33333333		1
2A	17	22	4	2	2	8	26,66666667		1
2A	18	25	3	2	0	5	16,66666667		1
2A	19	26	2	2	0	4	13,33333333		1
2A	20	26	3	1	0	4	13,33333333		1
2A	21	26	3	0	1	4	13,33333333		1
2A	22	24	3	2	1	6	20		1
2A	23	27	2	1	0	3	10		1
2A	24	26	2	0	2	4	13,33333333		1
2A	25	26	1	3	0	4	13,33333333		1
2A	26	27	3	0	0	3	10		1
2A	27	21	7	0	2	9	30		1
2A	28	22	4	4	0	8	26,66666667		1
2A	29	24	3	1	2	6	20		1
2A	30	27	3	0	0	3	10	<b>15,67</b>	1



Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
2B	1	27	1	1	1	3	10		1
2B	2	26	2	2	0	4	13,33333333		2
2B	3	26	1	2	1	4	13,33333333		1
2B	4	29	0	0	1	1	3,33333333		1
2B	5	28	1	1	0	2	6,66666667		1
2B	6	22	4	0	4	8	26,66666667		1
2B	7	27	2	1	0	3	10		1
2B	8	25	3	0	2	5	16,66666667		1
2B	9	24	3	2	1	6	20		1
2B	10	24	2	2	2	6	20		1
2B	11	23	5	0	2	7	23,33333333		1
2B	12	28	1	0	1	2	6,66666667		2
2B	13	23	4	1	2	7	23,33333333		1
2B	14	26	3	0	1	4	13,33333333		1
2B	15	26	0	3	1	4	13,33333333		1
2B	16	24	1	3	2	6	20		1
2B	17	27	1	1	1	3	10		1
2B	18	24	2	3	1	6	20		1
2B	19	23	5	2	0	7	23,33333333		1
2B	20	25	3	2	0	5	16,66666667		1
2B	21	23	4	3	0	7	23,33333333		1
2B	22	25	5	0	0	5	16,66666667		1
2B	23	19	6	2	3	11	36,66666667		1
2B	24	27	3	0	0	3	10		1
2B	25	25	4	1	0	5	16,66666667		1
2B	26	25	2	0	3	5	16,66666667		1
2B	27	23	2	3	2	7	23,33333333		1
2B	28	24	4	2	0	6	20		1
2B	29	27	1	2	0	3	10		1
2B	30	27	0	2	1	3	10	<b>16,44</b>	1

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
3A	1	27	2	1	0	3	10		1
3A	2	26	2	0	2	4	13,33333333		1
3A	3	22	3	3	2	8	26,66666667		1
3A	4	27	2	1	0	3	10		1
3A	5	23	5	2	0	7	23,33333333		1
3A	6	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3A	7	27	3	0	0	3	10		1
3A	8	25	3	1	1	5	16,66666667		1
3A	9	22	7	0	1	8	26,66666667		1
3A	10	21	3	5	1	9	30		1
3A	11	27	2	0	1	3	10		1
3A	12	23	6	1	0	7	23,33333333		1
3A	13	28	1	0	1	2	6,66666667		1
3A	14	23	4	1	2	7	23,33333333		1
3A	15	24	2	2	2	6	20		1
3A	16	23	6	1	0	7	23,33333333		1
3A	17	22	4	2	2	8	26,66666667		1
3A	18	22	6	0	2	8	26,66666667		1
3A	19	29	0	1	0	1	3,33333333		1
3A	20	24	3	2	1	6	20		1
3A	21	24	4	1	1	6	20		1
3A	22	29	1	0	0	1	3,33333333		1
3A	23	27	2	0	1	3	10		1
3A	24	25	3	2	0	5	16,66666667		2
3A	25	22	6	2	0	8	26,66666667		1
3A	26	26	3	1	0	4	13,33333333		1
3A	27	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3A	28	28	0	1	1	2	6,66666667		1
3A	29	27	3	0	0	3	10		1
3A	30	25	4	1	0	5	16,66666667	<b>16,89</b>	1

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
3B	1	27	1	1	1	3	10		1
3B	2	29	1	0	0	1	3,333333333		1
3B	3	27	1	1	1	3	10		1
3B	4	25	3	1	1	5	16,66666667		1
3B	5	27	0	0	3	3	10		1
3B	6	25	2	1	2	5	16,66666667		1
3B	7	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3B	8	26	0	1	3	4	13,33333333		1
3B	9	26	3	1	0	4	13,33333333		1
3B	10	27	3	0	0	3	10		1
3B	11	20	5	4	1	10	33,33333333		1
3B	12	28	1	1	0	2	6,666666667		2
3B	13	27	1	2	0	3	10		1
3B	14	25	3	2	0	5	16,66666667		2
3B	15	21	5	3	1	9	30		1
3B	16	27	3	0	0	3	10		1
3B	17	24	4	2	0	6	20		1
3B	18	26	3	1	0	4	13,33333333		1
3B	19	26	2	2	0	4	13,33333333		1
3B	20	26	2	2	0	4	13,33333333		1
3B	21	27	1	1	1	3	10		1
3B	22	27	2	0	1	3	10		1
3B	23	27	1	2	0	3	10		1
3B	24	25	4	0	1	5	16,66666667		1
3B	25	27	2	1	0	3	10		1
3B	26	27	1	2	0	3	10		1
3B	27	28	2	0	0	2	6,666666667		1
3B	28	22	7	0	1	8	26,66666667		1
3B	29	22	4	3	1	8	26,66666667		1
3B	30	20	5	4	1	10	33,33333333	<b>14,89</b>	2

**4.2. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les huîtres *Crassostrea gigas* juvéniles exposées à l'atrazine pendant trois mois et demi et remis dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi.**

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Moyenne	Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie		
1A	2	25	2	2	1	5	16,66666667	10,5	1
1A	3	28	1	0	1	2	6,66666667		1
1A	4	23	4	1	2	7	23,33333333		1
1A	5	28	2	0	0	2	6,66666667		1
1A	6	28	0	2	0	2	6,66666667		1
1A	7	29	0	0	1	1	3,33333333		1
1A	8	26	2	1	1	4	13,33333333		1
1A	9	27	1	1	1	3	10		1
1A	10	27	2	0	1	3	10		1
1A	11	29	0	1	0	1	3,33333333		1
1A	12	28	0	0	2	2	6,66666667		1
1A	13	26	1	0	3	4	13,33333333		1
1A	14	26	2	2	0	4	13,33333333		1
1A	15	26	2	1	1	4	13,33333333		1
1B	2	29	1	0	0	1	3,33333333		10,2
1B	3	27	2	1	0	3	10	1	
1B	4	28	1	0	1	2	6,66666667	1	
1B	5	29	1	0	0	1	3,33333333	1	
1B	6	25	2	2	1	5	16,66666667	1	
1B	7	27	2	1	0	3	10	1	
1B	8	29	0	0	1	1	3,33333333	1	
1B	9	27	1	2	0	3	10	1	
1B	10	25	2	2	1	5	16,66666667	1	
1B	11	24	3	2	1	6	20	1	
1B	12	25	3	2	0	5	16,66666667	1	
1B	13	28	1	0	1	2	6,66666667	1	
1B	14	29	1	0	0	1	3,33333333	1	
1B	15	25	5	0	0	5	16,66666667	1	

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne étudiées
2A	2	23	3	2	2	7	23,33333333	1
2A	3	24	3	2	1	6	20	1
2A	4	21	4	2	3	9	30	1
2A	5	24	2	2	2	6	20	1
2A	6	25	2	2	1	5	16,66666667	1
2A	7	25	1	3	1	5	16,66666667	1
2A	8	26	3	1	0	4	13,33333333	1
2A	9	25	1	3	1	5	16,66666667	1
2A	10	25	2	3	0	5	16,66666667	1
2A	11	25	3	1	1	5	16,66666667	1
2A	12	28	2	0	0	2	6,66666667	1
2A	13	26	3	1	0	4	13,33333333	1
2A	14	25	2	2	1	5	16,66666667	1
2A	15	28	2	0	0	2	6,66666667	16,7
2B	2	27	2	1	0	3	10	1
2B	3	21	3	4	2	9	30	1
2B	4	26	1	0	3	4	13,33333333	1
2B	5	25	1	2	2	5	16,66666667	1
2B	6	29	1	0	0	1	3,33333333	1
2B	7	26	2	1	1	4	13,33333333	1
2B	8	25	3	2	0	5	16,66666667	1
2B	9	27	2	1	0	3	10	1
2B	10	26	1	2	1	4	13,33333333	1
2B	11	24	2	3	1	6	20	1
2B	12	28	1	0	1	2	6,66666667	1
2B	13	22	2	5	1	8	26,66666667	1
2B	14	26	1	2	1	4	13,33333333	1
2B	15	21	5	3	1	9	30	16,0

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Nb lames	
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	étudiées
3A	2	28	1	1	0	2	6,66666667	<b>19,0</b>	1
3A	3	23	4	2	1	7	23,33333333		1
3A	4	25	3	0	2	5	16,66666667		1
3A	5	25	4	0	1	5	16,66666667		1
3A	6	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3A	7	22	7	1	0	8	26,66666667		1
3A	8	22	6	2	0	8	26,66666667		1
3A	9	26	2	0	2	4	13,33333333		1
3A	10	19	3	6	2	11	36,66666667		1
3A	11	26	3	0	1	4	13,33333333		1
3A	12	23	4	2	1	7	23,33333333		1
3A	13	26	4	0	0	4	13,33333333		1
3A	14	26	3	0	1	4	13,33333333		1
3A	15	24	4	1	1	6	20		1
3B	2	27	2	1	0	3	10		<b>22,9</b>
3B	3	23	2	3	2	7	23,33333333	1	
3B	4	24	5	1	0	6	20	1	
3B	5	21	4	4	1	9	30	1	
3B	6	21	6	1	2	9	30	1	
3B	7	25	3	1	1	5	16,66666667	1	
3B	8	22	1	3	4	8	26,66666667	1	
3B	9	22	3	2	3	8	26,66666667	1	
3B	10	20	7	2	1	10	33,33333333	1	
3B	11	23	4	2	1	7	23,33333333	1	
3B	12	26	3	1	0	4	13,33333333	1	
3B	13	25	3	1	1	5	16,66666667	1	
3B	14	22	3	4	1	8	26,66666667	1	
3B	15	23	4	1	2	7	23,33333333	1	

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

<b>LOT</b>	<b>Nombre d'ovocytes</b>	<b>Nombre de larves à J1</b>	<b>Taux d'éclosion en %</b>
1	3000000	1228448	40,95
2	3000000	2262931	75,43
3	3000000	2528017	84,27
4	3000000	1590517	53,02
5	3000000	2534483	84,48
6	3000000	3000000	100,00
7	3000000	1965517	65,52
8	3000000	2094828	69,83
9	3000000	2534483	84,48
10	3000000	2327586	77,59
11	3000000	2812500	93,75
12	3000000	2993534	99,78

**Moyenne**

<b>LOT</b>	<b>Taux d'éclosion en %</b>
0 ng/l	62,93
50 ng/l	74,84
500 ng/l	94,50

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

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

LOT	J1	J4	J6	J8	J10	J13	J15	J18	J20 Tête
1	62,68	94,05	102,94	106,55	163,87	188,96	226,04	291,97	343,14
2	71,52	99,77	108,54	131,14	166,00	198,75	207,68	261,57	336,23
3	75,67	98,58	105,53	132,53	178,26	216,62	246,48	300,88	339,41
4	78,03	97,22	105,68	128,24	179,29	212,83	242,11	289,18	335,45
5	77,05	96,31	105,31	121,49	171,18	202,76	237,31	284,21	340,86
6	75,62	97,40	107,19	129,07	168,50	196,73	218,73	281,16	351,30
7	76,67	97,65	108,70	125,47	178,21	215,48	247,09	294,01	353,08
8	76,32	96,57	103,08	131,16	170,52	209,77	222,30	275,73	350,07
9	77,12	98,60	109,80	133,10	194,66	228,33	243,44	301,18	349,05
10	78,44	96,75	106,82	136,88	178,35	210,58	233,88	281,43	340,70
11	82,04	98,71	110,44	130,55	181,83	227,47	243,81	300,41	335,09
12	81,17	99,57	113,39	130,25	185,23	196,18	225,54	271,23	337,69

#### Moyenne

LOT	J1	J4	J6	J8	J10	J13	J15	J18	J20
0 ng/l	71,80	97,01	105,81	123,58	169,65	203,24	225,78	280,82	345,63
50 ng/l	77,32	97,79	106,96	132,69	182,64	217,09	241,48	293,17	341,15
500 ng/l	78,97	98,00	109,08	127,84	176,68	205,79	231,35	284,25	341,23