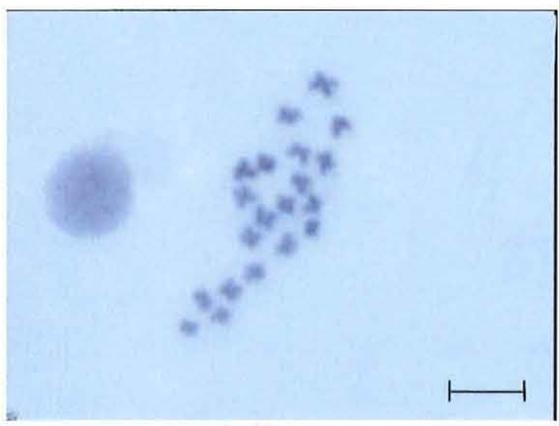


64971
Ecoo. BON - F
OLR2016

Marc Bonnard
Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes
Université de La Rochelle
Année 2002-2003

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Etude de l'aneuploïdie chez une population d'huîtres creuses juvéniles *Crassostrea gigas* dont les parents ont été contaminés par le cadmium et chez une population d'huîtres juvéniles contaminées.



Echelle = 2,5 µm



Echelle = 1,5 cm

Encadrantes :

Sylvie Lapègue
Karine Bouilly



Laboratoire de
Génétique et Pathologie



Laboratoire de Biologie



Université de
La Rochelle

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02016

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Philippe Gouletquer, directeur de la station IFREMER de La Tremblade, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Génétique et Pathologie.

J'aimerais remercier tout particulièrement Sylvie Lapègue et Karine Bouilly pour m'avoir si bien encadré durant ce stage, qui s'est déroulé dans les meilleures conditions possibles; pour leur disponibilité et leur aide dans mon étude.

Je tiens également à remercier Karine Bouilly pour ses explications relatives aux différentes techniques de manipulation et la confiance qu'elle a bien voulu me témoigner. Les résultats obtenus vont en effet être intégrés dans sa thèse.

J'aimerais également remercier toute l'équipe de l'IFREMER pour leur accueil et leur sympathie.

Je remercie enfin Thomas Guyot, technicien au LBEM (Laboratoire de Biologie et Environnement Marins) de La Rochelle pour ses explications concernant la quantification du cadmium.

Sommaire

<u>I/ Présentation de la structure d'accueil</u>	4
<u>II/ Introduction</u>	5 à 6
<u>III/ Matériel et Méthodes</u>	7 à 10
1) <u>Etude de l'aneuploïdie</u>	7 à 9
1.1.) Origine des huîtres et contamination.....	7
1.2.) Croisement et élevage larvaire (descendance)	7 à 8
1.3.) Préparation des lames microscopiques	8 à 9
1.4.) Lecture des lames	9
2) <u>Quantification du cadmium</u>	9 à 10
<u>IV/ Résultats</u>	11 à 15
1) <u>Etude de l'aneuploïdie</u>	11 à 14
1.1.) Etude de l'aneuploïdie chez la descendance	12 à 13
1.2.) Etude de l'aneuploïdie chez le naissain	13 à 14
2) <u>Quantification du cadmium</u>	14 à 15
2.1.) Quantification du cadmium chez la descendance	14
2.2.) Quantification du cadmium chez le naissain.....	15
<u>V/ Discussion</u>	16 à 17
<u>VI/ Bibliographie</u>	18 à 19
<u>VII/ Annexes</u>	20 à 25
<u>Annexe 1</u> : Données brutes aneuploïdie (descendance).....	20 à 21
<u>Annexe 2</u> : Données brutes aneuploïdie (naissain).....	22 à 23
<u>Annexe 3</u> : Données brutes quantification Cd (descendance)	24
<u>Annexe 4</u> : Données brutes quantification Cd (naissain).....	25

I/ Présentation de la structure d'accueil

La station IFREMER de La Tremblade est implantée géographiquement dans le premier bassin ostréicole d'Europe et dépend du centre IFREMER de Nantes. Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral. Son aire de compétence s'étend à la partie sud du département de la Charente-Maritime, de la rive gauche de la Charente à la Gironde (limite des départements Charente-Maritime et de la Gironde, région Poitou-Charentes, Agence de l'Eau Adour-Garonne).

Cette station héberge trois laboratoires:

- 1) Le laboratoire côtier de la Direction de l'Environnement Littoral (DEL).
- 2) Le laboratoire conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC).
- 3) Le laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP).

Mon travail a été effectué au sein de ce dernier laboratoire dont les principaux objectifs visent essentiellement à développer des recherches sur les Mollusques Bivalves marins dans les domaines de:

- 1) La **pathologie**: surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point de techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.
- 2) Et de la **génétique**: étude des ressources génétiques, testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture. Obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions. Création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

Mon sujet de stage s'insère dans:

Le thème: optimisation & développement des productions aquacoles.

Le programme 4: amélioration génétique des espèces aquacoles.

Le sous-programme 2: amélioration & sélection de souches (étude de l'aneuploïdie).

II/ Introduction

L'aneuploïdie se définit par l'existence de plus de deux chromosomes homologues à l'intérieur d'une garniture (trisomie) ou par l'absence d'un ou des deux chromosomes d'une paire (monosomie ou nullisomie) (Thiriot-Quiévreux, 1986). Si ce phénomène décrit par de nombreux auteurs s'avère léthal pour certains organismes comme les mammifères (Lint, 1991), d'autres comme les bivalves marins peuvent le tolérer et survivre avec un nombre anormal de chromosomes (Thiriot-Quiévreux, 1986). Cependant, des auteurs ont mis en évidence chez ces organismes une corrélation négative entre le taux d'aneuploïdie et leur croissance (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988 ; Zouros *et al.*, 1996 ; Leitão *et al.*, 2001a). Les causes environnementales et/ou génétiques de l'aneuploïdie sont encore incertaines. Toutefois une base génétique dans la détermination de l'aneuploïdie a été supposée (Leitão *et al.*, 2001b). Cette variabilité de la croissance pose un réel problème pour de nombreux professionnels et notamment les ostréiculteurs du bassin de Marennes-Oléron qui font l'élevage de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*.

Des études récentes, menées *in-vivo*, ont révélé un effet toxique de l'atrazine sur le génome des huîtres (Bouilly *et al.*, 2003). L'atrazine est un herbicide couramment utilisé dans cette région et sera bientôt interdit. Or le bassin de Marennes-Oléron est également exposé à d'autres polluants, et notamment le cadmium qui provient des eaux girondines par les pertuis d'Antioche et de Maumusson. Le chlorure de cadmium (forme majoritaire du cadmium dans l'eau) est connu pour sa forte capacité aneugénique (induisant l'aneuploïdie) (Güerci *et al.*, 2000) et l'huître creuse, du fait de ses capacités assimilatrices, a l'un des plus grands potentiels de bioaccumulation de ce métal dans l'écosystème marin (Frazier-John, 1979). Des études ont donc été menées au sein du laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER de La Tremblade pour déterminer s'il y avait un effet toxique de ce métal (bioindicateur) sur le génome des huîtres. Un effet toxique a été constaté sur des huîtres adultes (Bouilly, 2003). Il était alors intéressant de voir s'il y avait également un effet toxique du cadmium sur des huîtres au stade naissain. Le taux d'aneuploïdie sera donc évalué sur une population d'huîtres juvéniles contaminées. Comme une persistance avait été observée avec l'atrazine à la génération suivante (Bouilly, 2003), cette même démarche a été entreprise pour le cadmium. Une reproduction a donc été effectuée à partir des huîtres adultes contaminées. Le taux d'aneuploïdie sera alors évalué sur les descendants afin de déterminer un éventuel impact du

cadmium sur ceux-ci. En parallèle, par la technique de spectrophotométrie d'absorption atomique, une quantification du cadmium a été menée sur ces populations juvéniles d'huîtres creuses au sein du LBEM.

III/ Matériel et Méthodes

1) Etude de l'aneuploïdie:

1.1.) Origine des huîtres et contamination:

Afin d'étudier l'aneuploïdie chez la descendance, six lots d'huîtres adultes ont été établis (3 lots différents et leurs réplicats):

- 2 lots témoins (lots 1A et 1B) avec une concentration nulle en cadmium.
- 2 lots avec une concentration en cadmium de 50 ng.L⁻¹ (lots 2A et 2B) qui correspond à la valeur pic trouvée dans le bassin de Marennes-Oléron.
- 2 lots avec une concentration de cadmium de 500 ng.L⁻¹ (lots 3A et 3B).

Ces bivalves ont évolué dans un circuit fermé avec renouvellement d'eau, de cadmium et de nourriture (mélange de deux Phytoflagellés: *Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica* et d'une Diatomée: *Chaetoceros calcitrans*) chaque jour.

Ces huîtres adultes ont été exposées au cadmium pendant deux mois; durée qui correspond à leur maturation. L'impact du cadmium sur leur mortalité a été évalué. Les taux de mortalité dans les lots 1, 2 et 3 (0, 50 et 500 ng.L⁻¹) étaient de 27, 39 et 18% respectivement. Aux concentrations testées, il semblerait que le cadmium n'ait pas d'impact sur la mortalité (test G) (Bouilly *et al.*, 2002).

Concernant l'étude de l'aneuploïdie chez la population juvénile contaminée, les huîtres sont issues de la sélection divergente haute (MOREST 2^{ème} génération). Elles ont été placées dans les mêmes conditions que les huîtres adultes mais avec une plus grande durée d'exposition au cadmium (3 mois ½, fin mai à début septembre 2002).

1.2.) Croisement et élevage larvaire (descendance):

Des croisements entre les individus adultes ont été effectués le 30 mai 2002 afin d'étudier l'impact du cadmium sur la descendance. Pour chacun des six lots, les fécondations ont été réalisées à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Les gamètes de chaque animal mûre ont été observés au microscope afin de choisir six mâles et six femelles ayant la meilleure activité reproductrice. Les gamètes de ces individus ont été obtenus après scarification de leurs gonades. Les fécondations ont eu lieu dans des béciers en verre d'un litre contenant, pour chaque lot, de l'eau de mer filtrée, 3 millions d'ovocytes et 600 millions de spermatozoïdes. Le taux d'éclosion en fonction du traitement a été vérifié. Il semblerait

que le cadmium ait un effet sur le taux d'éclosion des larves (test G) (Bouilly *et al.*, 2002). 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. Ces descendants se sont développés dans la salle d'élevage larvaire. Ensuite, les larves ont été transférées en micronurserie. Lorsqu'elles ont atteint le stade naissain (avec une taille proche de 20 mm), elles ont été transférées en salle de maturation. Puis elles ont été placées dans le marais expérimental de la station d'Artouan. Elles sont ensuite revenues à l'écloserie sous serre pendant 1 mois, période nécessaire pour l'acclimatation (température plus élevée et plus de nourriture pendant deux à trois semaines). Un suivi de la croissance pendant le développement larvaire a été effectué. Le test F de Fisher-Snedecor a permis de mettre en évidence que la contamination au cadmium des huîtres adultes n'avait pas d'impact sur la croissance des larves (Bouilly *et al.*, 2002).

1.3.) Préparation des lames microscopiques:

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

1. Arrêt des cellules en métaphase: Afin d'étudier l'aneuploïdie, les animaux ont tout d'abord été incubés dans une solution de colchicine diluée dans 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 s'est déroulée la nuit car les huîtres ont une plus grande activité mitotique et donc une plus grande filtration et absorption de la colchicine. Les huîtres ont ensuite été disséquées afin de récupérer les branchies.
2. Choc hypotonique: Les branchies ont ensuite été soumises à un choc hypotonique entraînant une turgescence des cellules et permettant ainsi une bonne dispersion des chromosomes. Le choc hypotonique a été réalisé avec du citrate de sodium à 0.9% pendant 40 minutes.
3. Fixation: Les suspensions cellulaires ont ensuite été fixées par plusieurs bains successifs d'éthanol absolu - acide acétique (3 :1) pour préserver les structures internes des cellules.

4. Exécution des préparations chromosomiques: De l'eau acidifiée a été ajoutée à un morceau de branchie afin de faciliter la libération des noyaux. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm environ sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. La suspension cellulaire a été aspirée puis les lames obtenues ont séché à l'air libre.
- 5 Coloration: Afin d'observer au microscope optique les préparations chromosomiques, celles-ci ont été colorées avec une solution de Giemsa dans un tampon phosphate à pH=6.8 pendant 10 minutes.

1.4.) Lecture des lames:

Le pourcentage d'aneuploïdie a été estimé en comptant 30 métaphases (au microscope Olympus à l'objectif 40) choisies au hasard par individu. 30 métaphases par individu représente le nombre statistique minimal habituellement accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984). Pour chaque lot, 10 individus ont été étudiés. Les cellules qui présentent $2n=19$, 18 ou 17 chromosomes sont considérées comme aneuploïdes. Dans cette étude, la probabilité que les cellules aneuploïdes soient le résultat d'artéfacts de la méthode de suspension cellulaire est réduite par le nombre élevé de métaphases. En utilisant une analyse de variance à deux facteurs (lots de cadmium et réplicats) sur le logiciel SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990) et une analyse à trois facteurs (génération, lots de cadmium et réplicats), les effets des lots et des générations peuvent être testés.

2) Quantification du cadmium:

L'analyse du cadmium chez les descendants et les huîtres juvéniles a été réalisée au LBEM avec le spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA).

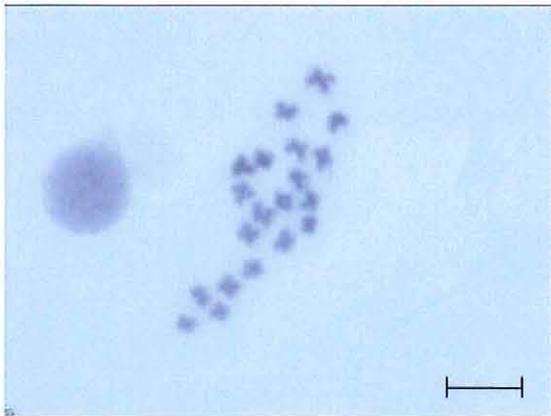
La chair des huîtres a tout d'abord été décoquillée à l'aide d'un scalpel (les différents lots contiennent au moins 12 individus, ces derniers sont regroupés par 3). Elles ont ensuite subi une lyophilisation pendant quatre jours. Puis leur poids a été mesuré. Elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un mortier, d'un pilon et d'une passoire afin de ne retenir que les particules les plus fines. Ce broyage permet d'homogénéiser l'échantillon. Le broyat est alors transféré dans un bécher et pesé afin d'obtenir un poids sec proche de 500 mg (+/- 5 mg). De la même façon, deux blancs ont été préparés (bêchers vides) ainsi que deux témoins DOLT (TORT 2:

hépatopancréas de homard) dont la concentration est connue (26.7±0.6 mg Cd/kg). Les étapes suivantes correspondent à la minéralisation acide. Son but est d'éliminer toute la matière organique de façon à ne conserver que la matière minérale, dont le cadmium. Dans les béchers sont ajoutés 5 ml d'acide nitrique HNO₃ 14N. Puis les béchers sont placés sur une plaque chauffante à 150°C pendant 3 à 4 jours de façon à laisser les acides agir. Une fois l'extraction réalisée, après que la vapeur se soit évaporée, 10 ml d'acide nitrique 0.3N sont ajoutés dans chaque bécher. Une heure plus tard, la solution est transférée dans un flacon à scintillation puis lue au spectrophotomètre.

IV/ Résultats

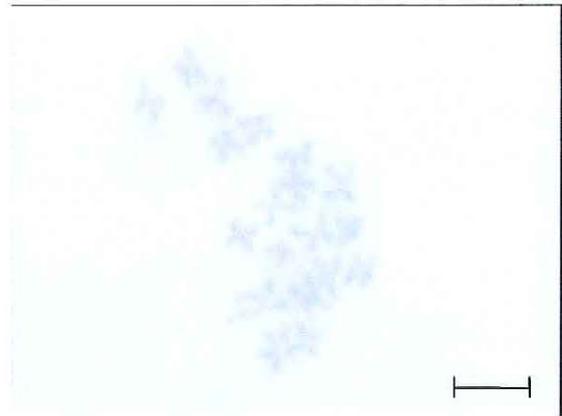
1) Etude de l'aneuploïdie:

L'huître creuse *Crassostrea gigas* possède à l'état diploïde 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967) (figure 1). Lors du comptage des métaphases, des cellules ne présentant que 19 (figure 2), 18 (figure 3) ou 17 chromosomes (figure 4) ont été observées:



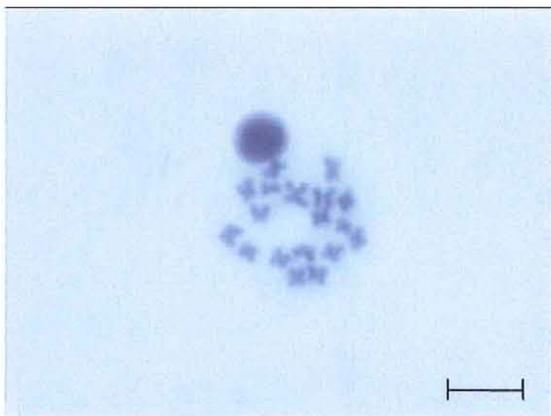
Echelle = 2,5 μ m

Figure 1: Métaphase avec $2n=20$ chromosomes de *Crassostrea gigas*.



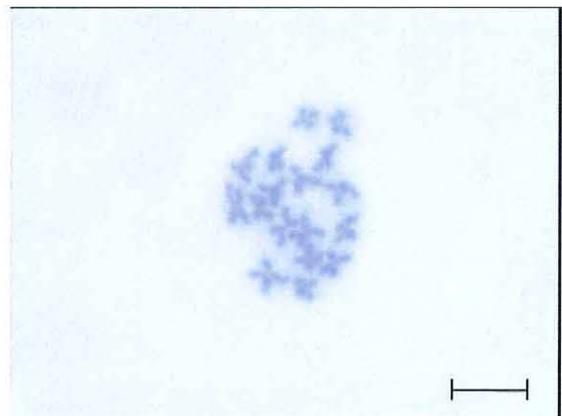
Echelle = 2,5 μ m

Figure 2: Métaphase avec $2n=19$ chromosomes de *Crassostrea gigas*.



Echelle = 2,5 μ m

Figure 3: Métaphase avec $2n=18$ chromosomes de *Crassostrea gigas*.



Echelle = 2,5 μ m

Figure 4: Métaphase avec $2n=17$ chromosomes de *Crassostrea gigas*.

Le caryotype standard de *Crassostrea gigas* a également pu être établi. Il contient 10 paires de chromosomes métacentriques (Thiriot-Quévieux, 2002). Leur différenciation s'est donc faite selon leur taille (figure 5):

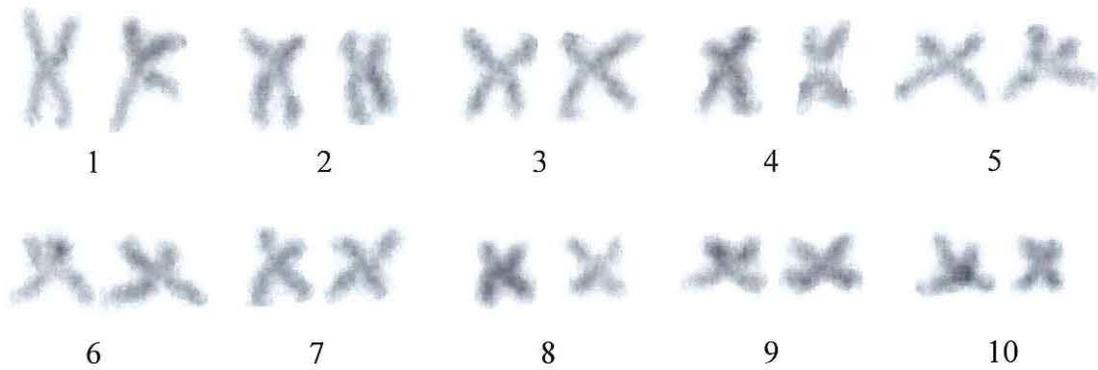
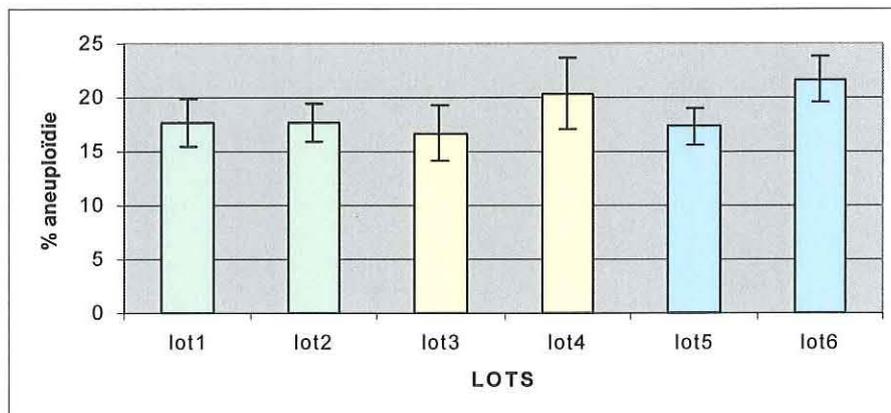


Figure 5: Caryotype de l'espèce *Crassostrea gigas*.

Chez l'huître creuse japonaise, les pertes de chromosomes concernent surtout les paires 1, 9 et 10 mais aussi la paire 5 à plus faible pourcentage (Leitão *et al.*, 2001c).

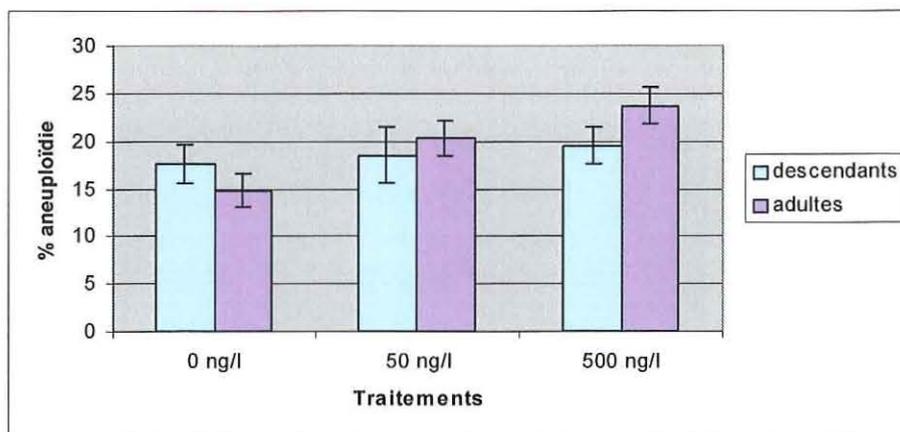
1.1) Etude de l'aneuploïdie chez la descendance:

Une analyse de la variance à deux facteurs (lots et réplicats) est menée grâce au logiciel SYSTAT 9.0. Le graphique 1 présente le taux moyen d'aneuploïdie chez les descendants en fonction des différentes concentrations de cadmium testées:



Graphique 1: Pourcentage moyen d'aneuploïdie chez les descendants en fonction des différentes concentrations de cadmium (0, 50 et 500 ng/L).

L'analyse de la variance n'a montré aucune différence significative entre les lots ($F=0.307$, $P=0.737$) ni entre les réplicats ($F=1.940$, $P=0.169$). Les taux moyens d'aneuploïdie des adultes étaient significativement différents (Bouilly, 2003). Une comparaison entre les adultes et les descendants peut être entreprise (graphique 2).

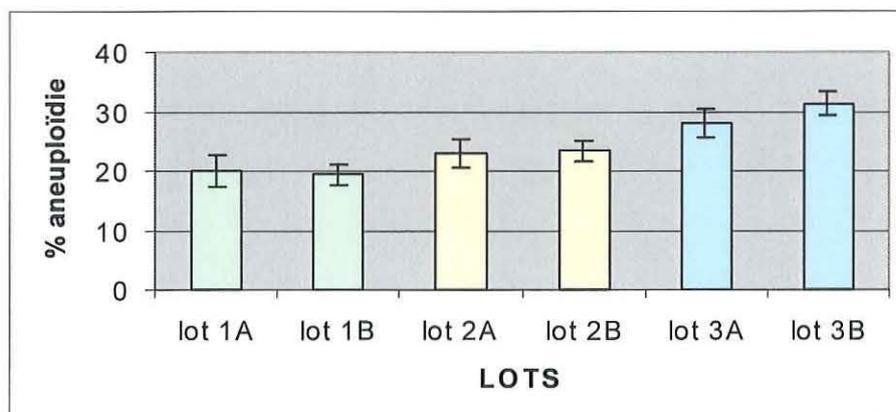


Graphique 2: Pourcentage moyen d'aneuploïdie chez les adultes et les descendants en fonction de la concentration en cadmium (0, 50 et 500 ng/L).

L'analyse statistique à trois facteurs (génération, lot et réplicat) a révélé qu'il existait une différence significative entre les lots ($F=5.827$, $P=0.004$), mais pas de différences significatives entre les générations ($F=0.717$, $P=0.399$) ni entre les réplicats ($F=1.600$, $P=0.209$).

1.2) Etude de l'aneuploïdie chez le naissain:

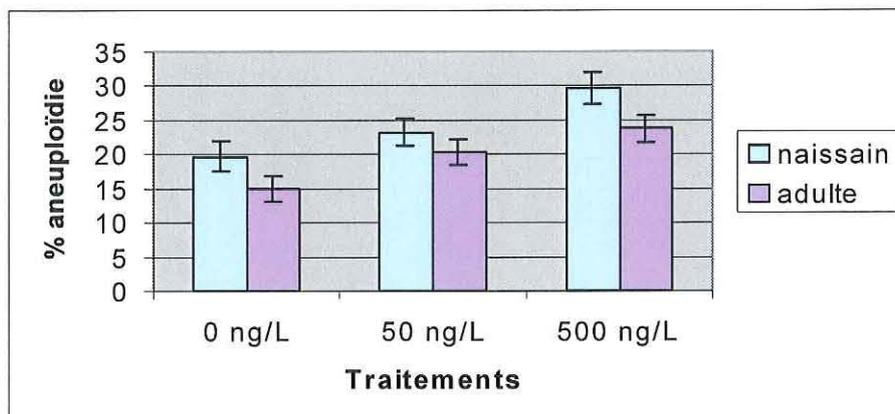
Une analyse de variance à deux facteurs est également menée avec le même logiciel. Le graphique 3 présente le taux moyen d'aneuploïdie chez la population d'huîtres juvéniles contaminées en fonction des différentes concentrations de cadmium testées:



Graphique 3: Pourcentage moyen d'aneuploïdie chez les huîtres juvéniles en fonction des différentes concentrations de cadmium (0, 50 et 500 ng/L).

L'analyse de la variance à deux facteurs (lots, réplicats) a montré une différence significative entre les lots ($F=10.728$, $P=0.000$) mais pas entre les réplicats ($F=0.312$, $P=0.578$). Une analyse plus poussée a montré une différence significative entre les lots 1 et 3 ($F=19.708$, $P=0.000$) et les lots 2 et 3 ($F=9.024$, $P=0.005$) mais pas entre les lots 1 et 2 ($F=2.637$, $P=0.113$).

Une comparaison du taux moyen d'aneuploïdie entre les populations juvénile et adulte contaminées a également été effectuée (graphique 4):



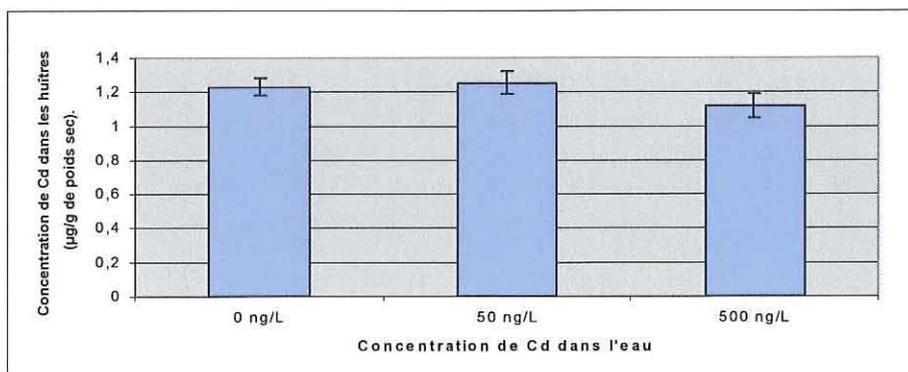
Graphique 4: Comparaison du taux moyen d'aneuploïdie entre les huîtres juvéniles et les huîtres adultes contaminées en fonction de la concentration en cadmium.

L'analyse de variance à trois facteurs (populations, lots, réplicats) a montré une différence significative entre les populations de stades de développement différents ($F=14.112$, $P=0.000$) et les lots ($F=19.676$, $P=0.000$) mais pas entre les réplicats ($F=0.399$, $P=0.529$).

2) Quantification du cadmium:

2.1) Quantification du cadmium chez la descendance:

Le graphique 5 présente la concentration moyenne de cadmium chez les descendants (exprimée en $\mu\text{g/g}$ de poids sec) en fonction des différentes concentrations de cadmium testées.

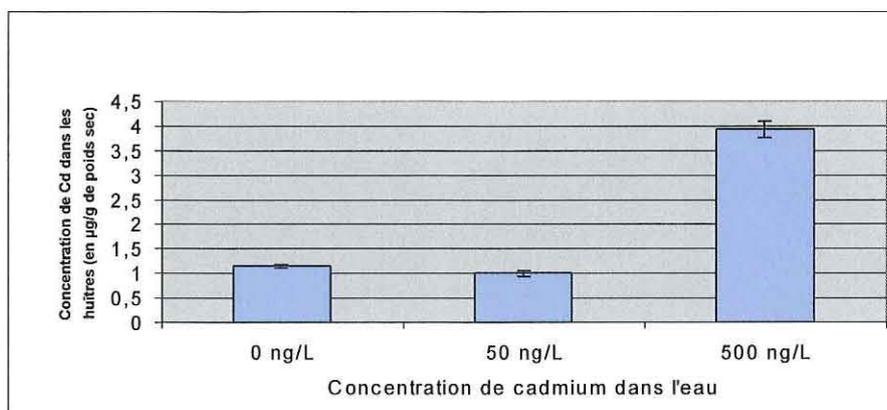


Graphique 5: Concentration moyenne de cadmium dans la chair des huîtres en fonction du traitement.

L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les lots ($F=2.153$, $P=0.145$).

2.2) Quantification du cadmium chez le naissain:

Le graphique 6 présente la concentration de cadmium dans les huîtres (exprimée en $\mu\text{g/g}$ de poids sec) en fonction de la concentration de cadmium dans l'eau:



Graphique 6: Concentration moyenne de cadmium dans la chair des huîtres en fonction du traitement.

L'analyse de variance à deux facteurs a montré une différence significative entre les lots ($F=271.393$, $P=0.000$) mais pas entre les réplicats ($F=1.213$, $P=0.282$). Une analyse statistique plus poussée a révélé une différence significative entre les lots 1 et 3 ($F=300.320$, $P=0.000$) et les lots 2 et 3 ($F=298.220$, $P=0.000$) mais pas entre les lots 1 et 2 ($F=3.494$, $P=0.080$).

Cette même analyse a été réalisée pour les adultes et a montré une teneur en cadmium dans les huîtres exposées à 500 ng/L qui est le double de celles des lots à 0 ng/L et à 50 ng/L (Bouilly, 2003).

V/ Discussion

Les résultats de la contamination des huîtres juvéniles au cadmium ont démontré que les taux d'aneuploïdie variaient de façon significative en fonction des concentrations testées de cadmium. Cependant, une différence significative a été observée entre les lots témoins et les lots à 500 ng/L et entre les lots à 50 ng/L et les lots à 500 ng/L mais pas entre les lots témoins et les lots à 50 ng/L. Le cadmium aurait donc un impact sur l'aneuploïdie d'huîtres juvéniles pour une concentration supérieure à celle trouvée dans le bassin de Marennes-Oléron. La concentration de 500 ng/L représente donc la dose seuil dans cette expérience. Il serait alors intéressant de tester des concentrations intermédiaires de cadmium (entre 50 et 500 ng/L) afin de préciser cette dose seuil. Ces résultats semblent être confirmés par ceux de la quantification du cadmium. En effet, les huîtres exposées à 500 ng/L présentent une concentration qui diffère de façon significative par rapport à celles des huîtres des lots témoins et des lots à 50 ng/L alors qu'il n'y a pas de différences significatives entre les concentrations des lots témoins et des lots à 50 ng/L. De ce fait, le cadmium jouerait un rôle plutôt quantitatif. La comparaison du taux moyen d'aneuploïdie chez les huîtres adultes et juvéniles contaminées en fonction de la concentration en cadmium dans l'eau a révélé une différence significative entre les populations de stades de développement différents et les différentes concentrations de cadmium mais pas entre les réplicats. Il semblerait donc que les huîtres juvéniles présentent une plus grande sensibilité que les huîtres adultes aux concentrations de cadmium testées. Ceci serait en accord avec l'observation de Sheffrin *et al.* (1984) que les stades larvaires et juvéniles des Invertébrés marins sont les plus sensibles aux stress des polluants.

Les résultats ont montré que les taux d'aneuploïdie chez les descendants n'étaient pas significativement différents selon les différents traitements; contrairement à ceux des adultes. Ces résultats indiquent donc que l'impact du cadmium sur l'aneuploïdie des huîtres adultes n'a pas persisté sur la génération suivante. Or, la comparaison des taux d'aneuploïdie entre les adultes et les descendants a montré une différence significative entre les lots mais pas de différences entre les générations ni entre les réplicats. La différence non significative entre les générations peut s'expliquer par le fait qu'à 0 ng/L (où le pourcentage d'aneuploïdie des descendants est supérieur à celui des adultes) et qu'à 500ng/L (où le pourcentage est supérieur pour les adultes) les écarts ne sont pas statistiquement significatifs. La différence significative trouvée entre les lots peut s'expliquer par celle des adultes. La non persistance de l'impact du

cadmium sur la génération suivante semble confirmée par les teneurs en cadmium des descendants qui ne diffèrent pas de façon significative. Le cadmium n'induirait donc pas de dommage génétique transmissible d'une génération à l'autre. A l'heure actuelle, l'absence de publications sur ce sujet précis ne permet pas d'affirmer si les résultats obtenus sont corrects ou non. La non persistance de l'impact du cadmium sur la descendance ainsi que des taux d'aneuploïdie et des concentrations non significatifs en fonction des lots pourraient être dus au protocole d'exposition à ce métal. En effet, ce dernier au lieu d'être préparé avec de l'acide a été mis en solution avec de l'eau distillée, qui diminuerait sa biodisponibilité pour les huîtres. Cependant si ces résultats sont corrects, ceux-ci peuvent peut-être s'expliquer par les mécanismes de détoxification qui existent chez l'espèce *Crassostrea gigas*. En effet, le cadmium se fixe à des protéines du cytosol tels que les métallothionéines qui sont responsables de la régulation biologique des métaux essentiels (Mouneyrac *et al.*, 1999). Au-delà d'un certain seuil, ces protéines peuvent-elles être saturées et le cadmium peut-il affecter ainsi les chromosomes? Il serait alors intéressant d'étudier l'impact d'une forte concentration de cadmium sur le génome des huîtres. De même, Amiard *et al.* (1994) ont supposé que la croissance exercerait un effet de «dilution» des métaux, c'est-à-dire une diminution de la concentration, chez les huîtres. Lors de la croissance des descendants la concentration du cadmium a peut-être diminué. De plus, Robert & His (1985) ont remarqué que la concentration de cadmium des eaux de l'estuaire de la Gironde (qui était alors de 1µg/L) n'affectait pas le potentiel reproducteur des huîtres. Ces observations seraient donc en accord avec nos résultats. Si les mécanismes de bioaccumulation et de détoxification du cadmium sont connus pour l'huître creuse et peuvent permettre d'expliquer la non persistance de l'impact de ce métal à la génération suivante, une étude similaire avec de l'atrazine, menée par Bouilly (2003), a révélé la persistance de l'impact de cet herbicide à la génération suivante. Cependant, les connaissances sur la bioaccumulation et sur les mécanismes de détoxification sont encore inconnues. Les données actuelles font état d'une bioconcentration de ce composé chez les poissons (Solomon *et al.*, 1996), chez la grenouille (Allran & Kasarov, 2000) et chez les algues (Shelton & Miller, 2002).

Ces études permettent donc de se rendre compte de l'impact du cadmium sur le génome des huîtres *Crassostrea gigas* et ainsi d'évaluer le risque écologique et économique. Il s'agit également d'un facteur de santé humaine puisque depuis l'année 2003, une nouvelle norme en France est entrée en vigueur réduisant la teneur maximale de cadmium dans les huîtres à 1mg/kg de poids frais (IFREMER, 2001).

VI/ Bibliographie

Ahmed M. & Sparks A.K., 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J. Fish. Res. Bd. Canada 24: 2155-2159.

Allran J.F., Karasov W.H., 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae and adults of anuran amphibians. Environ. Toxicol. Chem. 20: 769-775.

Amiard J.C., Métayer C., Baud J.P., Ribeyre F., 1994. Influence de facteurs écologiques et biologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques chez de jeunes huîtres (*Crassostrea gigas* Thunberg) au cours du prégrossissement en nourricerie. Wat. Res. 28(1): 219-231.

Bouilly K., McCombie H., Leitao A., Lapègue S., 2002. Action 2: Etude des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Rapport Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Programme 3: Gestion durable des productions ostréicoles: les apports de la génétique.

Bouilly K., 2003. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron: aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport de thèse n° 3. 18 pages + annexes.

Bouilly K., Leitão A., McCombie H., Lapègue S., 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 219-223.

Frazier J.M., 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. Environmental Health Perspectives 28: 75-79.

Güerci A., Seoane A., Dulout F.N., 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. Mutation Research 469: 35-40.

IFREMER, 2001. Synthèse pour la réunion du CMNA de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne du 2 octobre 2001: Suivi des teneurs en cadmium et processus conditionnant la bioaccumulation en cadmium dans les huîtres du bassin de Marennes-Oléron. 3 pages.

Leitão A., Boudry P., Thiriot-Quiévreux C., 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. Aquaculture 193: 39-48.

Leitão A., Boudry P., McCombie H., Gérard A., Thiriot-Quiévreux C., 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquatic Living Resources 14: 233-237.

Leitão A., Boudry P., Thiriot-Quiévreux C., 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Genome 44: 735-737.

Lints F., 1991. Génétique 3. Troisième édition. 675 pp.

Mouneyrac C., Berthet B., Amiard J.C., 1999. Cd distribution in the tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed chronically *in situ*. Water, Air and Soil Pollution. 112: 187-196.

Robert R. & His E., 1985. Combined Effects of Salinity and Cadmium Chloride upon Embryos and Larvae of the Japanese Oyster, *Crassostrea gigas*. Marine Environmental Research 15: 303-312.

Sheffrin N.M.H., Fieller N.R.J., Williams E.E., 1984. A behavioural bioassay for the impaired sea-water quality using the plantigrades of the common mussel, *Mytilus edulis L*: the response to copper. Aquatic Toxicology, 5: 77-91.

Shelton A.D., Miller M.C., 2002. Herbicide bioconcentration in *Cladophora glomerata*: atrazine removal in a eutrophic agricultural river. Hydrobiologia 469: 157-164.

Solomon K.R., Baker D.B, Richards R.P., Dixon K.R., Klaine S.J., La Point T.W., Kendall R.J., Weisskopf C.P., Giddings J.M., Giesy J.P., Hall Jr L.W., Williams W.M., 1996. Ecological risk assesment of atrazine in North American surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 15: 31-76.

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.

Thiriôt-Quévèreux C. & Ayraud N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. Marine Biology 70: 165-172.

Thiriôt-Quévèreux C., 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). Genetica 70: 225-231.

Thiriôt-Quévèreux 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.

Thiriôt-Quévèreux C., 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. Cah. Biol. Mar: 17-26.

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.

Wilkinson L., 1990. SYSTAT: The System for statistics. SYSTAT, Inc., Evanston, IL, 676 pp.

Zouros E., Thiriôt-Quévèreux C., Kotoulas G., 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. Genet. Res., Camb. 68: 109-116.

Annexe 1 : Données brutes aneuploïdie (descendance)

Population	N° Lot	N° Animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Moyenne	Nb lames étudiées
			2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie		
1	1		24	4	2	0	6	20	17,66	2
1	2		22	5	0	3	8	26,66		1
1	3		23	6	0	1	7	23,33		2
1	4		23	7	0	0	7	23,33		2
1	5		24	4	1	1	6	20		1
1	6		27	2	0	1	3	10		1
1	7		27	1	1	1	3	10		1
1	8		28	2	0	0	2	6,66		1
1	9		26	3	0	1	4	13,33		1
1	10		23	4	2	1	7	23,33		1
2	1		23	4	2	1	7	23,33	17,66	1
2	2		24	4	0	2	6	20		2
2	3		28	2	0	0	2	6,66		1
2	4		23	4	2	1	7	23,33		1
2	5		27	1	0	2	3	10		1
2	6		24	4	1	1	6	20		1
2	7		25	4	0	1	5	16,66		1
2	8		23	5	1	1	7	23,33		1
2	9		25	4	1	0	5	16,66		1
2	10		25	5	0	0	5	16,66		1
3	1		24	4	1	1	6	20	16,66	1
3	2		22	4	3	1	8	26,66		1
3	3		22	7	0	1	8	26,66		2
3	4		24	2	3	1	6	20		1
3	5		24	4	2	0	6	20		1
3	6		27	3	0	0	3	10		1
3	7		29	1	0	0	1	3,33		1
3	8		28	2	0	0	2	6,66		2
3	9		26	2	2	0	4	13,33		1
3	10		24	2	3	1	6	20		2
4	1		22	4	3	1	8	26,66	20,33	2
4	2		18	9	2	1	12	40		2
4	3		25	4	0	1	5	16,66		1
4	4		24	4	1	1	6	20		1
4	5		23	6	1	0	7	23,33		1
4	6		23	4	1	2	7	23,33		1
4	7		25	4	0	1	5	16,66		1
4	8		28	2	0	0	2	6,66		1
4	9		22	7	1	0	8	26,66		1
4	10		29	0	0	1	1	3,33		1

5	1	25	3	2	0	5	16,66	17,33	2
5	2	23	4	2	1	7	23,33		1
5	3	25	3	2	0	5	16,66		1
5	4	25	3	1	1	5	16,66		1
5	5	22	5	2	1	8	26,66		1
5	6	24	4	2	0	6	20		1
5	7	24	4	2	0	6	20		1
5	8	27	2	0	1	3	10		2
5	9	26	2	1	1	4	13,33		1
5	10	27	2	0	1	3	10		1
6	1	26	4	0	0	4	13,33	21,66	1
6	2	24	3	1	2	6	20		1
6	3	25	3	1	1	5	16,66		1
6	4	24	5	0	1	6	20		1
6	5	23	3	1	3	7	23,33		1
6	6	26	2	1	1	4	13,33		1
6	7	21	2	5	2	9	30		1
6	8	22	6	2	0	8	26,66		1
6	9	20	5	4	1	10	33,33		2
6	10	24	4	0	2	6	20		1

Annexe 2 : Données brutes aneuploïdie (naissain)

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1A	1	28	1	0	1	2	6,66	20	1
1A	2	22	7	1	0	8	26,66		1
1A	3	20	6	1	3	10	33,33		2
1A	4	24	5	1	0	6	20		2
1A	5	24	2	2	2	6	20		2
1A	6	25	2	2	1	5	16,66		2
1A	7	28	1	1	0	2	6,66		1
1A	8	23	2	4	1	7	23,33		1
1A	9	22	4	1	3	8	26,66		2
1A	10	24	4	0	2	6	20		2
1B	1	24	1	3	2	6	20	19,33	1
1B	2	23	2	3	2	7	23,33		1
1B	3	22	4	2	2	8	26,66		2
1B	4	24	0	4	2	6	20		1
1B	5	26	3	1	0	4	13,33		1
1B	6	26	4	0	0	4	13,33		2
1B	7	27	2	1	0	3	10		1
1B	8	24	4	1	1	6	20		2
1B	9	23	3	3	1	7	23,33		2
1B	10	23	2	2	3	7	23,33		1
2A	1	22	3	4	1	8	26,66	23	2
2A	2	23	2	5	0	7	23,33		1
2A	3	24	1	3	2	6	20		1
2A	4	28	1	1	0	2	6,66		1
2A	5	23	4	2	1	7	23,33		2
2A	6	22	5	1	2	8	26,66		1
2A	7	24	4	1	1	6	20		1
2A	8	24	3	2	1	6	20		1
2A	9	22	6	1	1	8	26,66		2
2A	10	19	7	4	0	11	36,66		1
2B	1	22	7	1	0	8	26,66	23,33	1
2B	2	24	2	2	2	6	20		1
2B	3	22	6	2	0	8	26,66		1
2B	4	23	4	3	0	7	23,33		1
2B	5	26	1	1	2	4	13,33		1
2B	6	21	4	2	3	9	30		1
2B	7	24	3	3	0	6	20		1

2B	8	24	4	1	1	6	20		1
2B	9	21	4	3	2	9	30		1
2B	10	23	6	1	0	7	23,33		1
3A	1	21	2	3	4	9	30	28	2
3A	2	24	4	2	0	6	20		1
3A	3	25	3	0	2	5	16,66		1
3A	4	24	2	4	0	6	20		2
3A	5	20	5	3	2	10	33,33		1
3A	6	21	7	2	0	9	30		1
3A	7	20	5	2	3	10	33,33		1
3A	8	23	2	3	2	7	23,33		1
3A	9	18	7	4	1	12	40		2
3A	10	20	5	3	2	10	33,33		1
3B	1	22	6	0	2	8	26,66	31,33	2
3B	2	20	7	2	1	10	33,33		1
3B	3	20	5	4	1	10	33,33		1
3B	4	23	6	1	0	7	23,33		1
3B	5	18	7	2	3	12	40		2
3B	6	17	10	1	2	13	43,33		1
3B	7	22	4	2	2	8	26,66		2
3B	8	21	3	2	4	9	30		1
3B	9	23	4	0	3	7	23,33		1
3B	10	20	5	2	3	10	33,33		2

Annexe 3 : Données brutes quantification Cd (descendance)

Numéro	LOT	Poids (g)	[Cd] µg/l	µg	µg/p.sec en g	moyenne	moy conc (µg/g)
KA 36	DESCAD 1	0,49	57	0,57	1,14	1,14	1,22
KA 37		0,50	53	0,53	1,05		
KA 38		0,50	56	0,56	1,11		
KA 39		0,50	63	0,63	1,25		
KA 40	DESCAD 2	0,49	65	0,65	1,30	1,31	
KA 41		0,49	69	0,69	1,38		
KA 42		0,50	73	0,73	1,46		
KA 43		0,29	33	0,33	1,10		
KA 44	DESCAD 3	0,49	64	0,64	1,28	1,39	1,25
KA 45		0,50	77	0,77	1,53		
KA 46		0,50	45	0,68	1,35		
KA 47		0,49	71	0,71	1,42		
KA 48	DESCAD 4	0,50	66	0,66	1,31	1,10	
KA 49		0,50	49	0,49	0,97		
KA 50		0,50	57	0,57	1,14		
KA 51		0,49	50	0,50	1,00		
KA 52	DESCAD 5	0,50	66	0,66	1,31	1,23	1,11
KA 53		0,50	53	0,53	1,05		
KA 54		0,50	75	0,75	1,49		
KA 55		0,50	54	0,54	1,08		
KA 56	DESCAD 6	0,50	47	0,47	0,93	0,98	
KA 57		0,49	49	0,49	0,98		
KA 58		0,50	45	0,45	0,89		
KA 59		0,50	57	0,57	1,13		

Annexe 4 : Données brutes quantification Cd (naissain)

Numéro	LOT	Poids (g)	[Cd] µg/l	µg	µg/p.sec en g	moyenne	moy conc (µg/g)
KA 6	NACAD 1A	0,18	23	0,23	1,22	1,21	1,14
KA 7		0,16	19	0,19	1,16		
KA 8		0,09	13	0,13	1,30		
KA 9		0,18	22	0,22	1,21		
KA 10		0,11	13	0,13	1,16		
KA 11	NACAD 1B	0,14	12	0,12	0,82	1,06	
KA 12		0,09	12	0,12	1,21		
KA 13		0,13	16	0,16	1,18		
KA 14		0,14	15	0,15	1,01		
KA 15		0,13	15	0,15	1,09		
KA 16	NACAD 2A	0,16	21	0,21	1,28	0,96	1,00
KA 17		0,15	13	0,13	0,84		
KA 18		0,19	16	0,16	0,83		
KA 19		0,17	17	0,17	0,98		
KA 20		0,15	14	0,14	0,87		
KA 21	NACAD 2B	0,14	20	0,20	1,34	1,03	
KA 22		0,13	15	0,15	1,09		
KA 23		0,13	10	0,10	0,74		
KA 24		0,14	13	0,13	0,92		
KA 25		0,15	17	0,17	1,07		
KA 26	NACAD 3A	0,14	47	0,47	3,18	3,70	3,93
KA 27		0,12	43	0,43	3,45		
KA 28		0,11	36	0,36	3,16		
KA 29		0,15	62	0,62	3,95		
KA 30		0,13	64	0,64	4,75		
KA 31	NACAD 3B	0,12	51	0,51	4,19	4,15	
KA 32		0,16	64	0,64	3,94		
KA 33		0,15	70	0,70	4,41		
KA 34		0,13	56	0,56	4,29		
KA 35		0,11	46	0,46	3,95		

