

MARC BONNARD
Rapport de stage de D.E.S en Sciences Naturelles
Université de Bordeaux 1
Année 2003-2004

65905
E400-BON-I
OUR 23998
IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Impact de pesticides sur le génome d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*.

PARTIE I : Etude de l'aneuploïdie sur une population adulte d'huîtres creuses contaminée par un herbicide: le Diuron. (Expérimentation en milieu contrôlé).

PARTIE II : Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du milieu naturel.

PARTIE III : Etude de l'aneuploïdie aux stades précoces de l'huître : optimisation du protocole expérimental.

Partie IV : Comparaison de deux techniques (cytométrie en flux et analyse cytogénétique) pour l'étude de l'aneuploïdie chez l'huître creuse.

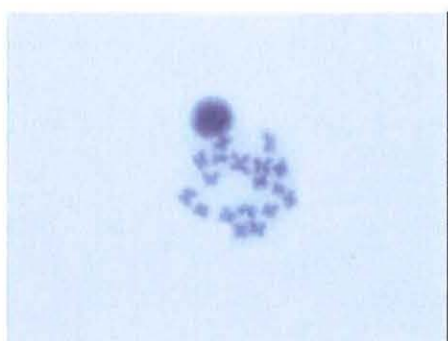
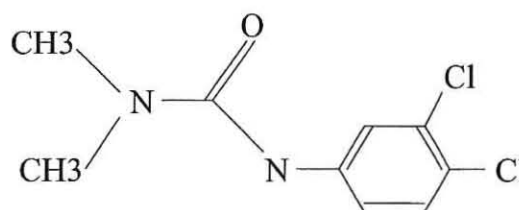


Photo 2: Métaphase à 18 chromosomes.



N'-(3,4 - Dichlorophényl) - N,N - diméthylurée
(Diuron)

Tuteur : Monsieur de Montaudouin,
Laboratoire d'Océanographie Biologique, Université Bordeaux 1.
Responsable scientifique : Sylvie Lapègue,
Co-encadrement : Karine Bouilly (étudiante en thèse),
Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer La Tremblade.

IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
B.P. 133
17390 La Tremblade

Université de Bordeaux 1
351 cours de la Libération
33405 Talence Cedex

Ifremer



Remerciements :

Cette page est l'occasion pour moi d'exprimer mon entière gratitude envers tous ceux qui ont fait que ce stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.

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 de Pathologie qu'il dirige également et de m'y avoir autorisé l'accès en fin de semaine quand le travail se faisait pressant.

J'aimerais remercier tout particulièrement ma responsable Sylvie Lapègue pour m'avoir si bien encadré durant ce stage, pour ses conseils et sa disponibilité; ainsi que Karine Bouilly, étudiante en thèse, qui m'a consacré un temps énorme et apporté une aide très précieuse pour mon étude. Merci de vos conseils pour la rédaction de mon rapport.

Je voudrais remercier mon tuteur, Monsieur de Montaudouin, de m'avoir permis entre autres d'effectuer ce stage et qui a été toujours disponible lui aussi au cours de cette année.

Un grand merci à toute l'équipe de Génétique de l'Ifremer de La Tremblade pour leur participation lors de la reproduction des huîtres adultes contaminées au diuron. J'aimerais remercier particulièrement Raphaël de l'aide qu'il m'a apportée dans la mise en place de toute mon expérimentation de contamination ; Tim et Patrick de m'avoir aidé dans mes études statistiques ; Florence et Stéphanie de leur participation à l'étude comparative de deux techniques (cytométrie en flux et analyse cytogénétique) afin de mettre en évidence l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; Adeline, Pascal et Serge de leur aide et de leurs conseils zootechniques lors de l'élevage larvaire.

J'aimerais remercier également Madame Neaud-Masson de l'Ifremer d'Arcachon de son aide dans l'échantillonnage d'huîtres du bassin d'Arcachon et Madame Auby de m'avoir fourni quelques éléments de réponse pour mon étude de l'aneuploïdie des huîtres du bassin d'Arcachon ; Monsieur Thierry Guyot, technicien au LBEM, de son aide pour l'utilisation du Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA) et Monsieur Chevallier de l'INRA de Saint Laurent de la Prée de m'avoir fourni le Diuron.

Je remercie tous les stagiaires et colocataires (Nicklas, Claire, Noélia, Kévin, Véronique, Valérie, Kostis, Katia, Jacqueline...) qui m'ont permis de décompresser après les journées de travail et avec qui j'ai passé des soirées mémorables.

Un grand merci aux autres membres des "Tongue Twister" (à savoir Tim, Andréa, Lara, Nico, Jean-Côme, Adeline et Cyrielle) pour ce tournoi d'ultimate frisbee, pour cette place de finaliste et le trophée du fair-play.

Merci enfin à toute l'équipe de l'Ifremer de La Tremblade pour leur sympathie.

Sommaire:

	<u>Pages</u>
Présentation de la structure d'accueil.....	5
Introduction.....	6, 7
<u>Partie I: Etude de l'aneuploïdie sur une population adulte d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> contaminées par un herbicide: le Diuron (Expérimentation en milieu contrôlé).</u>	
<u>I/ Présentation.....</u>	8
<u>II/ Matériels et méthodes.....</u>	8 à 11
1) Origine des huîtres étudiées.....	8
2) Protocole expérimental.....	8, 9
3) Fécondations.....	9, 10
4) Elevage larvaire.....	10
5) Etude de l'aneuploïdie.....	10, 11
5.1) Préparations chromosomiques.....	10, 11
5.2) Analyse des données.....	11
<u>III/ Résultats.....</u>	11 à 14
1) Action du diuron sur la mortalité des huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> adultes.....	11
2) Action du diuron sur le génome des huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> adultes.....	12, 13
3) Action du diuron sur la descendance d'une population d'huîtres adultes.....	13, 14
3.1) Action sur le taux d'éclosion.....	13
3.2) Action sur la croissance larvaire.....	14
<u>IV/ Discussion.....</u>	14 à 15
<u>Partie II: Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du milieu naturel</u>	
<u>I/ Présentation.....</u>	16
<u>II/ Matériels et méthodes.....</u>	17 à 18
1) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres de la vasière de Brouage.....	17, 18
1.1) Echantillonnage des huîtres.....	17
1.2) Quantification du cadmium.....	17, 18
2) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du bassin d'Arcachon.....	18
<u>III/ Résultats.....</u>	19 à 20
1) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres de la vasière de Brouage.....	19
2) Quantification du cadmium sur les huîtres de la vasière de Brouage.....	19, 20
3) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du bassin d'Arcachon.....	20
<u>IV/ Discussion.....</u>	20 à 22
<u>Partie III : Etude de l'aneuploïdie aux stades précoces de l'huître : optimisation du protocole expérimental</u>	
<u>I/ Présentation.....</u>	23
<u>II/ Matériels et méthodes.....</u>	23 à 24
<u>III/ Résultats / Discussion.....</u>	24 à 25
<u>IV/ Conclusion.....</u>	25 à 26
<u>Partie IV : Comparaison de 2 techniques (cytométrie en flux et analyse cytogénétique) pour l'étude de l'aneuploïdie</u>	
<u>I/ Présentation.....</u>	27 à 28
<u>II/ Matériels et méthodes.....</u>	28 à 29
1) Echantillonnage des huîtres.....	28
2) Principe de la cytométrie en flux.....	28, 29
<u>III/ Résultats.....</u>	29 à 31
1) Résultats de l'analyse cytogénétique.....	29, 30
2) Résultats de l'analyse par cytométrie en flux.....	30
3) Résultats comparatifs des analyses par microscopie et par cytométrie en flux.....	30, 31
<u>IV/ Discussion.....</u>	31

Conclusion	32
Bibliographie	33 à 35
Annexes	36 à 51
Annexe 1 : Carte de l'estuaire et de la Baie de Vilaine.....	36
Annexe 2 : Données brutes sur l'aneuploïdie des huîtres adultes contaminées au diuron	37, 38
Annexe 3 : Données brutes sur la croissance des larves issues de la reproduction des huîtres adultes contaminées au diuron.....	39
Annexe 4 : Données brutes sur l'aneuploïdie des huîtres de la vasière de Brouage	40 à 42
PEVS 1 : 05/03/03	40
PEVS 2 : 17/06/03	40, 41
PEVS 3 : 30/09/03	41
PEVS 4 : 09/02/04	42
Annexe 5 : Quantification du cadmium sur les huîtres de la vasière de Brouage.....	43
Annexe 6 : Données brutes sur l'aneuploïdie des huîtres du bassin d'Arcachon.....	44, 45
Site : Nord de l'île aux oiseaux	44
Site : Sableyre de Comprian	44
Site : Villa algérienne	45
Annexe 7 : Exemple des pics de fluorescence pour l'individu 3	46
Annexe 8 :	
Graphique 1.....	47
Graphique 2.....	48
Graphique 3.....	49
Annexe 9 : Données brutes de l'analyse cytogénétique et de l'analyse par cytométrie en flux	50, 51

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 (carte 1). Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral. Son aire de compétence s'étend sur 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 deux laboratoires:

- 1) Le Laboratoire Environnement et Ressources de Poitou-Charentes (LERPC) nouvellement créé qui regroupe 2 anciens laboratoires: Le Laboratoire Environnement Littoral (DEL) et le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC).
- 2) Le Laboratoire de Génétique et de 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: Surveillance et optimisation des productions aquacoles.

Le programme : Biologie, santé et génétique des espèces aquacoles.

Le projet: CPER3, Etude de l'aneuploïdie et des ressources génétiques chez *Crassostrea gigas*.



Carte 1: Situation géographique des stations métropolitaines de l'IFREMER.

Introduction :

L'aneuploïdie est un phénomène cytologique qui se définit par l'existence de plus de deux chromosomes homologues par paire chromosomique (hyperdiploïdie) ou par l'absence d'un ou des deux chromosomes dans une paire d'homologues (hypodiploïdie). Ces aberrations numériques sont habituellement causées par des dommages infligés sur l'appareil microtubulaire menant à la perte ou au gain de chromosomes durant la division cellulaire (Dixon et Wilson, 2000). Ce phénomène a en effet pour origine principale une non-disjonction des chromosomes lors des mitoses ou des méioses (Bond et Chandley, 1983 ; Verma, 1990). Si l'aneuploïdie autosomique décrit par de nombreux auteurs s'avère en règle générale létal pour les organismes supérieurs tels que les mammifères (Lint, 1991), ceux-ci peuvent quelquefois survivre avec un nombre anormal de chromosomes mais un retard de croissance y est souvent associé comme dans le cas de la trisomie 21 chez l'homme (Vig et Sandberg, 1987). Les effets de l'aneuploïdie chez les organismes inférieurs sembleraient moins délétères ou mieux tolérés comme chez les bivalves marins (Thiriot-Quiévreux, 1986).

L'aneuploïdie a été étudiée chez de nombreux mollusques marins quelque soit leurs stades de développement. Ainsi l'aneuploïdie a été mise en évidence chez les moules *Mytilus edulis* (Dixon, 1982) et *Mytilus galloprovincialis* (Martínez-Exposito *et al.*, 1992), chez la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* (Yang *et al.*, 2000), chez la mactre *Mulinia lateralis* (Wada *et al.*, 1990) mais également chez de nombreuses espèces d'huîtres : l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica* et l'huître creuse des Caraïbes *Crassostrea rhizophorae* (Rodríguez-Romero *et al.*, 1991), l'huître perlière *Pinctada fucata martensii* (Komaru et Wada, 1994) et bien évidemment l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988 ; Guo *et al.*, 1992 ; Lapègue *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999 ; Bouilly *et al.*, 2003). Chez cette dernière espèce une corrélation négative a été trouvée entre l'aneuploïdie somatique et la croissance (Zouros *et al.*, 1996 ; Leitão *et al.*, 2001a) ce qui est bien évidemment préjudiciable pour les ostréiculteurs. Cependant les causes de l'aneuploïdie ne sont pas encore totalement connues et Leitão *et al.* (2001b) ont supposé l'existence d'une base génétique dans la détermination de ce caractère. Bien que l'aneuploïdie existe naturellement chez cet organisme, des facteurs environnementaux peuvent avoir une inférence sur celle-ci. Ainsi, Bouilly *et al.* (2003) ont été les premiers à mettre en évidence que l'atrazine (herbicide) pouvait être responsable d'une augmentation de l'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas*.

Les pesticides sont des substances d'origine anthropique exclusivement (ou substances de synthèse) qui ont pour fonction de lutter contre les organismes "indésirables". Ils regroupent des composés organiques ou inorganiques à action plus ou moins spécifique tels que des insecticides, fongicides et herbicides. Ces substances également appelées produits phytosanitaires sont largement utilisées par l'agriculture car elles apparaissent bénéfiques d'un point de vue économique. Leur utilisation pose cependant des problèmes en matière de santé publique et de dommages sur les écosystèmes naturels.

Selon la définition donné par le GESAMP (Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) dans le cas particulier de l'environnement marin, le terme de pollution désigne l'introduction directe ou indirecte par l'homme de substances ou d'énergie dans le milieu marin lorsqu'elle a ou peut avoir des effets nuisibles. Le terme de polluant est donc associé à l'apparition dans le milieu d'effets délétères. L'implication des pesticides n'implique pas forcément l'existence d'un effet donc le terme de contaminants est employé.

Le diuron (N'- (3, 4 - Dichlorophényl) - N, N - diméthylurée) est un herbicide systémique de la famille des urées substituées utilisé à la fois pour le désherbage de zones agricoles (arbres fruitiers, asperges, légumineuses fourragères) mais surtout pour celui de zones non agricoles (jardins, cours, trottoirs, parcs, bordures de voirie...). Au niveau national, les quantités produites ont été estimées en 1996 à 109 tonnes et en 1997 à 133 tonnes. Le ministère de l'agriculture a de ce fait, par décisions des 15 février et 4 juillet 1997, interdit l'emploi de diuron seul pour le désherbage des zones non-agricoles. Le diuron ne peut être utilisé qu'en association avec d'autres matières actives et la dose autorisée a été réduite à 3000 g/hectare/an. De plus du 1^{er} avril au 31 décembre, l'épandage de produits à base de diuron pour le désherbage de zones non agricoles est totalement interdit. C'est dans la région Bretagne que le diuron est présent en plus grande quantité dans les cours d'eau. Ainsi, la concentration record a été observée le 3 septembre 1998 sur la Seiche, un affluent de la Vilaine : elle atteignait 15,79 µg/L soit 150 fois la norme réglementaire fixée pour l'eau potable (<http://assoc.wanadoo.fr/erb/diuron.html>).

Le danger représenté par cet herbicide n'est pas négligeable d'autant que la forte toxicité chronique du diuron vis-à-vis des producteurs primaires (phytoplancton, macrophytes) laisse apparaître des possibilités d'effets indirects susceptibles d'amplifier les effets directs. Cependant peu d'études de l'impact du diuron sur les espèces marines ont été entreprises. Haynes *et al.* (2000) ont mis en évidence l'impact du diuron sur la photosynthèse de trois espèces d'herbes marines tropicales : *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* et *Zostera capricorni*. Kobayashi et Okamura (2002) ont révélé dans leur étude une relative toxicité du diuron sur le développement des espèces d'oursins *Hemicentrotus pulcherrimus* et *Anthocidaris crassispina* et Okamura *et al.* (2001) sur des cellules du saumon *Oncorhynchus tshawytscha* mises en culture par suspension. Par ailleurs, dans le cadre des travaux du programme rade de Brest, l'Ifremer a démontré l'impact du diuron vis à vis de la croissance de la coquille Saint Jacques. Canna-Michaelidou et Nicolaou (1996) ont suspecté le diuron comme étant directement génotoxique, c'est à dire capable d'induire des changements dans la structure, le nombre et la position des chromosomes.

La plus grande partie de mon étude a donc consisté à voir si le diuron avait un impact sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et ceci par l'étude de l'aneuploïdie. Une expérimentation a donc été menée sur une population adulte en milieu contrôlé. Il était également intéressant d'étudier dans une autre partie l'aneuploïdie sur des huîtres provenant de deux grands bassins conchylicoles français : Marennes-Oléron et Arcachon. Ces huîtres pourraient présenter d'éventuelles fluctuations du taux d'aneuploïdie qui pourraient être mises en relation avec des conditions environnementales différentes. Si l'aneuploïdie est relativement aisée à étudier chez *Crassostrea gigas* au stade adulte et juvénile, le protocole restait à optimiser pour les stades précoces de cet organisme. La troisième partie de mon étude avait donc pour but d'améliorer ce protocole expérimental afin d'étudier l'aneuploïdie sur la descendance de la population adulte contaminée par le diuron. Enfin l'étude de l'aneuploïdie par comptage chromosomique est une technique relativement contraignante. Une dernière partie a donc consisté à comparer des études cytogénétiques réalisées par comptage chromosomique et par cytométrie en flux afin de savoir si l'aneuploïdie pouvait être étudiée par cette dernière technique.

Partie 1: Etude de l'aneuploïdie sur une population adulte d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* contaminées par un herbicide : le Diuron (Expérimentation en milieu contrôlé)

I/ Présentation :

Cette étude entre dans le cadre du projet RIPest-Baie de Vilaine : "Réponses biologiques d'Invertébrés aquatiques à la présence de Pesticides en Baie de Vilaine : analyse au niveau des individus, populations et communautés selon un continuum milieu continental-milieu marin" qui est associé au projet EBAMVil : "Recherche des Effets Biologiques potentiels liés à l'exposition à des xénobiotiques sur deux espèces amphihalines (Aloses et Mulets) à l'échelle du bassin versant de la Vilaine".

Ces deux projets, soumis à l'action incitative Ifremer-Inra 2003, se proposent d'étudier les effets biologiques des pesticides sur les animaux aquatiques en Baie de Vilaine en mettant en relation les effets observés aux différentes échelles d'organisation biologique avec les niveaux de contamination des milieux.

Cette étude est menée sur 4 stations de la Baie de Vilaine (Pointe de Kervoyal, Pointe de Pen Lan, Pointe du Halguen et Port aux loups) (annexe 1) choisies en fonction de leur situation par rapport au panache de la Vilaine qui détermine un gradient de contamination par les pesticides. Ces stations se situent dans des zones écologiques "sensibles" de la baie, avec notamment la présence de 2 sites retenus dans le cadre de la mise en place du programme Natura 2000 pour leur intérêt patrimonial : le site "Estuaire de la Vilaine" comme Site d'Intérêt Communautaire et la zone "Baies de Kervoyal et de Vilaine" proposée comme Zone de Protection Spéciale. La Baie de Vilaine est par ailleurs un site de suivi de la qualité du milieu marin dans le cadre du Réseau National d'Observation (RNO).

Le but de mon étude est de montrer l'éventuel effet toxique direct du diuron sur le génome d'une population adulte d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en milieu contrôlé.

II/ Matériels et méthodes :

1) Origine des huîtres étudiées

Les huîtres creuses *Crassostrea gigas* qui ont été utilisées pour cette étude étaient âgées d'au moins 3 ans. Elles ont été captées à Bonne Anse puis placées dans les parcs de Lamouroux et de Perquis-Ronce du bassin de Marennes Oléron avant d'arriver au sein de l'écloserie de l'Ifremer. L'expérimentation de contamination au diuron a eu lieu dans la serre.

2) Protocole expérimental :

Cette population adulte d'huîtres creuses a été soumise en milieu contrôlé à différentes concentrations de diuron. Deux concentrations ont été testées : 300 ng/L qui correspondrait à la valeur pic susceptible d'être retrouvée dans le milieu littoral (les seules données existantes sont celles des analyses qui ont été effectuées par la DDASS du Morbihan et qui ont révélées une teneur maximale en diuron dans l'eau de la Vilaine à Férel (plus en amont) de 440 ng/L le 28 août 2003) ; et 3µg/L (concentration 10 fois supérieure).

Six lots (trois lots différents et leurs répliqués) ont été établis. Les lots 1 et 2 correspondant aux lots témoins, les lots 3 et 4 à 300 ng de diuron/L et les lots 5 et 6 à 3 µg de

diuron/L. Chaque lot contenait 75 huîtres au départ. Après une période d'acclimatation en circuit ouvert durant presque 1 mois (du 23/12/03 au 20/01/04), les huîtres ont subi une période de contamination au diuron durant 11 semaines (du 21/01/04 au 07/04/04) en circuit fermé (photo 1). Un suivi de la mortalité a été effectué quotidiennement lors de ces deux périodes. Des solutions à 300 µg/L et à 3 mg/L (concentration 1000 fois supérieure à celle voulue) ont été préparées à partir du diuron qui a été fourni par l'INRA de Saint-Laurent-de-la-Prée sous forme solide et pur à 80%.

Les bacs avaient une contenance de 130 L si bien que 130 mL (volume 1000 fois inférieur) des solutions de diuron à 300 µg/L et à 3 mg/L ont été dilués dans 5 L d'eau de mer puis ajoutés dans les bacs 3, 4 et 5, 6 respectivement. Au cours de cette expérimentation, des problèmes dans la production et la concentration du phytoplancton au sein de l'écloserie ont été rencontrés. Les lots ont donc été nourris différemment au cours de cette expérience. Les huîtres ont été nourries avec du phytoplancton produit au sein de l'écloserie qui était un mélange de 2 phytoflagellés : *Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica* et d'une diatomée : *Chaetoceros gracialis*, et du phytoplancton moins concentré produit à l'extérieur qui était également une diatomée : *Skelletonema costatum*. Pour une maturation optimale chaque huître avait besoin, entre autres, d'un milliard de cellules par jour. Au cours de cette période de contamination, différents régimes alimentaires ont été appliqués quotidiennement pour tous les lots afin d'arriver à cette valeur théorique. L'eau de mer à 20°C (+/- 1°C) ainsi que les solutions de diuron ont été renouvelées chaque jour.



Photo 1 : Bacs contenant les huîtres creuses *Crassostrea gigas* durant leur contamination au Diuron.

3) Fécondations :

Il était également intéressant d'étudier l'aneuploïdie sur la descendance des huîtres adultes contaminées au diuron aux stades embryonnaire ou larvaire et au stade naissain afin de voir si cet herbicide avait un impact sur la génération suivante, dans le cas où un impact serait observé sur la population adulte. Le protocole expérimental concernant l'étude de l'aneuploïdie aux stades précoces chez *Crassostrea gigas* n'ayant malheureusement pas pu être mis au point au cours de ce stage (cf Partie III), cette partie n'a pas pu être réalisée. L'étude de l'aneuploïdie sur la descendance au stade naissain sera effectuée ultérieurement au sein du laboratoire. Des fécondations ont donc eu lieu pour chacun des 6 lots à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Les huîtres adultes sont matures au bout de deux mois environ. Une quantité de nourriture insuffisante pourrait expliquer l'arrivée tardive à maturation des huîtres des différents lots. En effet, 11 semaines ont été nécessaires pour faire murer ces huîtres. Les gamètes de chaque animal 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 et ils 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 été également dénombrés après avoir été disposés

sur une cellule de Mallassez. Le comptage a été effectué avec le logiciel SAMBA. Les fécondations ont eu lieu dans des béciers en verre de 500 mL contenant pour chaque lot 4 millions d'ovocytes et 400 millions de spermatozoïdes. Des réplicats de chaque lot ont été réalisés. Le développement s'est poursuivi dans des jarres de 50 L en salle d'élevage larvaire (photo 2). Les croisements provenant des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ont été identifiés lots 1A, 2A, 3A, 4A, 5A et 6A respectivement et leurs réplicats lots 1B, 2B, 3B, 4B, 5B et 6B respectivement.



Photo 2 : Salle d'élevage larvaire avec les 12 lots étudiés.

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 deux phytoflagellés *Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica* et d'une diatomée *Chaetoceros calcitrans forma pumillum*. Ces trois espèces favorisent la croissance et augmente le taux de survie. Au bout de 19 ou 25 jours, les larves retenues sur un tamis de 220 μm ont été placées en micronurserie afin de permettre leur fixation. Les larves ont été disposées sur des tamis de 150 μm avec de la microbrisure (dont la taille est équivalente à celle des larves permettant ainsi la fixation d'une seule larve par grain). Au cours de leur grossissement, les larves ont été transférées sur des tamis de 350 μm puis elles ont poursuivi leur croissance en serre sur des tamis de 1000 μm .

5) Etude de l'aneuploïdie

5.1) Préparations chromosomiques

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

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 a varié 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.

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.

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

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.

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.

5.2) Analyse des données

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. Comme le nombre de métaphases par individu est le même pour tout le matériel étudié, il est possible de tester les effets des lots en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (lots de diuron et réplicats) avec le logiciel SYSTAT 9.0 (Wilkinson, 1990). Le taux d'éclosion ainsi que la croissance larvaire ont été étudiés statistiquement avec le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis.

III/ Résultats :

1) Action du diuron sur la mortalité des huîtres creuses *Crassostrea gigas* adultes.

Au cours de la période de contamination au diuron, la mortalité enregistrée a été très faible sauf pour un seul lot. Elle a été nulle pour les bacs 2 et 3, de 1,35 % pour le bac 1, de 2,7 % pour le bac 4, de 5,4 % pour le bac 6 et de 31,3 % pour le bac 5. Pour ce dernier cas, cette mortalité importante serait due à un "effet bac" et non pas à la concentration de diuron (qui était de 3 µg/L). Des analyses bactériologique et histologique ont été effectuées par une équipe de pathologie de l'Ifremer de La Tremblade sur des individus moribonds et sur 7 individus vivants qui ont été prélevés dans ce lot. Elles ont révélé la présence d'une souche bactérienne majoritaire du genre *Vibrio sp.* dans l'hémolymphe des individus moribonds mais pas dans celle des individus vivants. Bien qu'aucune analyse statistique n'ait été effectuée à cause de cet effet bac, il semblerait néanmoins que le diuron n'ait pas d'influence sur la mortalité des huîtres adultes lors de cette période de contamination.

2) Action du diuron sur le génome des huîtres creuses adultes *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* possède à l'état diploïde 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967) (photo 3). Lors du comptage des métaphases, des cellules ne présentant que 19 (photo 4), 18 (photo 5) ou 17 chromosomes (photo 6) ont été observées:

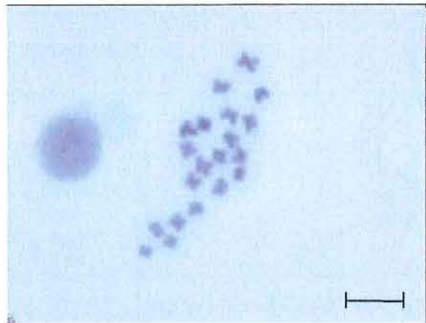


Photo 3 : Métaphase à $2n = 20$ chromosomes.
Echelle = 15 μm

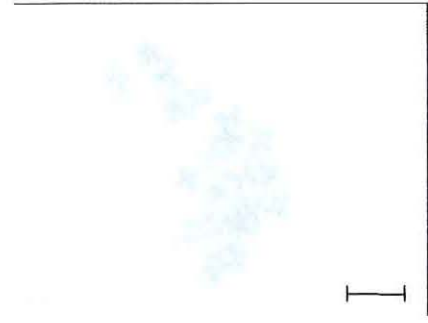


Photo 4 : Métaphase à $2n = 19$ chromosomes.
Echelle = 7 μm

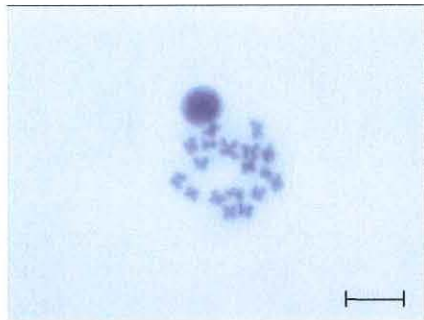


Photo 5 : Métaphase à $2n = 18$ chromosomes.
Echelle = 15 μm

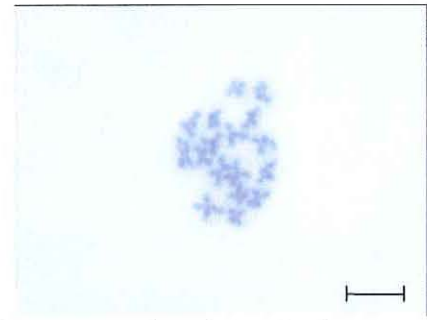


Photo 6 : Métaphase à $2n = 17$ chromosomes.
Echelle = 9 μm

Le caryotype standard de *Crassostrea gigas* a également pu être établi. Il contient 10 paires de chromosomes métacentriques (Thiriôt-Quévieux, 2002). Leur différenciation s'est donc faite selon leur taille (figure 1) :

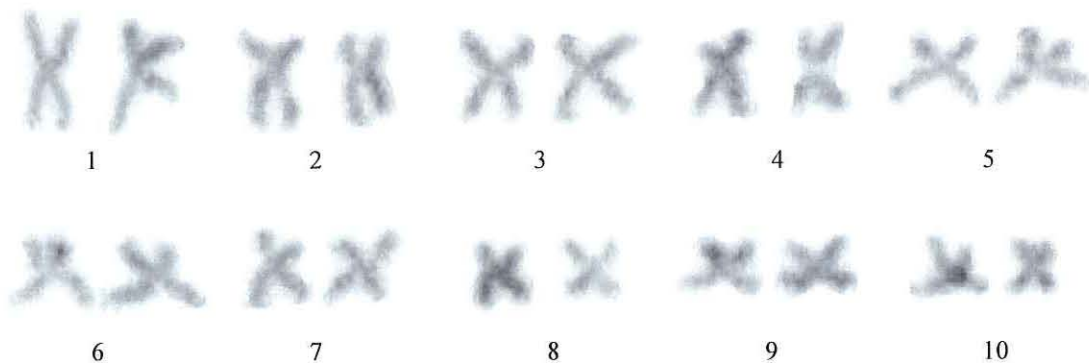


Figure 1 : Caryotype de l'espèce *Crassostrea gigas* à $2n = 20$ chromosomes.

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).

Les lots qui ont été soumis à différentes concentrations de diuron ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 et 2 (témoins), 3 et 4 (300 ng/L) et 5 et 6 (3 µg/L) ont varié de 7,3 à 10 %, de 16,3 à 16,6 % et de 14,6 à 15,6 % respectivement (figure 2). Une analyse de variance à deux facteurs (lots et réplicats) a montré que le taux moyen d'aneuploïdie différait de façon significative entre les traitements ($F = 13,658$; $P = 0,000$) mais pas entre les réplicats ($F = 0,115$; $P = 0,736$). Une analyse statistique plus poussée a montré une différence significative du taux moyen d'aneuploïdie entre les lots témoins et les lots à 300 ng/L ($F = 25,598$; $P = 0,000$) et entre les lots témoins et les lots à 3 µg/L ($F = 17,09$; $P = 0,000$) mais pas entre les lots à 300 ng/L et les lots à 3 µg/L ($F = 0,617$; $P = 0,437$). Les données brutes figurent en annexe 2.

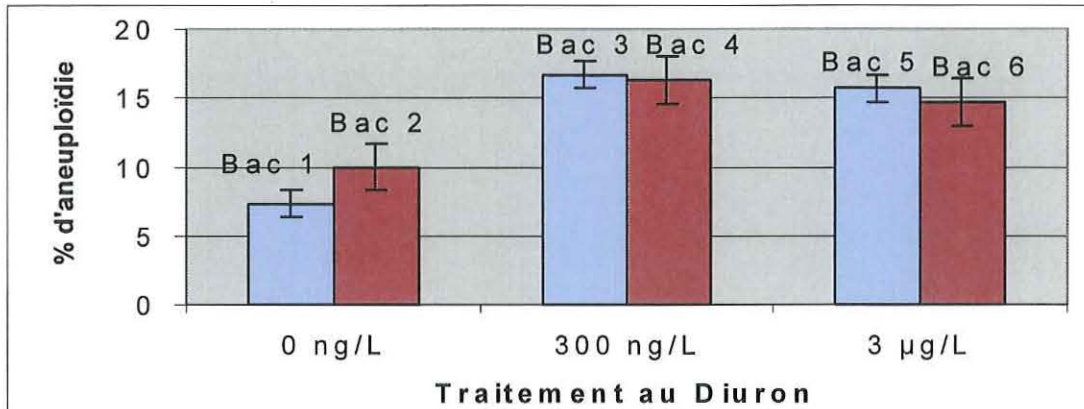


Figure 2 : Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres adultes *Crassostrea gigas* en fonction du traitement au diuron.

3) Action du diuron sur la descendance d'une population d'huîtres adultes

3.1) Action sur le taux d'éclosion

Les lots témoins ont présenté un taux d'éclosion moyen de 59,2 % alors que les lots qui ont été contaminés à 300 ng/L et à 3 µg/L ont présenté un taux d'éclosion moyen de 68,05 % et de 45,7 % respectivement (figure 3). Un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a montré aucune différence significative du taux d'éclosion en fonction des lots ($F = 5,34$; $P = 0,06$).

Le diuron n'aurait donc pas d'influence sur le taux d'éclosion des géniteurs, quelque soit la concentration appliquée.

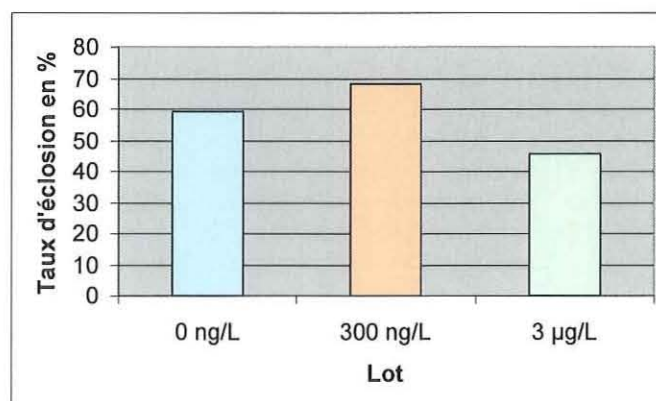


Figure 3 : Taux d'éclosion en pourcentage en fonction du lot.

3.2) Action sur la croissance larvaire

La figure 4 représente la croissance des larves exprimée par leur taille moyenne en μm en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du traitement :

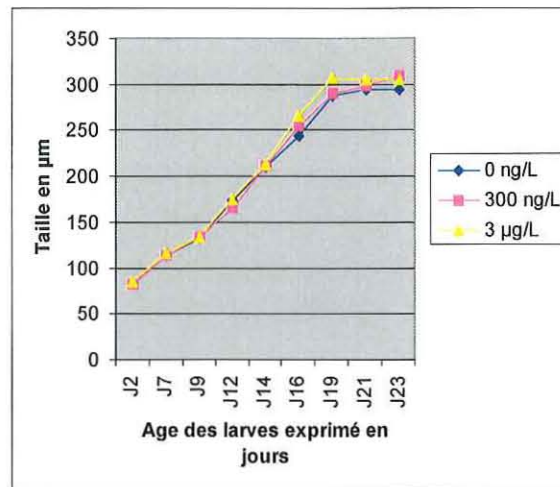


Figure 4 : Taille des larves en μm en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du traitement.

Un test de Kruskal-Wallis n'a montré aucune différence significative de la taille des larves en fonction du traitement au diuron ($P > 0,05$) pour chaque jour sauf pour J16 ($P = 0,016$) où les larves présentaient une taille moyenne plus grande pour le traitement à $3 \mu\text{g/L}$ que celle du traitement à 300 ng/L ou celle du témoin. Le diuron appliqué sur les géniteurs n'aurait alors aucun effet sur la croissance larvaire de la seconde génération. Les données brutes figurent en annexe 3.

IV/ Discussion :

Le diuron n'a pas montré d'effet sur la mortalité des huîtres adultes lors de leur contamination comme pour l'étude de Moraga et Tanguy (1999). Il a cependant montré un effet sur le taux moyen d'aneuploïdie de ces huîtres. Une différence hautement significative a été observée entre les lots témoins (non contaminés) et les lots contaminés aux différentes concentrations de diuron testées (300 ng/L ou $3 \mu\text{g/L}$). Une relation positive entre le taux d'aneuploïdie et la concentration en diuron peut ainsi être mise en évidence. Par contre, les lots contaminés n'ont pas présenté des taux moyens d'aneuploïdie significativement différents. Ils étaient même très proches ($16,5\%$ contre 15% à peu près). L'effet du diuron sur le génome des huîtres serait donc le même pour une concentration de 300 ng/L ou de $3 \mu\text{g/L}$ puisqu'il n'y a pas eu d'effet dose-dépendant. Il serait alors intéressant de tester une plus forte concentration de cet herbicide (3 mg/L par exemple) pour voir si l'impact sur le génome des huîtres est du même ordre ou plus élevé mais également des concentrations plus faibles pour savoir à partir de quelle concentration le diuron a un impact sur l'intégrité du génome de ces bivalves.

Après l'atrazine (Bouilly *et al.*, 2003), le diuron est le second herbicide mis en cause pour être responsable d'une augmentation de l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Leitão *et al.* (2001b) ont mis en évidence que la perte de chromosomes dans les cellules somatiques de l'huître creuse est associée avec un taux de croissance plus faible. Il existe donc une corrélation négative entre le taux de croissance et le taux d'aneuploïdie. La grande variabilité de croissance est un problème important pour la production aquacole de l'huître

creuse *Crassostrea gigas* ; et notamment pour le bassin de Marennes-Oléron où la croissance est de plus en plus faible due à une très forte densité mais des polluants chimiques (tels que le diuron) pourraient en être responsable en partie. Cependant, le lien entre environnement et aneuploïdie est encore très peu étudié chez les bivalves. L'effet de l'atrazine sur l'augmentation de l'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* a été montré par Bouilly *et al.* (2003) ainsi que l'effet du cadmium (Bouilly, 2003). Dixon (1982) et Dixon et Wilson (2000) ont montré que chez un bivalve, *Mytilus edulis* au stade embryonnaire, le pourcentage de l'aneuploïdie était plus élevé chez des embryons issus de géniteurs provenant d'un environnement contaminé chimiquement. Steinert (1999) a montré chez *Mytilus galloprovincialis* que la fréquence de cellules avec de l'ADN endommagé était plus élevée lors d'une plus grande exposition à des contaminants.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont particulièrement importants car dans la majorité des cas les activités agricoles et aquacoles se juxtaposent puisqu'elles utilisent toutes les deux la même ressource en eau douce et suscitent de ce fait l'inquiétude des conchyliculteurs quant à la dégradation de la qualité des eaux par les produits phytosanitaires. Le diuron qui est un contaminant majeur des eaux bretonnes est classé dans le groupe n°2, produits mobiles, du point de vue du risque d'entraînement vers la ressource en eau (<http://assoc.wanadoo.fr/erb/diuron.html>). Il est donc très susceptible de se retrouver dans le milieu aquatique et plus particulièrement le milieu littoral et d'affecter ainsi les ressources halieutiques.

Nos résultats n'ont pas montré d'influence du diuron sur le taux d'éclosion. En effet celui-ci ne différait pas de façon significative entre les différents traitements. Cependant, le test statistique a été effectué sur le pourcentage moyen des lots (la moyenne par exemple de 1A, 1B, 2A, 2B: lot témoin) alors que des variations importantes au sein de ceux-ci ont pu être observées. En comparant les pourcentages moyens, les "effets bacs" possibles ne sont pas pris en considération par ce test. De plus pour étudier le taux d'éclosion, le comptage des larves obtenues à J2 doit être conséquent. Plusieurs réplicats doivent être effectués. Par manque de temps, une telle étude n'a pu être entreprise. Les résultats ainsi obtenus sont donc à prendre avec précaution.

Les descendants des huîtres creuses *Crassostrea gigas* soumises à différentes concentrations de diuron ont montré une croissance larvaire identique à ceux des lots non soumis à ce contaminant. La même observation avait été faite par Bouilly *et al.* (sous presse) avec l'atrazine. Un temps d'exposition plus long des géniteurs à cet herbicide aurait peut-être pu avoir une incidence sur la croissance larvaire des descendants. Il aurait été également intéressant de voir si le diuron aux différentes concentrations testées avait un effet sur la croissance des larves et du naissain dans le cas d'une exposition directe.

L'impact éventuel de cet herbicide sur l'aneuploïdie des descendants sera étudié au stade naissain ultérieurement au sein du laboratoire car le protocole concernant l'étude de l'aneuploïdie sur les embryons ou larves n'est pas encore opérationnel. Cette étude permettrait de voir si l'impact du diuron est persistant sur la génération suivante. Il serait intéressant de poursuivre cette recherche par l'étude de l'aneuploïdie sur des huîtres juvéniles directement contaminées par les mêmes concentrations de diuron que celles appliquées aux huîtres adultes et de voir si la sensibilité face à ce contaminant est différente suivant le stade de développement de l'huître.

Enfin, le surplus des huîtres adultes contaminées a été transféré en eau propre. Il pourrait alors être intéressant d'étudier l'aneuploïdie de ces huîtres afin de voir si le diuron a un impact persistant dans le temps ou bien si les huîtres sont capables d'une détoxification de cet herbicide.

Partie 2 : Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du milieu naturel

I/ Présentation :

Après avoir étudié en conditions expérimentales au laboratoire l'impact du diuron sur le génome d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, il était également intéressant d'étudier le phénomène d'aneuploïdie sur des huîtres du milieu naturel qui sont soumises à un pool de contaminants chimiques tels que métaux lourds et produits phytosanitaires.

Cette étude entre dans le cadre de 2 programmes :

1) Le Programme Environnement, Vie et Sociétés (PEVS) qui a pour titre : Impact des micropolluants (métaux lourds et phytosanitaires) sur le fonctionnement d'un écosystème : application sur la vasière de la zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron. La zone littorale est soumise à d'importants apports de micropolluants qui s'accumulent dans les différents compartiments des biotopes et des biocénoses et qui peuvent, par leur action toxique, perturber le fonctionnement de l'écosystème. Or, la frange côtière est une zone à forte activité économique (aquaculture, pêche, tourisme) extrêmement sensible à ce type de pollution. Le site des Pertuis Charentais constitue une zone privilégiée pour une telle étude. Effectivement, il est soumis à une pollution métallique chronique par le Hg provenant de la Charente et par le Cd, Zn et Cu provenant de la Gironde et des zones portuaires de l'agglomération rochelaise. De plus, la Charente qui alimente en partie le bassin de Marennes-Oléron, véhicule des produits phytosanitaires en quantités non-négligeables (Scribe *et al.*, 1998) et les difficultés actuelles de l'ostréiculture sur ce bassin (reproduction non-maîtrisable, mortalités incomplètement expliquées...) font de celui-ci une zone caractéristique de conflits d'usage ostréiculture / agriculture. Ce projet a donc 2 objectifs :

- Evaluer l'impact des contaminants sur le fonctionnement de cet écosystème particulier.
- Estimer le rôle d'acteur des organismes vivants dans la transformation et le transfert des contaminants, et en particulier, l'influence de la structure du réseau trophique sur le devenir des contaminants.

Pour répondre à cet objectif, une approche pluridisciplinaire est menée; à la fois chimique, géochimique, écologique et écotoxicologique. Cette dernière permettra d'évaluer l'impact des micropolluants sur la production primaire et secondaire de l'écosystème et dans mon cas sur le génome des huîtres.

2) Le Programme CPER 3 (Contrat de Plan Etat-Région Poitou-Charentes) qui a pour titre : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique. Ce programme comporte deux actions :

- L'action 1 qui consiste à étudier les ressources et la diversité génétique chez l'huître creuse. Le programme MOREST (MORTalités ESTivales) a été créé pour sélectionner et développer des souches résistantes à cette mortalité importante dans le bassin de Marennes-Oléron.
- L'action 2 qui consiste à étudier les anomalies chromosomiques (aneuploïdie) chez *Crassostrea gigas*. Les effets de polluants (atrazine, cadmium...) sont testés sur le génome d'huîtres à divers stades de développement.

II/ Matériels et méthodes :

1) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres de la vasière de Brouage

1.1) Echantillonnage des huîtres

Au cours de l'année 2003 et au début de l'année 2004, des prélèvements d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* ont été réalisés sur un site atelier des Pertuis-Charentais : la vasière intertidale de Brouage dans le bassin conchylicole de Marennes-Oléron. Ces prélèvements ont eu lieu le 5 mars, le 17 juin et le 30 septembre de l'année 2003 et sont appelés respectivement PEVS 1, 2 et 3 ; et le 9 février 2004 (PEVS 4). Après le prélèvement, les huîtres ont été placées en circuit ouvert pendant environ un mois où les conditions de température et de nourriture sont plus optimales pour leur développement que celles du milieu naturel. Ce conditionnement permet d'obtenir une meilleure croissance et donc une meilleure activité mitotique. L'aneuploïdie a été étudiée sur 30 individus pour chaque prélèvement sauf pour PEVS 3 où il n'y en a eu que 10 analysés. Pour ce dernier, les deux essais réalisés n'ont révélé qu'un faible nombre de métaphases comptables par individu. Lors du premier essai, les huîtres ont été stockées dans des dégorgeoirs extérieurs où la concentration du phytoplancton était trop faible pour leur permettre un développement optimal. C'est ce même phytoplancton qui a été utilisé lors de l'exposition à la colchicine. Les huîtres de ce fait n'ont peut-être pas filtré toute la colchicine, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de métaphases comptables obtenus pour ces individus. Lors du second essai, les huîtres étaient toujours stockées dans des dégorgeoirs extérieurs à cause d'une période de vide sanitaire au sein de l'écloserie. Lors de l'exposition à la colchicine, elles ont cependant été nourries avec du phytoplancton produit au sein de l'écloserie qui est plus concentré. Mais ce mauvais conditionnement pourrait expliquer le faible nombre de métaphases comptables sur les lames microscopiques. La préparation de ces dernières et leur lecture est la même que celle présentée dans la partie 1.

1.2) Quantification du cadmium.

L'analyse du cadmium sur les huîtres de la vasière de Brouage a été effectuée au sein du Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) de l'université de La Rochelle à l'aide d'un Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA).

Pour chaque prélèvement, 35 individus ont été échantillonnés et séparés en 5 pools de 7 individus. La chair de ces huîtres a tout d'abord été décoquillée à l'aide d'un scalpel puis congelée avant d'être placée dans des boîtes de Pétri qui sont restées dans le lyophilisateur (photo 1) durant 4 jours. Celui-ci a pour fonction d'assécher la chair. Le poids de ces huîtres a été mesuré puis elles ont été broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Une passoire a été utilisée 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 3 (foie d'Aiguillat commun) dont la concentration en cadmium est connue (19,4 +/- 0,6 mg Cd/kg). Les étapes suivantes correspondent à la minéralisation acide qui a pour but d'éliminer toute la matière organique, de façon à ne conserver que la matière minérale dont le cadmium. A chacun des bêchers sont ajoutés 5 mL d'acide nitrique HNO₃ à 14N et ils sont placés sur une plaque chauffante à 150°C pendant 3 jours afin de laisser les acides agir (photo 2). Une fois l'extraction réalisée et après que la vapeur se soit évaporée, 10 mL d'acide nitrique à 0,3N sont ajoutés dans chaque bêcher. Une heure plus tard, la solution est transférée dans un flacon à scintillation puis lue au SAA (photo 3).

La spectrophotométrie d'absorption atomique constitue un outil privilégié d'analyse minérale par le dosage d'éléments majeurs ou traces dans divers types de substrats ou tissus biologiques. Elle consiste dans notre cas à vaporiser un échantillon liquide et à le chauffer à l'aide d'une flamme à acétylène. Cette dernière est dirigée vers une lumière émise par une lampe à deutérium émettant les longueurs d'onde caractéristiques du cadmium. En traversant la flamme, les ondes lumineuses sont absorbées par les ions excités présents dans la flamme. L'absorption est mesurée à l'aide d'un prisme dispersif et d'une cellule photoélectrique : elle est directement proportionnelle à la concentration de cadmium. Lorsque les atomes de ce dernier ont été excités, leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de lumière d'une fréquence propre au cadmium. Le cadmium dispersé dans une flamme possède la propriété d'absorber tout rayonnement à la même fréquence. Il en résulte une absorption du rayonnement incident lié à la concentration de cadmium. En mode flamme, la détection est de l'ordre du ppm (parties par million). (<http://www.sols.ucl.ac.be/infrastructure/icp.html>).



Photo 1 : Lyophilisateur



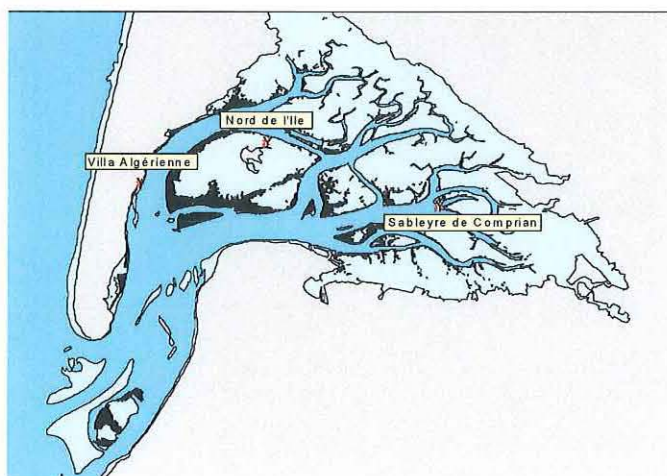
Photo 2 : Minéralisation acide



Photo 3 : Spectrophotomètre d'absorption atomique

2) Etude de l'aneuploïdie sur des huîtres du bassin d'Arcachon

Les huîtres ont été prélevées durant le mois de mai 2003 sur 3 sites du bassin d'Arcachon : Villa Algérienne, Nord de l'île aux oiseaux et Sableyre de Comprian (carte 1). Après l'échantillonnage, les huîtres ont été mises en conditionnement dans des bacs à circuit ouvert pendant environ 1 mois. Pour les sites de Nord-île et Villa, l'aneuploïdie a été étudiée sur 14 individus et 15 pour le site Comprian selon le même protocole expérimental que celui détaillé auparavant.

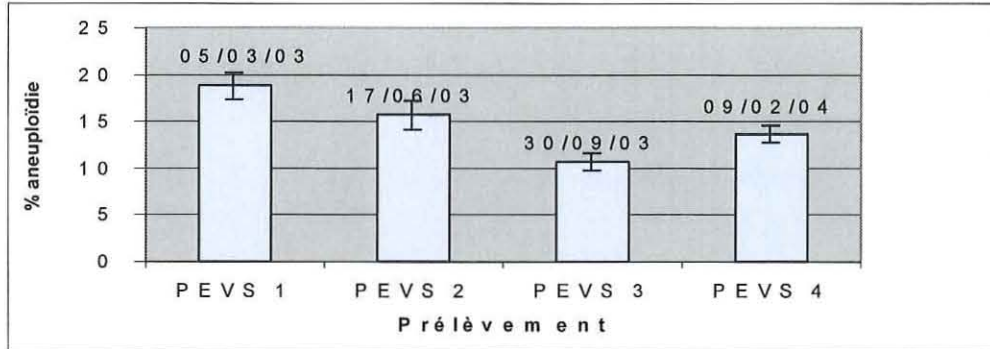


Carte 1 : Localisation des points de prélèvement sur le bassin d'Arcachon.

III/ Résultats :

1) Etude de l'aneuploïdie sur les huîtres de la vasière de Brouage

Le graphique 1 représente le taux d'aneuploïdie moyen des huîtres récoltées sur la vasière de Brouage à différentes périodes. Ce graphique a été réalisé à partir de données brutes figurant en annexe 4.

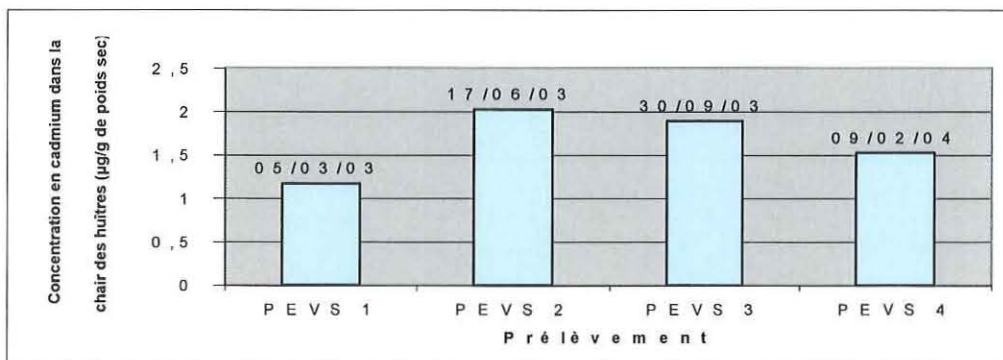


Graphique 1 : Taux moyen d'aneuploïdie des huîtres de la vasière de Brouage en fonction de la période de prélèvement.

Une analyse de variance a indiqué que le taux moyen d'aneuploïdie des huîtres différait significativement en fonction de leur période de prélèvement ($F = 4,670$; $P = 0,004$). Une analyse statistique plus poussée a montré une différence significative entre les mois de mars et septembre 2003 ($F = 10,38$; $P = 0,003$) et les mois de mars 2003 et février 2004 ($F = 9,312$; $P = 0,003$) ; mais pas entre les mois de mars et juin 2003 ($F = 2,274$; $P = 0,137$), de juin et septembre 2003 ($F = 3,349$; $P = 0,071$), de juin 2003 et février 2004 ($F = 1,289$; $P = 0,261$) et de septembre 2003 et février 2004 ($F = 3,193$; $P = 0,082$).

2) Quantification du cadmium au sein des huîtres de la vasière de Brouage

Le graphique 2 présente la concentration de cadmium dans la chair des huîtres en fonction de la période de prélèvement de celles-ci. Les données brutes se situent en annexe 5.



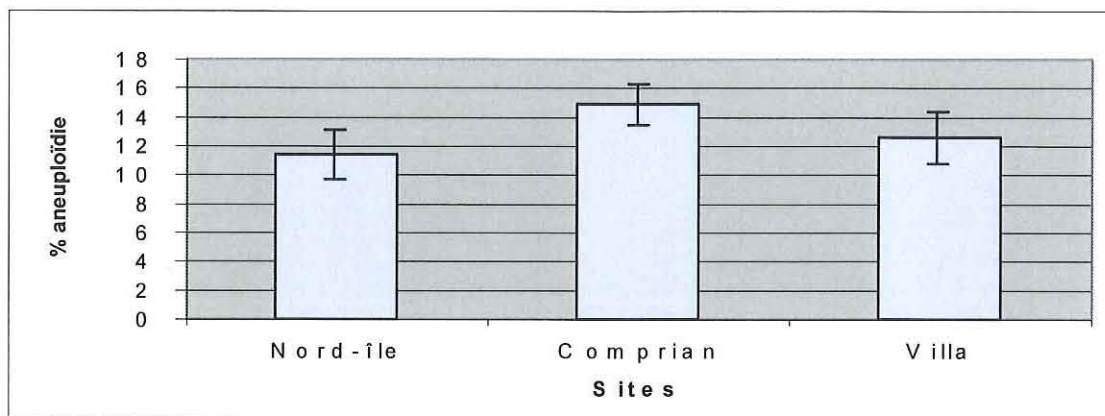
Graphique 2 : Concentration de cadmium (en $\mu\text{g/g}$ de poids sec) dans la chair des huîtres en fonction de leur période de prélèvement.

Une analyse de variance à un facteur (période de prélèvement) a montré que la concentration en cadmium dans la chair des huîtres était significativement différente en fonction de la période de prélèvement ($F = 20,618$; $P = 0,000$). Une analyse statistique plus

poussée a révélé une différence significative entre toutes les périodes sauf entre juin et septembre 2003 ($F = 0,568$; $P = 0,473$).

3) Etude de l'aneuploïdie sur les huîtres du Bassin d'Arcachon

Le graphique 3 présente le taux moyen d'aneuploïdie des huîtres du bassin d'Arcachon en fonction de leur site de prélèvement. En annexe 6 figurent les données brutes.



Graphique 3 : Taux moyen d'aneuploïdie d'huîtres échantillonnées sur différents sites du bassin d'Arcachon.

L'analyse de variance a montré que le taux moyen d'aneuploïdie ne variait pas significativement en fonction du site de prélèvement des huîtres analysées ($F = 1,162$; $P = 0,323$).

IV/ Discussion :

L'étude sur les huîtres de la vasière de Brouage a révélé une différence significative du taux moyen d'aneuploïdie en fonction de la période de prélèvement. Ce taux a globalement diminué au cours de l'année 2003. Les mois de mars et juin, bien qu'ils ne présentent pas de différence significative, ont enregistré les taux moyens d'aneuploïdie les plus forts. Par contre une différence significative entre les mois de mars et septembre a été trouvée. Cependant ce troisième prélèvement, qui révèle le taux d'aneuploïdie le plus faible, n'a comptabilisé que 10 individus. Il n'est donc pas à exclure que ce faible effectif ait pu entraîner un biais dans nos résultats. D'une année sur l'autre (mars 2003 et février 2004), une baisse significative du taux d'aneuploïdie a été observée. Par contre entre les mois de juin, septembre 2003 et février 2004, il ne différait pas de façon significative.

Des études ont montré que des produits phytosanitaires pouvaient augmenter l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; notamment l'atrazine (Bouilly *et al.*, 2003) et apparemment le diuron. Des quantités différentes de ces produits phytosanitaires dans le milieu naturel pourraient alors expliquer en partie les variations observées des taux moyens d'aneuploïdie des huîtres. Munaron a démontré, dans une étude portant sur l'estimation des apports d'herbicides dans la baie de Marennes-Oléron pour l'année 2001, que les produits phytosanitaires se trouvaient en plus grande quantité en hiver où le ruissellement est le plus important et au printemps qui correspond à la période d'épandage de ces produits (du mois d'avril au mois de juillet) (http://www.pesticidechemistry12.org/proceedings12/717-726%20Munaron_717.pdf). Les taux d'aneuploïdie les plus élevés ont effectivement été

observés chez les individus prélevés en mars et juin 2003. Par contre le taux d'aneuploïdie pour février 2004 était bien plus faible ; alors qu'une valeur proche de celle de mars 2003 était plutôt attendue d'après cette hypothèse. Elle pourrait peut-être s'expliquer par des précipitations plus faibles et donc un apport de pesticides moins important au bassin de Marennes-Oléron. D'après le bulletin climatologique mensuel de la Charente-Maritime publié par Météo France pour les années 2003 et 2004, il a été remarqué de fortes précipitations la semaine précédant le 1^{er} prélèvement (du 05/03/03) alors que les deux semaines d'avant, les précipitations étaient plutôt faibles. Le lessivage a donc pu être important entraînant ainsi de grandes quantités de pesticides sur le littoral et pouvant alors expliquer un plus fort taux d'aneuploïdie. Pour le 4^{ème} prélèvement (du 09/02/04), peu de précipitations ont été enregistrées la semaine précédant ce prélèvement alors que celles-ci étaient fortes les deux semaines d'avant. Les quantités de pesticides ont peut-être été amenées au littoral de manière plus diffuse et ceci pourrait expliquer un plus faible taux d'aneuploïdie des huîtres. Cependant Munaron a démontré dans son étude que les herbicides qui transitaient dans le bassin durant l'année 2001 étaient constitués à 90% de triazines (dont 60% correspondant à l'atrazine et à ses métabolites) et à 10% de composés phénylurées comme le diuron et l'isoproturon. Or un avis de retrait de l'atrazine et de quelques autres produits phytosanitaires a été publié le 27 novembre 2001. Ces pesticides sont interdits de vente depuis le 30 septembre 2002 et la date limite d'utilisation des stocks a été fixée au 30 septembre 2003 (<http://www.senat.fr/rap/102-215-1/102-215-126.html>). La réduction de l'utilisation de ces pesticides par les agriculteurs en 2003 pourrait peut-être expliquer la différence du taux moyen d'aneuploïdie des huîtres observée d'une année sur l'autre.

Il serait cependant réducteur de penser que seuls les produits phytosanitaires puissent être responsables, en temps que facteur environnemental, de l'augmentation de l'aneuploïdie des huîtres. En effet, le bassin de Marennes-Oléron est 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 est connu pour sa forte capacité aneugène (induisant l'aneuploïdie) (Güerci *et al.*, 2000) ; comme l'a mise en évidence Bouilly (2003) chez l'huître adulte. De plus 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, 1979). Pour cette raison, la quantification du cadmium chez les huîtres prélevées était intéressante à mener car elle pouvait peut-être expliquer en partie les différences observées des taux d'aneuploïdie. L'analyse de variance a montré une teneur en cadmium dans les huîtres significativement différente pour toutes les périodes sauf entre juin et septembre 2003. Les résultats ont montré une concentration de cadmium dans la chair des huîtres plus importante pour les prélèvements en période estivale (ceux du 17/06/03 et du 30/09/03) que pour ceux en période hivernale (ceux du 05/03/03 et du 09/02/04). Ces résultats sont en contradiction avec ceux d'Amiard *et al.* (1994) qui trouvaient en période hivernale des quantités plus importantes de cadmium dans les tissus mous des huîtres. Par contre celles-ci étaient en prégrossissement en nourricerie, où la densité, la quantité de nourriture peuvent être modifiées, et non pas dans le milieu naturel ; ce qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires. D'après mes résultats, il n'y aurait *a priori* pas de lien entre la concentration de cadmium dans la chair des huîtres et le taux moyen d'aneuploïdie. En effet pour le premier prélèvement, la valeur du taux d'aneuploïdie est la plus forte alors que la teneur en cadmium est la plus faible. Pour les autres prélèvements, cette relation n'est pas valable. Le cadmium seul ne serait donc pas responsable de l'augmentation de l'aneuploïdie des huîtres mais sa participation n'est cependant pas à exclure.

Bien que le bassin de Marennes-Oléron soit la zone ostréicole la plus importante d'Europe avec une production annuelle de 30000 tonnes soit un tiers de la production nationale (<http://www.sir-poitou-charentes.org/STOCKPDF/Atlasagri/Aag25.pdf>), l'ostréiculture représente une économie non-négligeable pour d'autres bassins français comme

le bassin d'Arcachon. Il était alors intéressant d'étudier l'aneuploïdie des huîtres de cet écosystème. Les taux moyens d'aneuploïdie, du même ordre que ceux observés dans le bassin de Marennes-Oléron, ne différaient pas significativement selon le site d'échantillonnage. Ce taux serait sensiblement le même pour des sites proches géographiquement : Villa Algérienne et Nord de l'île aux oiseaux et plus faible du fait peut-être de leur proximité aux passes. Ce taux serait plus élevé pour le site de la Sableyre de Comprian qui est situé plus à l'intérieur du Bassin d'Arcachon et à l'embouchure de la rivière principale qui l'alimente : l'Eyre. Le bassin versant de cette rivière est en partie constitué de zones d'exploitation du maïs. Ce type de culture nécessite également l'emploi par les agriculteurs de pesticides. Ceux-ci pourraient très probablement se retrouver dans le bassin d'Arcachon via l'Eyre et expliquer de ce fait le taux d'aneuploïdie plus élevé des huîtres du site de la Sableyre de Comprian.

Partie 3 : Etude de l'aneuploïdie sur des larves d'huîtres : optimisation du protocole expérimental

I/ Présentation :

L'étude de l'aneuploïdie sur les huîtres creuses *Crassostrea gigas* à différents stades de développement était intéressante à mener car les causes de ce phénomène ne sont pas encore totalement connues, ni la période de la vie de l'animal où ce phénomène se déclenche. L'observation de l'aneuploïdie peut présenter des difficultés chez des individus adultes car l'activité mitotique est plutôt faible surtout en période de reproduction ; alors qu'elle est relativement aisée chez des individus au stade naissain car l'activité mitotique est plus élevée comme ils sont en période de croissance (Lapègue *et al.*, 1999). Il était alors intéressant de savoir si l'aneuploïdie se manifestait dès la vie embryonnaire ou larvaire des individus.

L'aneuploïdie aux stades précoces a déjà été étudiée par de nombreux auteurs sur différentes familles et espèces de Mollusques marins. Ainsi pour les Ostréidés, Guo et Allen (1997) ont étudié l'aneuploïdie sur des embryons de 4 heures de *Crassostrea gigas* ; Xu *et al.* (2001) sur des embryons de 6 heures de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*. L'aneuploïdie a été étudiée sur des larves trochophores d'huîtres *Crassostrea gigas* par Li *et al.* (2000) alors que Rodríguez-Romero *et al.* (1991) l'ont étudié à la fois aux stades embryonnaire et larvaire chez *Crassostrea virginica* et *Crassostrea rhizophorae*. Pour les Mytilidés, des études chromosomiques ont été effectuées sur des embryons de *Mytilus edulis* (Dixon, 1982) mais également sur des larves de 16 heures et des larves véligères de *Mytilus galloprovincialis* (Martínez-Expósito *et al.*, 1994 ; Martínez-Lage *et al.*, 1994). L'aneuploïdie a également été mise en évidence sur des larves âgées de 6 heures chez l'huître perlière *Pinctada fucata martensii* (Komaru et Wada, 1994), sur des larves trochophores chez la mactre *Mulinia lateralis* (Wada *et al.*, 1990) ainsi que sur des embryons de la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* (Yang *et al.*, 2000).

La plupart des auteurs n'ont observé dans leurs études qu'un faible nombre de métaphases comptables sur les lames microscopiques. Or, un minimum de 30 métaphases par individu est requis pour une analyse statistique correcte pour les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981 ; Wenger *et al.*, 1984). Les protocoles expérimentaux devaient donc être optimisés par la variation de certains paramètres (concentration ou temps de colchicine, nature et temps d'action de la solution fixatrice : Citrate de Sodium ou Chlorure de Potassium (KCl), âge des embryons ou larves) afin de pouvoir étudier l'aneuploïdie aux stades embryonnaire et larvaire chez *Crassostrea gigas*.

II/ Matériels et méthodes :

Des fécondations ont été réalisées à partir d'animaux matures de l'écloserie afin d'obtenir des embryons ou des larves. Les gonades de plusieurs individus mâles et femelles ayant la meilleure activité reproductrice ont été scarifiées afin d'obtenir un pool de gamètes. Pour une fécondation optimale, le ratio ovocytes / spermatozoïdes est de 1/100. Les fécondations ont eu lieu dans des béciers de 500 mL avec de l'eau de mer filtrée et le développement embryonnaire ou larvaire s'est poursuivi dans des jarres de 1 L ou 5 L respectivement. Lorsque les embryons ou les larves ont atteints l'âge souhaité pour le test, une solution de colchicine à 0,005% a été ajoutée car elle permet le blocage des chromosomes en métaphase. Le temps d'action de cet alcaloïde a varié selon les différents protocoles testés.

Ensuite les embryons ou les larves ont été récupérés par filtration. Un filtre de 25 µm a été utilisé pour les premiers protocoles testés. Cependant une perte d'embryons ou de larves a été remarquée au fil des tests et un filtre de 10 µm a été utilisé pour les derniers protocoles. Ces embryons ou larves ont été placés ensuite dans des tubes de 15 mL et une centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes a été réalisée. Cette étape qui permet de concentrer les individus dans le culot a été répétée entre chaque étape du protocole qui suit. Puis les embryons ou larves ont subi un choc hypotonique (turgescence des cellules) qui permet un meilleur étalement des chromosomes. Il a été réalisé avec une solution de citrate de sodium à 0,9% ou une solution de chlorure de potassium (KCl) à 0,075 M pour les derniers protocoles. Son temps d'action a été variable au fil des protocoles testés. Cette solution a été remplacée par une solution fixatrice d'éthanol absolu/acide acétique glacial (3:1) avec trois changements de 10 minutes. Puis celle-ci de même a été remplacée par une solution d'eau acidifiée (acide acétique à 50% dans de l'eau distillée) qui réalise un choc osmotique et permet ainsi la libération des noyaux interphasiques. La suspension cellulaire a été étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. Le liquide a ensuite été aspiré et la lame séchée à l'air libre. Enfin une coloration de l'ADN avec une solution de Giemsa (4%, pH=6,8) pendant 10 minutes a été nécessaire pour observer les chromosomes au microscope optique et ainsi estimer l'aneuploïdie des embryons ou larves.

III/ Résultats / Discussion :

Le tableau suivant récapitule les paramètres des tests qui ont été effectués pour améliorer le protocole expérimental :

N° du test	Embryons/larves	Temps de colchicine à 0,005%	Temps de citrate ou KCl	Photos
1	Embryons de 4 h	30 min ou 1 h	20 ou 30 min, Citrate	1
2	Larves D (de 35 h)	1h30 ou 2h30	20 ou 30 min, Citrate	2
3	Larves trochophores (de 23 h)	2h30	40 min, Citrate	3
4	Embryons de 5h30	30 min (+ 45 min*)	15 min, KCl	4
5	Larves trochophores (de 23 h)	2h30 (+ 55 min*)	40 min, KCl	5

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des tests effectués afin d'optimiser le protocole expérimental pour l'étude de l'aneuploïdie aux stades précoces de *C. gigas*.

*Comme une perte d'embryons ou de larves avait été observée lors des tests précédents, un filtre de 10 µm a été utilisé pour ces deux derniers tests. Le temps de colchicine entre parenthèse correspond au temps qui a été mis pour la filtration ; temps durant lequel les embryons ou les larves étaient toujours exposés à la colchicine.

Lors du 1^{er} test, aucune métaphase n'a été observée sur les lames microscopiques, ceci quelque soit le traitement. Tous les noyaux étaient intacts et les chromosomes n'étaient pas distinguables (photo 1).

Le 2nd test a été entrepris sur des larves D. Différentes expériences ont été menées en parallèle. Le temps de colchicine a été augmenté par rapport au 1^{er} test alors que le temps du choc hypotonique est resté le même. Un ou plusieurs broyages ont par contre été réalisés après les différentes étapes du protocole (après le choc hypotonique, le 1^{er} bain de fixateur ou le choc osmotique) car les larves D présentaient une coquille qui pouvait nuire à l'efficacité des traitements. Très peu de métaphases ont pu être observées (photo 2). Il semblerait que le temps de colchicine le plus approprié soit de 2h30 car les chromosomes présentaient pour ce traitement une plus grande taille des bras. Ce temps de colchicine a été conservé pour les tests suivants portant sur les larves. Par contre, les quelques métaphases observées présentaient des

chromosomes trop enchevêtrés les uns sur les autres, ce qui les rendaient non-comptables. L'écartement n'étant pas suffisant, il a donc été décidé d'augmenter le temps de citrate pour les tests à venir étant donné que ce traitement doit provoquer une turgescence des cellules. Il semblerait que le broyage soit le plus efficace après le choc osmotique. Cependant une très grande majorité des larves présentaient encore des coquilles intactes atténuant très certainement l'efficacité des différents traitements et expliquant ainsi le faible nombre de métaphases obtenues. D'autres tests (non décrits ici) ont été entrepris par la suite pour améliorer ce broyage (utilisation d'un tube à piston ou d'un tube Potter lors du broyage). Ceux-ci n'ayant pas donné de résultats concrets et le broyage présentant le risque de détruire le matériel génétique, ce qui est bien évidemment préjudiciable pour une telle étude ; le troisième test a donc été effectué sur des larves trochophores où la coquille n'est pas encore formée.

Pour ce test et ceux qui ont suivi, les larves (ou embryons) ont été filtrées sur un tamis de 10 µm après l'exposition à la colchicine car il avait été observé une perte de matériel lors des tests précédents. De plus, pour contrer cette perte, le nombre d'ovocytes pour la fécondation a été augmenté pour ce test et les suivants (2 millions de larves ou embryons contre 300000 pour les premiers tests). De ce fait, les lames ont présenté une plus grande quantité de métaphases. Cependant l'écartement des chromosomes n'était toujours pas suffisant pour permettre un comptage (photo 3).

Une solution de chlorure de potassium (KCl) a donc été utilisée pour les derniers tests en remplacement du citrate. Le 1^{er} test réalisé sur les embryons n'ayant donné aucun résultat, il a été décidé de suivre intégralement le protocole mis en place par Guo et Allen (1997). Ce 4^{ème} test a donc été effectué sur des embryons de 5h30 qui ont été exposés à la colchicine durant 30 minutes (+ 45 minutes dues au temps de filtration). Le choc hypotonique a été effectué avec une solution de KCl à 0,075 M pendant 15 minutes (9 parts pour une part d'embryons). La fixation a été réalisée avec une solution d'acide acétique/méthanol. Pour ce test, des chromosomes ont été observés mais ceux-ci étaient largement dispersés et non regroupés en métaphase (photo 4). Dans leurs études, Guo et Allen ont réalisé ce protocole pour une analyse FISH (Hybridation In-Situ par Fluorescence) où une individualisation des chromosomes n'est pas forcément nécessaire. Ce résultat ne convient donc pas pour des études d'aneuploïdie.

Le 5^{ème} test a donc été réalisé une nouvelle fois sur des larves trochophores qui ont été exposées à la colchicine durant 3h25 (dont 55 minutes durant la filtration). Le temps d'action du KCl a été de 40 minutes. De nombreuses métaphases ont été observées dont certaines comptables (photo 5). Au maximum 8 métaphases comptables pourraient être obtenues par lame. Or, un nombre minimal de 30 métaphases par individu est requis pour les études statistiques de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981). Il aurait donc fallu au moins quatre lames pour une telle étude. Pour chaque test, deux lames étaient réalisées. Il aurait donc fallu le double de larves soit 4 millions pour parvenir à compter les 30 métaphases requises.

IV/ Conclusion :

Les différents tests effectués n'ont pas permis de mettre en place un protocole expérimental afin d'étudier l'aneuploïdie aux stades précoces chez *Crassostrea gigas*. Des métaphases ont été observées mais peu d'entre elles étaient comptables. Pour l'étude de l'aneuploïdie au stade embryonnaire ou au stade larvaire de nombreux individus sont nécessaires. Ces derniers n'étant pas forcément au même stade de développement puisque les fécondations ne se déroulent pas au même moment, ceci pourrait expliquer le faible nombre de métaphases comptables. Cependant cette étude a montré de meilleurs résultats sur des

larves trochophores que sur des larves D ou des embryons. Par manque de temps d'autres tests n'ont pu être réalisés mais il serait intéressant de poursuivre nos recherches sur ces larves trochophores. Bien que le protocole ne soit pas optimal pour une étude de l'aneuploïdie, une tentative a été effectuée sur la descendance des huîtres adultes contaminées au diuron (Partie 1) au stade larvaire âgée de 48 heures. Le nombre de larves obtenues était de 2 millions mais aucun résultat exploitable n'a pu être obtenu du fait que ces larves présentaient des coquilles et que le broyage de celles-ci s'est avérée une nouvelle fois inefficace.

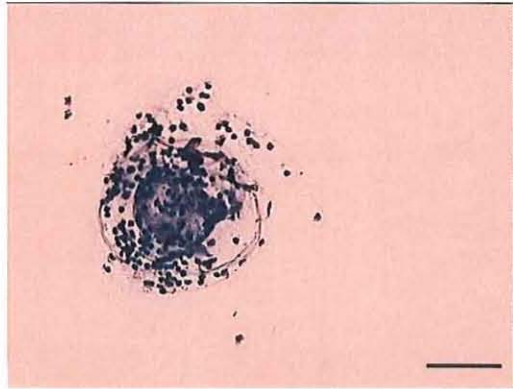


Photo 1 : Embryons de 4 heures de *C. gigas*.
Aucune métaphase observée.
Echelle = 150 μ m.

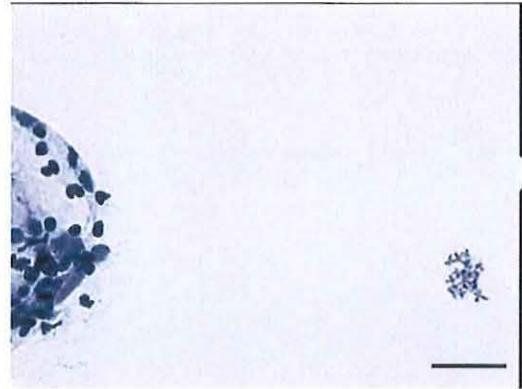


Photo 2 : Métaphase de larves D (35 heures) de *C. gigas*.
Temps Colchicine = 2h30 ; Temps Citrate = 30 min.
Echelle = 50 μ m.

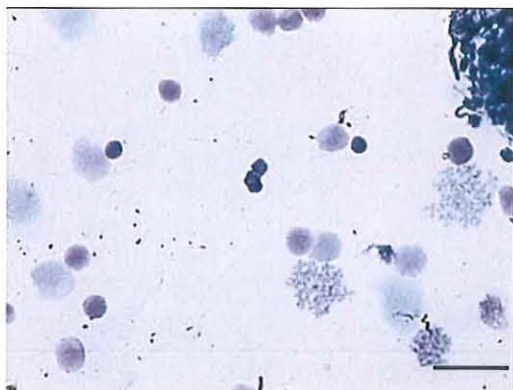


Photo 3 : Métaphases de larves trochophores de *C. gigas*.
Temps Colchicine = 2h30 ; Temps Citrate = 40 min.
Echelle = 25 μ m.

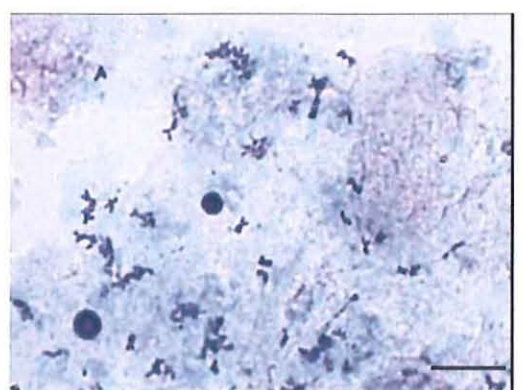


Photo 4 : Chromosomes d'embryons de 5h30 de *C. gigas* non regroupés en métaphases.
Echelle = 25 μ m.

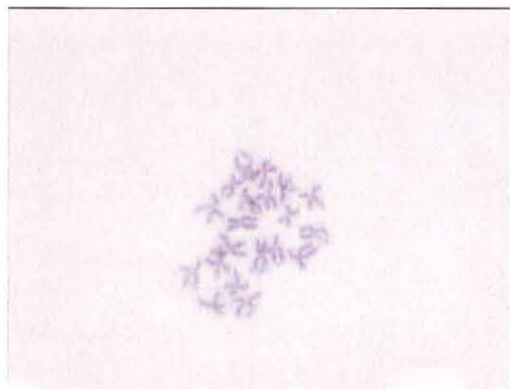


Photo 5 : Métaphase à 20 chromosomes de larves trochophores de *C. gigas*.
Temps de Colchicine = 2h30 ; Temps de KCl = 40 min.
Echelle = 10 μ m.

Partie 4 : Comparaison de deux techniques (cytométrie en flux et analyse cytogénétique) pour l'étude de l'aneuploïdie chez l'huître creuse

I/ Présentation :

Dans le cadre d'un programme de biovigilance mené par l'équipe de génétique de la station Ifremer de La Tremblade, des analyses par cytométrie en flux ont été entreprises afin de détecter la présence éventuelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas* à l'état triploïde dans les populations naturelles du bassin d'Arcachon ; ceci pouvant faire suite à une éventuelle "contamination génétique" entre des populations naturelles et d'élevage. En effet ces huîtres, qui présentent des cellules à 30 chromosomes (3n), résultent de la fusion des gamètes d'huîtres tétraploïdes (4n) et d'huîtres diploïdes (2n). Cette étude menée depuis 2001 n'a pas révélé la présence d'huîtres polyploïdes (triploïdes ou tétraploïdes) sur les sites d'échantillonnage du bassin d'Arcachon mais semblerait montrer des variabilités dans la taille du génome des huîtres creuses diploïdes.

La cytométrie en flux permet de mesurer la ploïdie des individus en analysant un très grand nombre de cellules somatiques et en déterminant un ratio qui correspond à la position moyenne du ou des pic(s) de fluorescence émise par les cellules somatiques des individus divisé(s) par la position moyenne du pic de fluorescence émise par un témoin interne. Un exemple de ces pics de fluorescence pour un individu est donné en annexe 7. Pour les huîtres diploïdes, triploïdes et tétraploïdes, ce ratio standard de taille du génome est respectivement de 0,26, 0,36 et 0,50 (Cornette et Sharbel, données non-publiées). Dans cette étude, les valeurs des ratios de tous les individus diploïdes échantillonnés ont varié de 0,18 à 0,28. Ces valeurs suivant plusieurs distributions indiqueraient l'existence possible de plusieurs classes d'individus diploïdes (graphique 1, annexe 8). Les individus présentant la plus grande taille de génome (donc une valeur de ratio plus élevée) pourraient être rassemblés dans une classe et considérés comme "diploïdes normaux". Les autres individus présentant une taille de génome plus petite (donc une valeur de ratio plus faible) pourraient être rassemblés dans plusieurs classes : ceux considérés comme aneuploïdes (avec la perte d'un ou de plusieurs chromosomes entiers) et ceux où il aurait pu y avoir une fragmentation de leurs chromosomes. Pour la majorité des sites, les distributions se rangeaient autour d'une valeur de ratio de 0,26. Par contre, d'autres sites comme Arams présentaient des individus avec un ratio significativement plus faible (aux alentours de 0,20). Les valeurs de ratio de ces individus suivant un "rangement Box-Plot" ont permis de les considérer comme outliers (graphique 2, annexe 8). Le test de normalité de Kolmogorov-Smirnov a rejeté l'hypothèse que les distributions étaient normales pour les sites présentant le plus grand nombre d'outliers ($P = 0,000$). Elles seraient alors considérées comme bimodales. Cette variation de la taille du génome (une réduction en l'occurrence) pourrait s'expliquer soit par une fragmentation des chromosomes soit par la perte d'un chromosome entier, ceci correspondant donc à l'aneuploïdie. Leitão *et al.* (2001 c) a démontré chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* que la perte concernait principalement les chromosomes de plus grande taille (de la paire 1), ce qui serait concordant avec ces résultats.

L'aneuploïdie n'a encore jamais été mise en évidence par cytométrie en flux chez l'huître creuse alors que c'est le cas pour d'autres organismes comme la grenouille verte *Rana clamitans* (Lowcock *et al.*, 1997). En effet la résolution du cytomètre en flux étant environ de 5%, l'aneuploïdie est difficile à mettre en évidence chez *Crassostrea gigas* si elle touche les chromosomes de plus petites tailles mais ce pourrait être possible pour les plus grands chromosomes. Etant donné les résultats obtenus dans la population Arcachonnaise, il était alors intéressant de mener une étude afin de comparer les résultats donnés par la cytométrie en

flux et par l'analyse cytogénétique et de voir si une corrélation existait afin d'améliorer les études d'aneuploïdie.

II/ Matériels et méthodes :

1) Echantillonnage des huîtres

Lors de cette étude, le site Arams présentait le plus grand nombre d'individus avec une valeur de ratio faible (outliers). La majorité d'entre eux avait été échantillonnée en 2001 (graphique 3, annexe 8). Un nouveau prélèvement a donc eu lieu sur ce site du bassin d'Arcachon le 24 janvier 2004. Au total, 112 huîtres creuses d'une taille similaire et de l'ordre de 10 cm (3 ans à peu près) ont été échantillonnées. Elles ont été nettoyées, marquées avec une étiquette sur la valve supérieure, anesthésiées dans un mélange de 3 litres d'eau douce, 2 litres d'eau de mer et 250 g de chlorure de magnésium en solution. L'anesthésie nocturne donne un meilleur résultat en terme de nombre d'individus ouverts. Ensuite, la biopsie consiste à prélever entre les valves ouvertes des huîtres anesthésiées des fragments de branchies d'une taille de 1 mm² à l'aide d'une pince fine. Ces morceaux de branchies après un protocole d'extraction et de coloration de l'ADN ont été placés dans des tubes à analyse qui ont ensuite été introduits dans le cytomètre en flux. L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée par les techniciens du laboratoire de génétique. Dans ce lot, 23 huîtres ont subi par la suite le protocole décrit précédemment pour l'étude de l'aneuploïdie. Ces 23 huîtres ont été choisies en fonction du ratio de ploïdie que leurs cellules somatiques avaient présenté en cytométrie en flux.

2) Principe de la cytométrie en flux

Afin d'analyser la ploïdie des individus par cytométrie en flux, une coloration de l'ADN a été nécessaire. Celle-ci s'est faite avec du 4',6-Diaminido-2-phénylindol (ou DAPI) qui est un colorant spécifique de l'ADN. Ce fluorochrome est caractérisé par 2 spectres :

- Un spectre d'absorption (de la lumière incidente),
- Un spectre d'émission de fluorescence.

Eclairé d'une lumière UV (dont la longueur d'onde maximale devait être de 372 nm), le DAPI a émis une fluorescence bleue d'une longueur d'onde maximale de 456 nm. Le DAPI a permis de quantifier l'ADN car il s'est fixé sur les liaisons hydrogènes reliant les bases nucléotidiques entre elles. De ce fait, la fluorescence émise a été proportionnelle à la quantité d'ADN présente.

Les échantillons ont été préparés selon la méthode de Matzk *et al.* (2000). Au tissu a été ajouté 1 mL de tampon d'extraction d'ADN coloré au DAPI ainsi qu'un témoin interne. Le tout a été appelé tampon DAPI. Le tampon d'extraction a permis 1) de casser la membrane plasmique des cellules avec du chlorure de sodium, 2) de tamponner le milieu réactionnel avec du trizma base, 3) de stabiliser la chaîne d'ADN avec du chlorure de magnésium hexahydraté qui a interagi avec les charges négatives de celle-ci limitant ainsi les forces de répulsion entre les brins, 4) d'ajuster le pH à 7 avec de l'acide chlorhydrique et 5) de recouvrir les composants de la membrane cellulaire avec un surfactant non ionique (Triton X-100). Le témoin interne, indispensable pour étalonner le système, comporte une fluorescence connue de référence (microbilles fluorescent à 300 nm). L'extraction de l'ADN a pu être accélérée en effectuant des va-et-vient à l'aide d'une micropipette. La suspension obtenue a été filtrée sur une maille de 100 µm au-dessus d'un tube à analyse. Afin de le rincer, 1 mL de tampon DAPI

a été ajouté sur le filtre. Le tube à analyse a contenu au final 2 mL de tampon DAPI et les cellules du fragment de branchie.

Avant l'analyse au cytomètre, les échantillons ont été incubés à 4°C, à l'obscurité durant une demi-heure. Ceci a permis au DAPI de se fixer sur l'ADN.

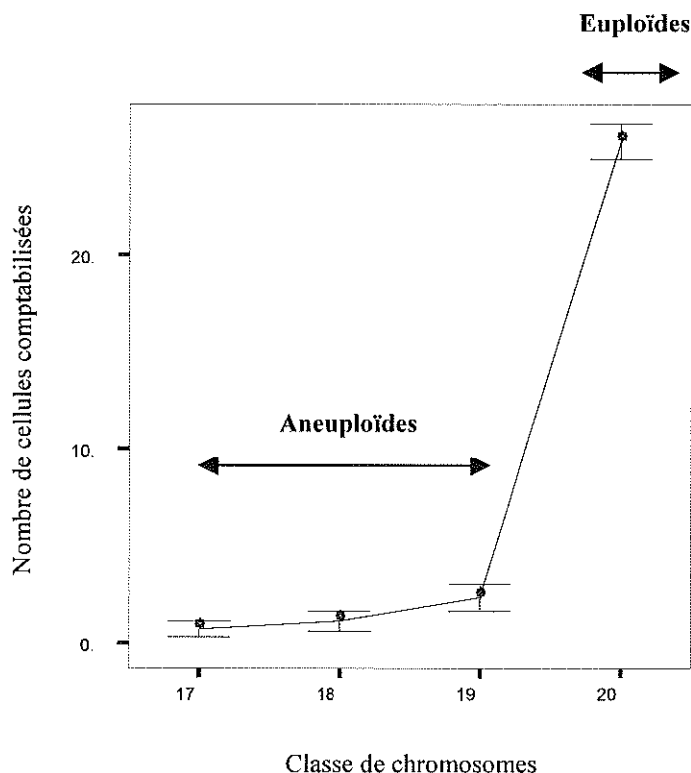
L'étalonnage du cytomètre a été réalisé au début à l'aide d'un témoin interne de microbilles. Le logiciel utilisé pour mettre en évidence les pics de ploïdie a été FloMax. Chaque échantillon a été analysé individuellement et comparé au témoin interne. Pour chaque échantillon, 2000 cellules ont été analysées.

III/ Résultats :

Les données brutes de l'analyse cytogénétique et de l'analyse par cytométrie en flux sont regroupées sous forme d'un tableau récapitulatif en annexe 9.

1) Résultats de l'analyse cytogénétique

Les résultats obtenus à partir de l'analyse microscopique ont permis d'établir le graphique 1 représentant le nombre de cellules aneuploïdes (à 19, 18 ou 17 chromosomes) et de cellules euploïdes (à 20 chromosomes) comptabilisées pour tous les individus (N = 23) avec un intervalle de confiance de 95%. L'axe des abscisses intitulé "Classe de chromosomes" indique s'il s'agit de métaphases à 20, 19, 18 ou 17 chromosomes.



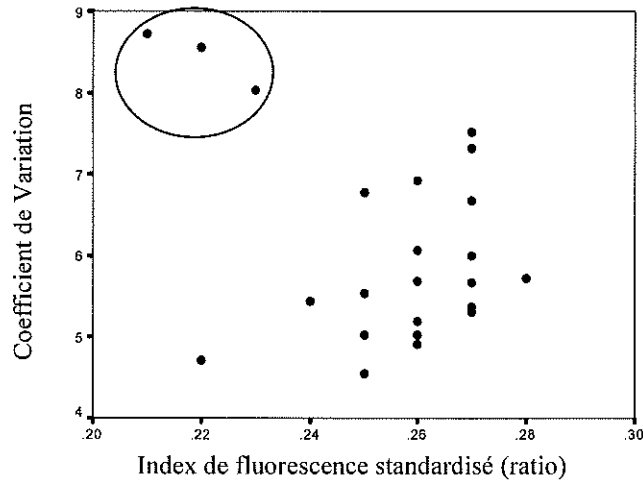
Graphique 1 : Représentation du nombre comptabilisé de chromosomes pour tous les individus en fonction de leurs classes (aneuploïdes ou euploïdes).

Tous les individus analysés ont présenté un nombre de cellules à 20 chromosomes supérieur à celui de cellules aneuploïdes. La variabilité de ce nombre, représentée par les

intervalles, est cependant plus grande pour les cellules "normales" et elle décroît avec le degré d'aneuploïdie.

2) Résultats de l'analyse par cytométrie en flux

Les résultats obtenus à partir du cytomètre en flux ont permis d'établir le graphique 2 qui compare le coefficient de variation au ratio pour chacun des individus analysés.

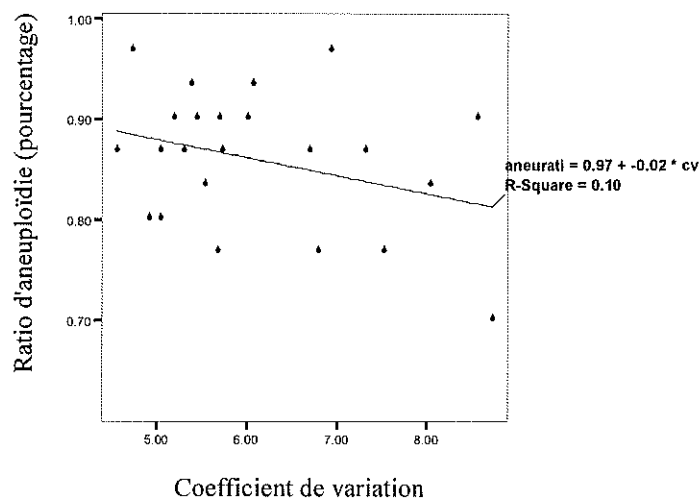


Graphique 2: Comparaison du coefficient de variation et du ratio pour chacun des individus (N = 23).

Trois individus (entourés) ont semblé se détacher des autres en présentant un fort coefficient de variation (entre 8 et 9) pour une faible valeur de ratio (entre 0,21 et 0,23).

3) Résultats comparatifs des analyses par microscopie et par cytométrie en flux

Le graphique 3 représente le pourcentage de cellules à 20 chromosomes (donné par l'analyse microscopique) en fonction du coefficient de variation (donné par le cytomètre en flux) pour chacun des individus analysés.



Graphique 3 : Pourcentage de cellules normales (20 chromosomes) en fonction du coefficient de variation.

D'après ce graphique, le pourcentage de cellules normales aurait tendance à décroître (ou bien le pourcentage de cellules aneuploïdes aurait tendance à augmenter) avec le coefficient de variation. Une droite de régression a été tracée et a donné une valeur du coefficient de corrélation R^2 égale à 0,1.

IV/ Discussion :

L'huître creuse présente généralement dans ses cellules à l'état diploïde un nombre de chromosomes égal à 20 (Ahmed et Sparks, 1967). L'aneuploïdie, qui existe naturellement chez ce bivalve marin, se traduit essentiellement par la perte de chromosomes mais celui-ci peut la tolérer et survivre avec un nombre anormal de chromosomes (Thiriou-Quiévreux, 1986).

Il semblerait donc, d'après le premier graphique, qu'il existe un même mécanisme chez tous les individus qui contrôle le taux d'aneuploïdie des cellules. Mais l'hypothèse, qu'au-delà d'un certain seuil les cellules aneuploïdes entraînent la mort des individus car la perte de l'information génétique est trop importante, n'est cependant pas à exclure. Le résultat obtenu s'en trouve donc relativisé et doit être interprété avec précaution.

La cytométrie en flux permet de mesurer la ploïdie d'un individu en traçant un pic de fluorescence caractérisé à la fois par une valeur de ratio correspondant à la taille du génome de l'individu étudié et par une valeur de coefficient de variation correspondant à la base de ce pic de fluorescence. Ce coefficient de variation renseigne sur l'état des cellules aneuploïdes de l'individu. Si l'aneuploïdie chez l'huître creuse se traduit essentiellement par une perte de chromosomes, les individus aneuploïdes présenteraient alors un pic de fluorescence avec une valeur de ratio faible (car la taille du génome est plus petite) mais avec une valeur de coefficient de variation élevée (la base du pic est plus large). D'après le second graphique, aucune relation n'existerait entre le coefficient de variation et le ratio donnés par le pic, car la distribution semble aléatoire. Cependant trois individus (entourés) semblent se détacher du reste car ils présenteraient une taille de génome plus petite et un pourcentage de cellules aneuploïdes plus important (la valeur du coefficient de variation est comprise entre 8 et 9). D'après ces caractéristiques, ces trois individus pourraient être considérés comme "aneuploïdes mosaïques" (ils présenteraient à la fois des cellules à 20 chromosomes et des cellules aneuploïdes car le coefficient de variation est élevé) mais pas comme "aneuploïdes stricts" (où 100% de leurs cellules seraient aneuploïdes et donc le coefficient de variation serait faible). Ces résultats sont également à relativiser car l'étude est tout d'abord effectuée sur un très faible effectif ($N = 23$). Il faudrait effectivement beaucoup plus de données pour une telle étude. De même, la limite de résolution du cytomètre en flux est de 5 à 10 %. Cette technique ne pourrait révéler alors que les individus présentant un fort degré d'aneuploïdie.

Il n'y aurait pas de corrélation entre les résultats des deux techniques d'analyse même si il semblerait y avoir une augmentation du taux d'aneuploïdie avec le coefficient de variation. La valeur du coefficient de corrélation fournie par la droite de régression est inférieure à 0,8. Les résultats ne peuvent pas être considérés comme exacts à cause du faible effectif mais ils ont montré néanmoins une tendance. Cette étude pourrait être améliorée en augmentant l'effectif mais cela nécessiterait de consacrer un temps énorme à l'analyse cytogénétique. Si apparemment il est difficile de mettre en évidence l'aneuploïdie par cytométrie en flux, cette technique se révèle fort utile pour détecter rapidement sur des populations naturelles des dommages génétiques et peut apporter de ce fait une aide très précieuse aux études d'aneuploïdie par analyse cytogénétique.

Conclusion :

Cette étude a permis de démontrer un caractère potentiellement génotoxique du diuron sur les huîtres adultes *Crassostrea gigas* même si aucune relation dose - dépendance n'a été mise en évidence. Par contre cet herbicide n'aurait pas d'effet sur la mortalité de celles-ci, sur leur taux d'éclosion et sur la croissance des larves de la seconde génération. Cette étude pourrait être poursuivie par l'analyse de l'aneuploïdie sur la descendance afin de savoir si l'impact du diuron est persistant d'une génération à l'autre. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de cet herbicide sur du naissain ou des larves directement exposés pour savoir si la sensibilité face à celui-ci est différente selon le stade de développement de l'huître. Au cours de cette expérimentation, plusieurs paramètres sur les hémocytes de ces huîtres contaminées ont été étudiés en parallèle par cytométrie en flux. Il semblerait que le diuron, quelque soit la concentration appliquée (300 ng/L ou 3 µg/L) ait un impact sur la mortalité cellulaire ($P < 0,001$) mais également sur la capacité de phagocytose ($P < 0,01$) (Gagnaire B., communication personnelle). D'après ces premiers résultats obtenus, les études sur la génotoxicité et l'immunotoxicité du diuron sur *Crassostrea gigas* seraient donc à poursuivre.

Des études ont également été menées sur l'aneuploïdie des huîtres du bassin de Marennes-Oléron et du bassin d'Arcachon. Il semblerait que les fluctuations des taux d'aneuploïdie soient à mettre en relation entre autres avec des conditions environnementales différentes. Cette étude pourrait tout d'abord être améliorée en effectuant des analyses sur plusieurs années mais également en analysant les quantités de pesticides qui arrivent sur le littoral, leur disposition aux huîtres... .

Les études d'aneuploïdie sont en règle générale réalisées sur des huîtres adultes ou juvéniles car le protocole expérimental pour les stades précoces n'est pas encore opérationnel. Il semblerait selon les tests réalisés que l'étude de l'aneuploïdie sur des larves trochophores soit cependant possible car des métaphases étaient comptables mais elles étaient trop peu nombreuses pour des études statistiques de cytogénétique.

Enfin, les études de l'aneuploïdie sur les huîtres creuses *Crassostrea gigas* sont menées par analyse microscopique. Si une telle étude présente encore quelques difficultés par cytométrie en flux, cette technique reste cependant efficace pour détecter rapidement dans des populations naturelles des dommages génétiques. De ce fait elle peut apporter une aide très précieuse à l'étude de l'aneuploïdie par analyse microscopique.

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.

Amiard J. -C., Metayer C., Baud J. -P. & Ribeyre F., 1994. Influence of some ecological and biological factors on metal bioaccumulation in young oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) during their spat rearing. Wat. Res., Vol. 28, No. 1, pp. 219-231.

Bond D. J. & Chandley A. C., 1983. Aneuploidy. Oxford Univ. Press, Oxford.

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., 2003b. Impact of atrazine on aneuploidy in pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22 : 219-223.

Bouilly K., McCombie H., Leitão A. & Lapègue S., (sous presse). Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*.

Canna-Michaelidou S. & Nicolaou A. -S., 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox™ test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. The Science of the Total Environment 193, 27-35.

Dixon D. R., 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. Mar. Biol. Lett. 3 : 155-161.

Dixon D. R. & Wilson J. T., 2000. Genetics and marine pollution. Hydrobiologia 420 : 29-43.

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.

Guo X., Cooper K., Hershberger W. K. & Chew K. K., 1992. Genetic consequences of Blocking Polar Body I with Cytochalasin B in fertilized Eggs of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* : I. Ploidy of Resultant Embryos. Biol. Bull. 183 : 381-386.

Guo X. & Allen S. K. Jr., 1997. Fluorescence in-situ hybridization of vertebrate telomere sequence to chromosome ends of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. Journal of Shellfish Research, Vol. 16, No. 1 : 87-89.

Haynes D., Ralph P., Prange J. & Dennison B., 2000. The Impact of the Herbicide Diuron on Photosynthesis in Three Species of Tropical Seagrass. Marine Pollution Bulletin. Vol. 41, Nos. 7-12, pp. 288-293.

Kobayashi N. & Okamura H., 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Marine Pollution Bulletin 44, 748-751.

Komaru A. & Wada K. T., 1994. Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese oysters (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids. Aquaculture 120 : 61-70.

Lapègue S., Thiriôt-Quévieux C., McCombie H., Heurtebise S., Boudry P., Robert S., Soletchnik P., Gouletquer P. & Gérard A., 1999. Etude du niveau d'aneuploïdie dans les populations de zone de captage du bassin de Marennes-Oléron. Contrat Région Poitou-Charentes 1999. Convention 99 RPC-A-201 "Génétique". 39pp.

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

Leitão A., Boudry P., McCombie H., Gérard A., Thiriot-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.

Li Q., Osada M., Kashihara M., Hirohashi K & Kijima A., 2000. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological features of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Science* 666 : 39-48.

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

Lowcock L. A., Sharbel T. F., Bonin J., Ouellet M., Rodrigue J. & DesGranges J-L., 1997. Flow cytometric assay for in-vivo genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicology* 00 : 1-15.

Martínez-Exposito M. J., Pasantes J. J. & Méndez J., 1994. NOR activity in larval and juvenils mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175 : 155-165.

Martínez-Lage A., Gonzalez-Tizon A. & Méndez J., 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72 : 242-249.

Matzk, F., A. Meister et I. Schubert, 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal* 21 (1): 97-108.

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, No. 3, pp. 706-711.

Okamura H., Watanabe T., Aoyama I. & Hasobe M., 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46, 945-951.

Rodríguez-Romero F., Gasca-Montes de Oca M. & Rosa-Vélez, J., 1991. Un metodo citogenetico para la obtencion de cromosomas para estudios de bandeado y de morfologia fina de los cariotipos de moluscos bivalvos de la familia Ostreidae. *Ciencias Marinas*, Vol. 17, No. 4 : 1-10.

Scribe P., Chouakri S., Dupas S. & Dubernet J. F., 1998. Occurrence and transport of phenylurea and triazines herbicides from the Charente river and the fluvio-estuarine zone of Marennes-Oleron to the coastal seawater. *International symposium on Marine Pollution*, Monaco, October 5-9 1998.

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.

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.

Steinert S. A., 1999. DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers*, Vol. 4, No. 6 : 492-496.

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

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

Thiriot-Quiévreux C., Noël T., Bougrier S. & Dallot S., 1988. Relationships Between Aneuploidy and Growth Rate in Pair Matings of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 75 : 89-96.

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

Verma R. S., 1990. The Genome. VCH Publishers incorporated.

Vig B. K. & Sandberg A. A., 1987. Aneuploidy : Part A. Incidence and Etiology. Alan R. Liss, New York.

Wada K. T., Scarpa J. & Allen S. K. Jr., 1990. Karyotype of the dwarf surfclam *Mulinia lateralis* (Say, 1822) (Mactridae, Bivalvia). Journal of Shellfish Research, Vol. 9, No. 2 : 279-281.

Wang Z., Guo X., Allen S. K. Jr. & Wang R., 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. Aquaculture 173 : 347-357.

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.

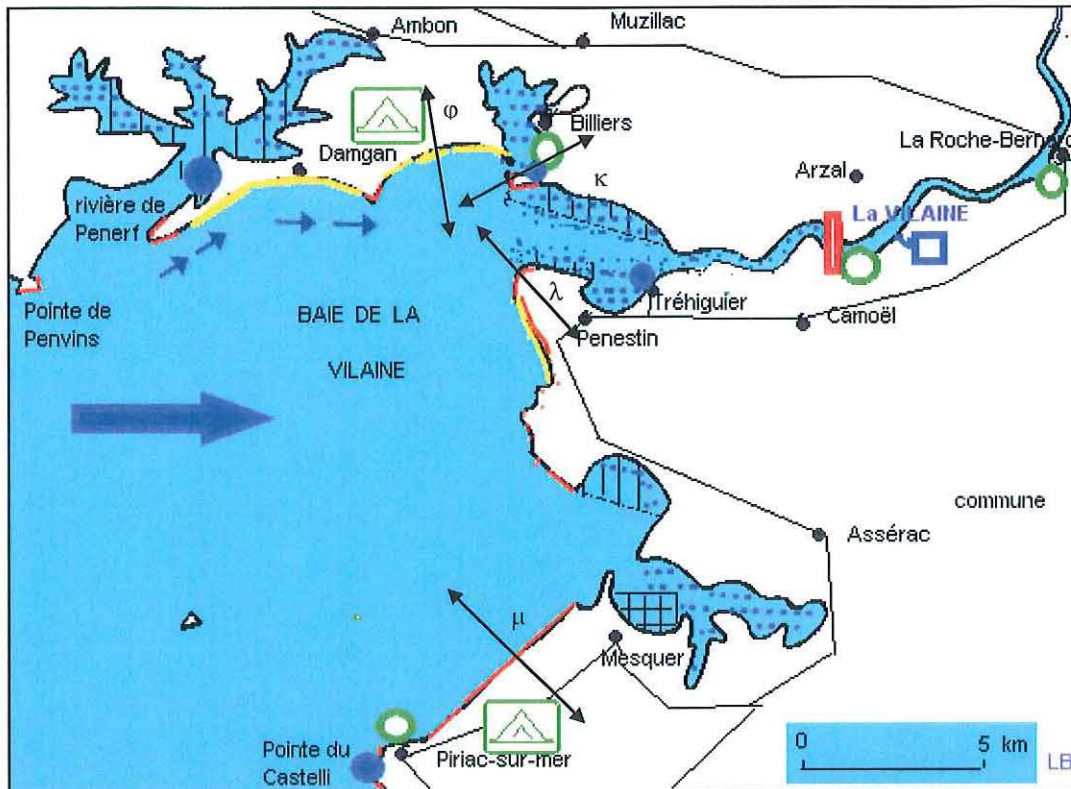
Wilkinson L., 1990. SYSTAT: The System for statistics. SYSTAT, Inc., Evanston, IL, 676 pp.

Xu Z., Guo X., Gaffney P.M. & Pierce J.C., 2001. Chromosomal Location of the Major Ribosomal RNA Genes in *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. The Veliger 44 (1) : 79-83.

Yang H., Zhang F. & Guo X., 2000. Triploid and Tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, Produced by Inhibiting Polar Body I. Mar. Biotechnol. 2 : 466-475.

Zouros E., Thiriou-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. Genet. Res., Camb. 68 : 109-116.

ANNEXE 1 : Carte de l'estuaire et de la baie de Vilaine.



Carte 1. Carte de l'estuaire et de la baie de la Vilaine et emplacement des transects proposés. φ : Pointe de Kervoyal, κ : Pointe de Pen Lan, λ : Pointe du Halgen, μ : Port aux Loups. (source du fond de carte : http://www.ac-rennes.fr/pedagogie/hist_geo/ResPeda/littoraux/images/cartes/cartevilaineap1970.htm).

ANNEXE 2 : Données brutes sur l'aneuploïdie des huîtres adultes contaminées au diuron.

Bac Concentration	N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		
		2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne
BAC 1 (0 ng/L)	1	28	1	1	0	2	6,66	
	2	29	0	0	1	1	3,33	
	3	28	0	0	2	2	6,66	
	4	29	0	0	1	1	3,33	
	5	28	2	0	0	2	6,66	
	6	27	0	2	1	3	10	
	7	26	2	2	0	4	13,33	
	8	27	1	1	1	3	10	
	9	28	2	0	0	2	6,66	
	10	28	1	0	1	2	6,66	7,33
BAC 2 (0 ng/L)	1	28	0	1	1	2	6,66	
	2	26	3	0	1	4	13,33	
	3	28	0	2	0	2	6,66	
	4	26	2	2	0	4	13,33	
	5	28	1	1	0	2	6,66	
	6	28	1	1	0	2	6,66	
	7	27	2	0	1	3	10	
	8	28	0	1	1	2	6,66	
	9	28	2	0	0	2	6,66	
	10	23	1	3	3	7	23,33	10
BAC 3 (300 ng/L)	1	25	1	2	2	5	16,66	
	2	26	2	0	2	4	13,33	
	3	25	4	1	0	5	16,66	
	4	27	2	1	0	3	10	
	5	24	2	2	2	6	20	
	6	23	2	3	2	7	23,33	
	7	27	1	0	2	3	10	
	8	23	2	1	4	7	23,33	
	9	25	1	3	1	5	16,66	
	10	25	2	1	2	5	16,66	16,66
BAC 4 (300 ng/L)	1	29	1	0	0	1	3,33	
	2	25	2	0	3	5	16,66	
	3	25	2	2	1	5	16,66	
	4	25	2	2	1	5	16,66	
	5	23	1	3	3	7	23,33	
	6	24	0	2	4	6	20	
	7	25	2	2	1	5	16,66	
	8	24	3	0	3	6	20	
	9	27	0	2	1	3	10	
	10	24	4	2	0	6	20	16,33

BAC 5 (3 µg/L)	1	25	4	1	0	5	16,66	
	2	24	3	2	1	6	20	
	3	25	5	0	0	5	16,66	
	4	28	2	0	0	2	6,66	
	5	24	5	1	0	6	20	
	6	26	3	1	0	4	13,33	
	7	25	3	1	1	5	16,66	
	8	26	1	1	2	4	13,33	
	9	25	1	0	4	5	16,66	
	10	25	3	0	2	5	16,66	15,66
BAC 6 (3 µg/L)	1	27	2	0	1	3	10	
	2	25	2	2	1	5	16,66	
	3	24	1	4	1	6	20	
	4	26	2	1	1	4	13,33	
	5	23	2	4	1	7	23,33	
	6	28	1	1	0	2	6,66	
	7	29	1	0	0	1	3,33	
	8	23	2	5	0	7	23,33	
	9	26	3	0	1	4	13,33	
	10	25	2	3	0	5	16,66	14,66

ANNEXE 3 : Données brutes sur la croissance des larves issues de la reproductions des huîtres adultes contaminées au diuron.

Lot	J2	J7	J9	J12	J14	J16	J19	J21	J23
1A	81,27	116,73	138,92	184,45	218,77	249,34	296,5	276,7	292,6
1B	84,67	107,77	127,61	165,84	211,15	247,93	288,5	299,7	301,8
2A	80,04	115,2	134,1	179,15	211,43	240,7	272,7	292,9	290,8
2B	85,6	111,65	126,18	162,9	198,26	237,75	289,9	306,7	294
3A	79,01	109,63	129,96	162,8	218,09	265,45	285,3	289,1	NC
3B	84,66	116,07	134,86	171,16	219,69	247,57	285,9	300	301,3
4A	80,09	113,3	130,24	158,96	203,75	249,3	290,2	297,8	312,8
4B	81,87	111,89	137,28	164,14	202,45	257,13	298,7	303,5	314
5A	83,89	113,5	140,66	168,34	209,84	266,85	293,8	302	NC
5B	86,1	111,3	124,68	173,06	204,42	279,15	321,9	301,2	NC
6A	83,7	117,6	134,54	173,78	212,6	251,06	301,6	301,5	304,8
6B	82,09	122,4	135,09	181,98	221,45	265,1	306,6	314,9	NC

Moyenne

Lot	J2	J7	J9	J12	J14	J16	J19	J21	J23
0 ng/L	82,895	112,84	131,703	173,09	209,9	243,93	286,9	294	294,8
300 ng/L	81,408	112,72	133,085	164,27	211	254,86	290,03	297,6	309,37
3 µg/L	83,945	116,2	133,743	174,29	212,08	265,54	305,98	304,9	304,8

ANNEXE 4 : Données brutes sur l'aneuploïdie des huîtres de la vasière de Brouage.

PEVS 1 : 05/03/03

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	23	3	2	2	7	23,33		1
2	20	5	2	3	10	33,33		1
3	21	3	2	4	9	30		1
4	27	2	1	0	3	10		1
5	25	1	2	2	5	16,66		1
6	26	3	1	0	4	13,33		1
7	24	2	2	2	6	20		1
8	21	4	4	1	9	30		1
9	27	2	0	1	3	10		1
10	25	3	1	1	5	16,66		1
11	23	6	1	0	7	23,33		1
12	24	3	2	1	6	20		1
13	27	1	2	0	3	10		1
14	26	2	1	1	4	13,33		1
15	23	4	2	1	7	23,33		1
16	21	4	3	2	9	30		1
17	24	5	1	0	6	20		1
18	27	1	1	1	3	10		1
19	26	2	1	1	4	13,33		1
20	26	3	1	0	4	13,33		1
21	27	2	0	1	3	10		1
22	25	1	1	3	5	16,66		1
23	22	3	4	1	8	26,66		1
24	28	2	0	0	2	6,66		1
25	23	2	1	4	7	23,33		1
26	25	2	2	1	5	16,66		1
27	20	7	2	1	10	33,33		1
28	25	2	3	0	5	16,66		1
29	27	1	2	0	3	10		1
30	23	3	2	2	7	23,33	18,77	1

PEVS 2 : 17/06/03

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	23	3	4	0	7	23,33		1
2	23	4	1	2	7	23,33		1
3	26	4	0	0	4	13,33		1
4	26	3	1	0	4	13,33		1
5	25	4	1	0	5	16,66		1

6	28	0	1	1	2	6,66		1
7	25	4	1	0	5	16,66		1
8	27	1	1	1	3	10		1
9	24	4	1	1	6	20		1
10	26	0	2	2	4	13,33		2
11	22	3	3	2	8	26,66		1
12	29	1	0	0	1	3,33		1
13	22	4	3	1	8	26,66		1
14	24	4	1	1	6	20		1
15	24	6	0	0	6	20		1
16	29	1	0	0	1	3,33		1
17	25	2	1	2	5	16,66		1
18	29	1	0	0	1	3,33		1
19	22	4	2	2	8	26,66		1
20	28	1	1	0	2	6,66		1
21	26	0	2	2	4	13,33		1
22	28	2	0	0	2	6,66		1
23	27	1	2	0	3	10		1
24	29	0	1	0	1	3,33		1
25	21	6	2	1	9	30		1
26	27	1	1	1	3	10		1
27	23	4	2	1	7	23,33		1
28	25	2	2	1	5	16,66		1
29	21	3	5	1	9	30		1
30	25	2	2	1	5	16,66	15,66	1

PEVS 3 : 30/09/03

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
2	27	3	0	0	3	10		2
3	26	2	0	2	4	13,33		2
4	27	3	0	0	3	10		1
8	27	2	1	0	3	10		2
9	29	0	1	0	1	3,33		1
12	26	2	1	1	4	13,33		4
14	26	1	1	2	4	13,33		2
15	27	2	1	0	3	10		3
17	26	1	0	3	4	13,33		2
23	27	1	1	1	3	10	10,66	2

PEVS 4 : 09/02/04

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	27	1	1	1	3	10		1
2	27	2	0	1	3	10		1
3	25	3	2	0	5	16,66		1
4	24	5	1	0	6	20		2
5	27	2	1	0	3	10		1
6	26	2	2	0	4	13,33		2
7	24	2	2	2	6	20		1
8	27	3	0	0	3	10		2
9	25	4	0	1	5	16,66		1
10	24	4	1	1	6	20		1
11	29	0	1	0	1	3,33		1
12	25	3	1	1	5	16,66		1
13	24	3	0	3	6	20		1
14	28	1	1	0	2	6,66		1
31	26	0	3	1	4	13,33		2
16	26	3	1	0	4	13,33		2
17	27	1	0	2	3	10		1
18	26	2	1	1	4	13,33		2
19	25	1	1	3	5	16,66		1
32	27	2	1	0	3	10		1
21	27	0	2	1	3	10		1
22	24	3	0	3	6	20		1
23	26	2	1	1	4	13,33		2
24	27	1	1	1	3	10		1
25	28	1	0	1	2	6,66		1
34	25	1	1	3	5	16,66		1
27	25	2	2	1	5	16,66		2
28	23	3	0	4	7	23,33		1
29	25	3	1	1	5	16,66		2
30	28	1	1	0	2	6,66	12,33	2

ANNEXE 5 : Quantification du cadmium sur les huîtres de la vasière de Brouage.

Numéro	Lot	Poids (g)	[Cd] µg/L	µg	µg/p.sec en g	moy conc (µg/g)
KA1	05-mars	0,49	61,4	0,61	1,22	1,17
KA2		0,49	60,9	0,60	1,21	
KA3		0,50	61,7	0,61	1,23	
KA4		0,49	55,3	0,55	1,10	
KA5		0,50	54	0,54	1,07	
BK1	17-juin	0,49	97,2	0,97	1,94	2,02
BK2		0,50	99,2	0,99	1,98	
BK3		0,50	93,3	0,93	1,86	
BK4		0,49	91	0,91	1,82	
BK5		0,49	124,2	1,24	2,48	
BK6	30-sept	0,50	87,7	0,87	1,75	1,89
BK7		0,50	99,4	0,99	1,98	
BK8		0,50	113	1,13	2,25	
BK9		0,50	79,9	0,79	1,59	
BK10		0,50	94,9	0,94	1,89	
BK11	09-févr	0,50	77,1	0,77	1,53	1,52
BK12		0,50	70,8	0,70	1,41	
BK13		0,50	79,9	0,79	1,59	
BK14		0,50	78,8	0,78	1,57	
BK15		0,50	74,8	0,74	1,49	

ANNEXE 6 : Données brutes sur l'aneuploïdie d'huîtres du bassin d'Arcachon.

Site : Nord de l'île aux oiseaux.

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	26	3	1	0	4	13,33		1
2	23	5	1	1	7	23,33		1
3	27	1	1	1	3	10		1
4	26	3	0	1	4	13,33		2
5	27	2	0	1	3	10		2
6	26	1	2	1	4	13,33		1
7	25	3	1	1	5	16,66		1
8	28	1	0	1	2	6,66		1
9	29	0	1	0	1	3,33		1
10	26	2	1	1	4	13,33		1
11	29	0	1	0	1	3,33		1
12	30	0	0	0	0	0		1
13	25	3	0	2	5	16,66		2
14	25	1	2	2	5	16,66	11,42	1

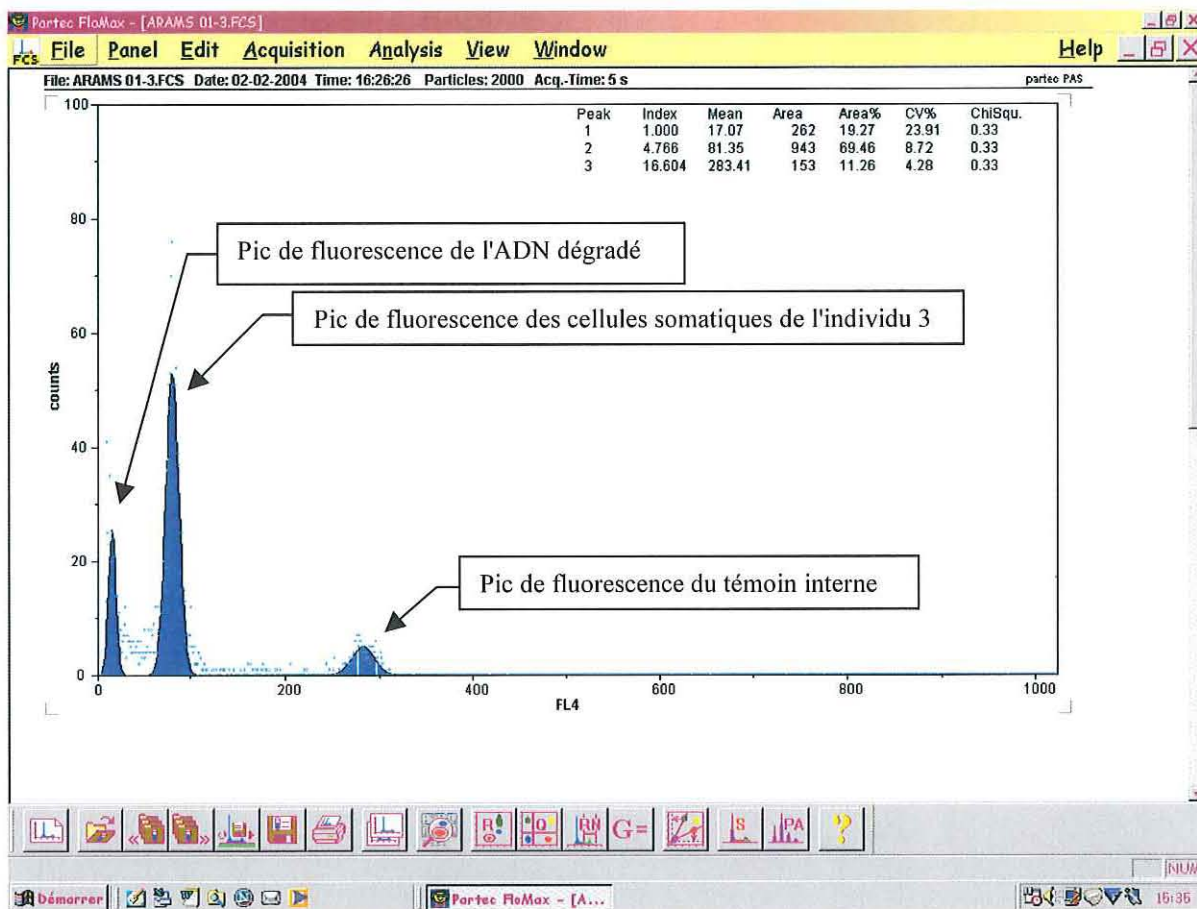
Site : Sableyre de Compran.

N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	28	2	0	0	2	6,66		1
2	25	4	1	0	5	16,66		1
3	27	2	0	1	3	10		2
4	25	2	1	2	5	16,66		1
5	27	1	2	0	3	10		1
6	27	3	0	0	3	10		1
7	25	3	1	1	5	16,66		2
8	24	3	1	2	6	20		1
9	24	1	3	2	6	20		1
10	22	4	2	2	8	26,66		1
11	24	3	1	2	6	20		1
12	26	2	0	2	4	13,33		1
13	27	1	2	0	3	10		1
14	25	4	0	1	5	16,66		2
15	27	2	0	1	3	10	14,88	1

Site : Villa algérienne.

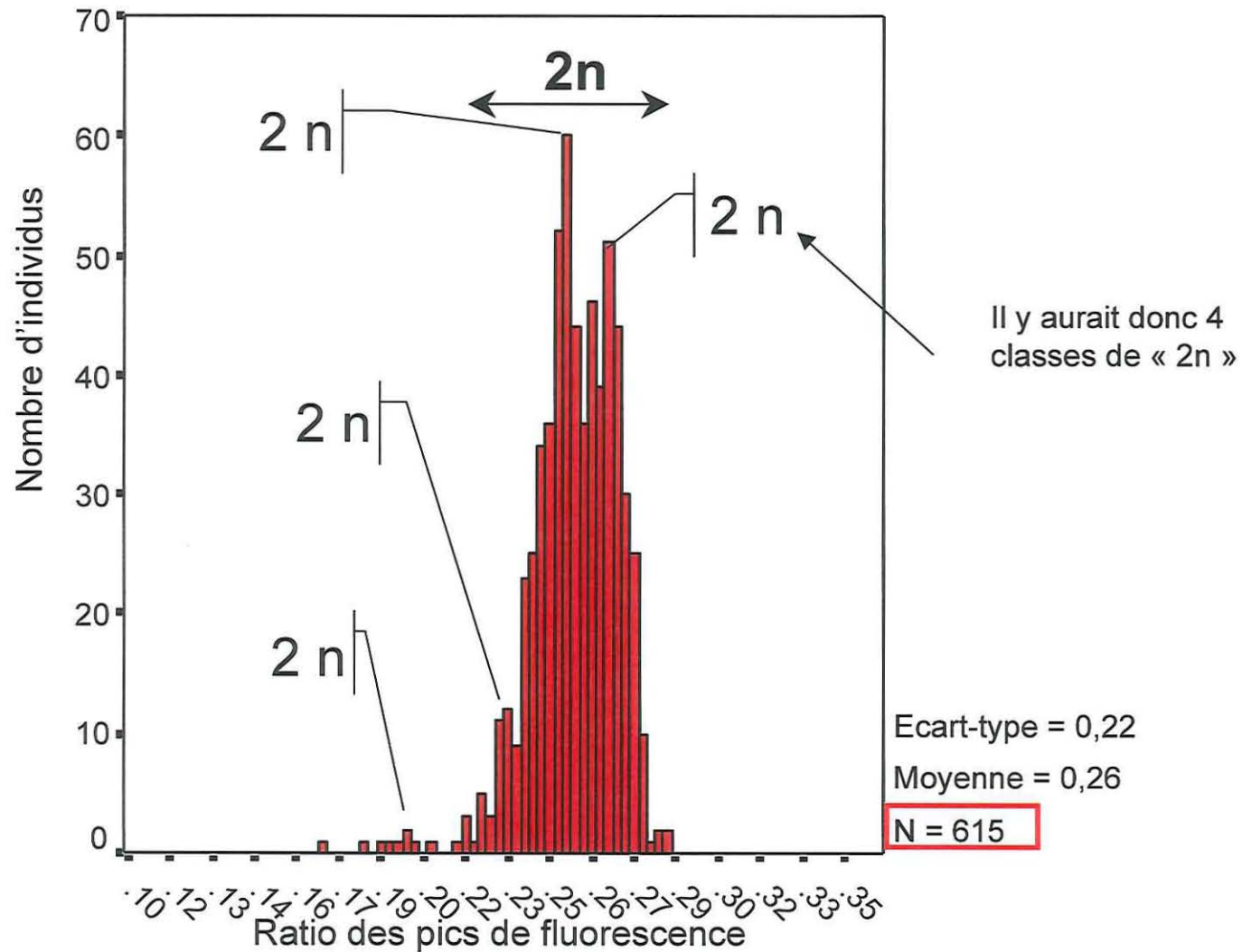
N° animal	Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1	23	5	2	0	7	23,33		1
2	27	2	0	1	3	10		1
3	25	3	0	2	5	16,66		1
4	26	2	2	0	4	13,33		1
5	25	3	2	0	5	16,66		1
6	30	0	0	0	0	0		1
7	24	2	3	1	6	20		1
8	29	0	1	0	1	3,33		1
9	25	3	1	1	5	16,66		2
10	28	1	0	1	2	6,66		1
11	26	3	0	1	4	13,33		1
12	24	3	3	0	6	20		1
13	27	2	1	0	3	10		1
14	28	2	0	0	2	6,66	12,61	1

ANNEXE 7 : Exemple des pics de fluorescence pour l'individu 3



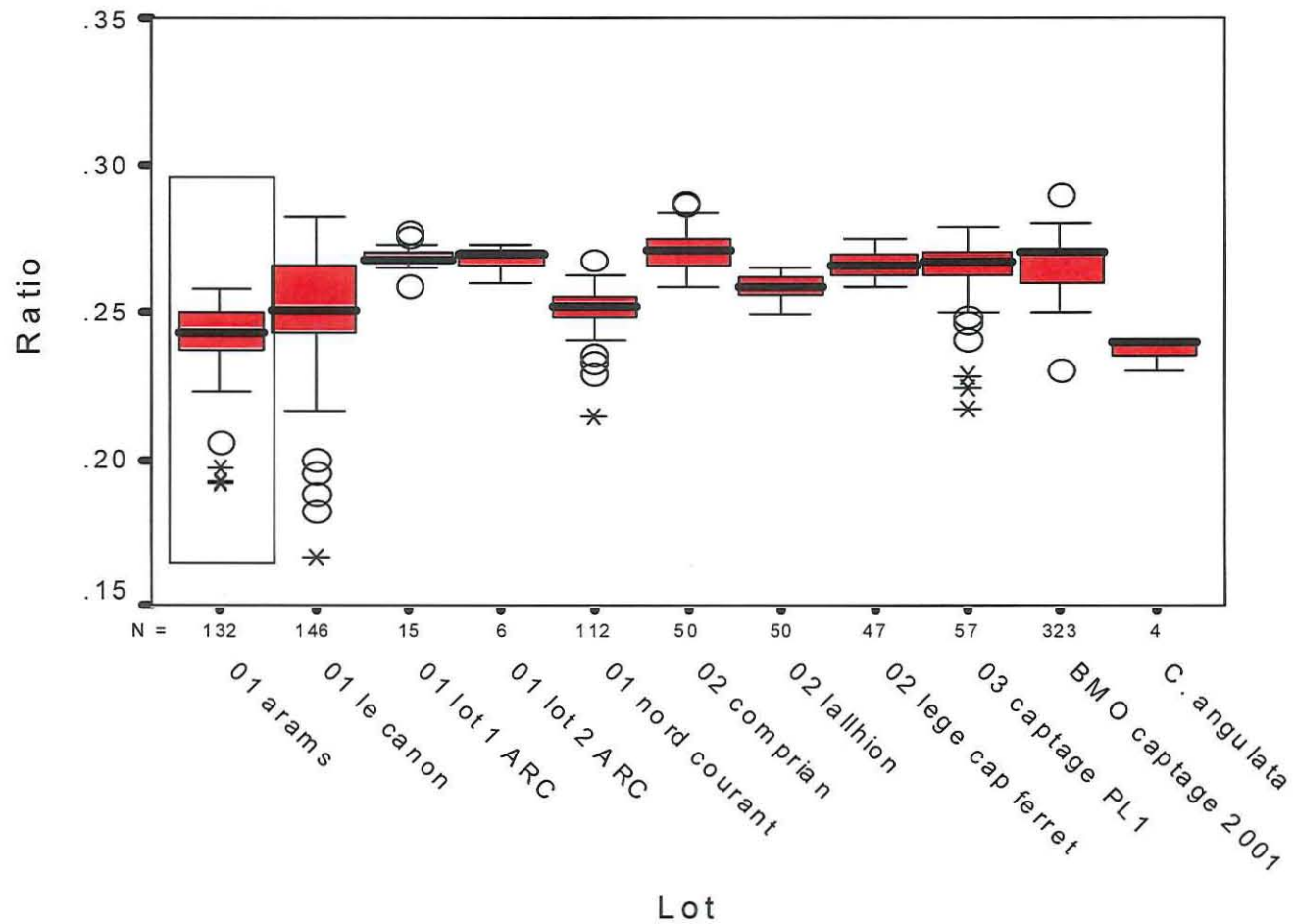
ANNEXE 8, Graphique 1

Etude de différents lots d'huîtres sauvages du Bassin d'Arcachon dans le cadre de biovigilance et analyses hors programme (Cornette et Sharbel, données non publiées)



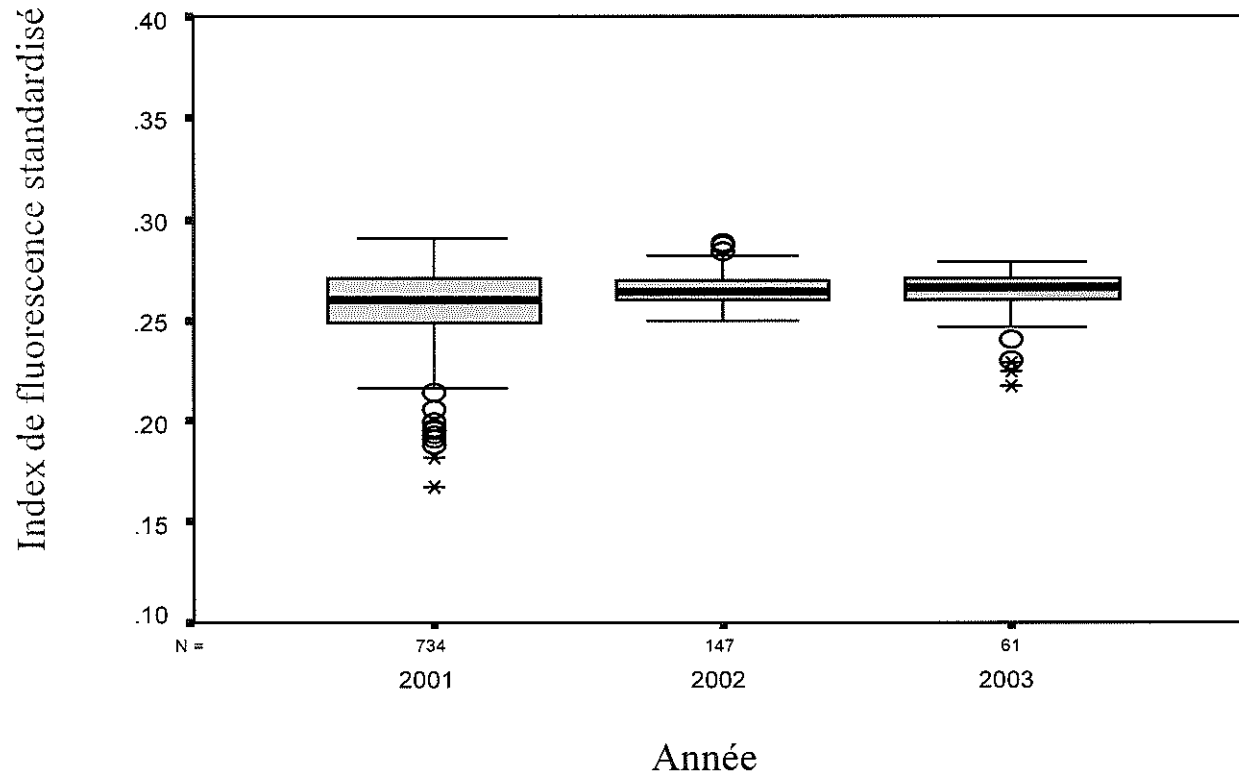
Graphique 2

Arrangement Box-Plots des ratios de taille des individus échantillonnés sur différents sites
(Cornette et Sharbel, données non-publiées)



Graphique 3

Arrangement Box Plots des ratios de taille de l'ensemble des individus répartis sur tous les sites d'échantillonnage en fonction de l'année de prélèvement (Cornette et Sharbel, données non-publiées)



ANNEXE 9 : Données brutes de l'analyse cytogénétique et de l'analyse par cytométrie en flux.

Individu	Classe de chromosomes	Nombre de chromosomes	Index de fluorescence standardisé	Coefficient de Variation	Code des chromosomes	Pourcentage d'aneuploïdie (%)
3	20	21	0,21	8,72	4	70
3	19	6	0,21	8,72	3	20
3	18	2	0,21	8,72	2	07
3	17	1	0,21	8,72	1	03
105	20	27	0,22	8,55	4	90
105	19	2	0,22	8,55	3	07
105	18	1	0,22	8,55	2	03
105	17	0	0,22	8,55	1	00
70	20	29	0,22	4,71	4	97
70	19	0	0,22	4,71	3	00
70	18	0	0,22	4,71	2	00
70	17	1	0,22	4,71	1	03
55	20	25	0,23	8,03	4	83
55	19	4	0,23	8,03	3	13
55	18	0	0,23	8,03	2	00
55	17	1	0,23	8,03	1	03
92	20	27	0,24	5,43	4	90
92	19	1	0,24	5,43	3	03
92	18	2	0,24	5,43	2	07
92	17	0	0,24	5,43	1	00
58	20	25	0,25	5,53	4	83
58	19	1	0,25	5,53	3	03
58	18	0	0,25	5,53	2	00
58	17	4	0,25	5,53	1	13
85	20	26	0,25	4,55	4	87
85	19	3	0,25	4,55	3	10
85	18	0	0,25	4,55	2	00
85	17	1	0,25	4,55	1	03
88	20	24	0,25	5,03	4	80
88	19	2	0,25	5,03	3	07
88	18	2	0,25	5,03	2	07
88	17	2	0,25	5,03	1	07
52	20	23	0,25	6,78	4	77
52	19	5	0,25	6,78	3	17
52	18	0	0,25	6,78	2	00
52	17	2	0,25	6,78	1	07
38	20	26	0,25	5,02	4	87
38	19	3	0,25	5,02	3	10
38	18	0	0,25	5,02	2	00
38	17	1	0,25	5,02	1	03
50	20	27	0,26	5,69	4	90
50	19	1	0,26	5,69	3	03
50	18	1	0,26	5,69	2	03
50	17	1	0,26	5,69	1	03

61	20	27	0,26	5,18	4	90
61	19	3	0,26	5,18	3	10
61	18	0	0,26	5,18	2	00
61	17	0	0,26	5,18	1	00
27	20	28	0,26	6,06	4	93
27	19	0	0,26	6,06	3	00
27	18	2	0,26	6,06	2	07
27	17	0	0,26	6,06	1	00
76	20	29	0,26	6,92	4	97
76	19	1	0,26	6,92	3	03
76	18	0	0,26	6,92	2	00
76	17	0	0,26	6,92	1	00
115	20	24	0,26	4,90	4	80
115	19	3	0,26	4,90	3	10
115	18	2	0,26	4,90	2	07
115	17	1	0,26	4,90	1	03
81	20	28	0,27	5,37	4	93
81	19	1	0,27	5,37	3	03
81	18	1	0,27	5,37	2	03
81	17	0	0,27	5,37	1	00
62	20	26	0,27	6,68	4	87
62	19	3	0,27	6,68	3	10
62	18	1	0,27	6,68	2	03
62	17	0	0,27	6,68	1	00
84	20	27	0,27	5,99	4	90
84	19	1	0,27	5,99	3	03
84	18	1	0,27	5,99	2	03
84	17	1	0,27	5,99	1	03
73	20	23	0,27	7,51	4	77
73	19	4	0,27	7,51	3	13
73	18	3	0,27	7,51	2	10
73	17	0	0,27	7,51	1	00
86	20	26	0,27	5,30	4	87
86	19	2	0,27	5,30	3	07
86	18	2	0,27	5,30	2	07
86	17	0	0,27	5,30	1	00
16	20	23	0,27	5,67	4	77
16	19	1	0,27	5,67	3	03
16	18	5	0,27	5,67	2	17
16	17	1	0,27	5,67	1	03
25	20	26	0,27	7,31	4	87
25	19	4	0,27	7,31	3	13
25	18	0	0,27	7,31	2	00
25	17	0	0,27	7,31	1	00
42	20	26	0,28	5,71	4	87
42	19	3	0,28	5,71	3	10
42	18	1	0,28	5,71	2	03
42	17	0	0,28	5,71	1	00