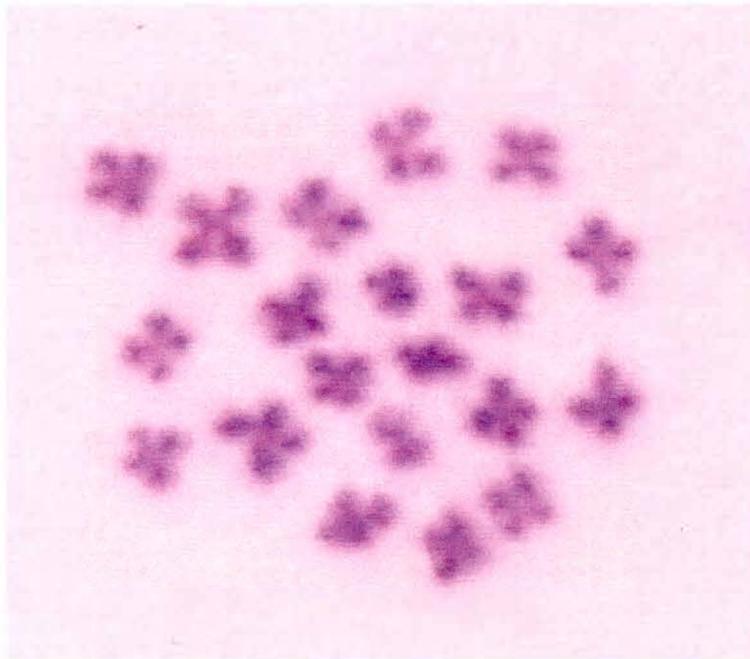


Karine Bouilly
DEA Exploitation Durable des Ecosystèmes Littoraux
Année: 2000-2001

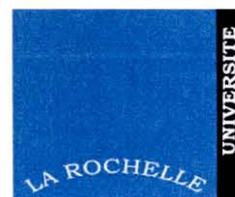
**Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître
creuse *Crassostrea gigas*:
étude expérimentale sur une population
en milieu contrôlé**



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

Ecole Doctorale de La Rochelle
23 avenue Albert Einstein
17071 La Rochelle Cedex 9

ifremer



Remerciements

Ces remerciements sont l'occasion pour moi d'exprimer ma gratitude envers tous ceux qui ont fait que ce stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens tout d'abord à remercier André Gérard de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire IFREMER de La Tremblade et en particulier Alexandra Leitão, Helen Mc Combie et Sylvie Lapègue pour leur aide dans mon étude de l'aneuploïdie.

Je tiens également à remercier le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas et en particulier Dominique Munaron et Jean François Dubernet pour les analyses qu'ils ont effectuées.

Je tiens aussi à remercier l'INRA de St-Laurent-de-la-Prée (M. Chevallier) pour m'avoir fourni l'atrazine.

Sommaire

<i>Etat de l'art</i>	4
1. L'aneuploïdie	5
1.1. Définition et origine	5
1.2. Chez les mammifères	5
1.3. Chez les plantes et animaux inférieurs	5
1.4. Chez les mollusques	5
1.5. Aneuploïdie chez les animaux triploïdes et tétraploïdes	6
2. Les pesticides	6
2.1. Définition, utilisation	6
2.2. Contamination de l'environnement par les pesticides	7
2.3. Les triazines: famille d'herbicides	7
2.4. Transport dans le milieu aquatique	7
2.5. Toxicité vis à vis des organismes aquatiques	8
3. L'atrazine et ses conséquences au niveau génétique	9
3.1. Activité induisant l'aneuploïdie	9
3.2. Activité mutagène	9
3.3. Activité clastogène	9
<i>L'aneuploïdie aux stades précoces: mise au point de la méthodologie</i>	<i>10</i>
1. Introduction	11
2. Matériel et Méthodes	12
3. Résultats	13
3.1. Etude sur des embryons	13
3.2. Etude sur des larves	15
4. Discussion	16
<i>Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>: étude expérimentale sur une population en milieu contrôlé</i>	<i>18</i>
1. Introduction	19
2. Matériel et Méthodes	19
2.1. Origine des huîtres étudiées	19
2.2. Protocole expérimental	20
2.3. Fécondations	21
2.4. Elevage larvaire	22
2.5. Etude de l'aneuploïdie	23

2.5.1. Préparations chromosomiques _____	23
2.5.2. Analyse des données _____	23
3. Résultats _____	24
3.1. Action de l'atrazine sur les mortalités des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes _____	24
3.2. Action de l'atrazine sur le matériel génétique des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> adultes _____	24
3.3. Action de l'atrazine sur le matériel génétique du naissain de <i>Crassostrea gigas</i> _____	26
3.4. Action de l'atrazine sur la descendance d'une population d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> _____	26
3.4.1. Action sur le taux d'éclosion _____	26
3.4.2. Action sur la croissance larvaire _____	27
4. Discussion _____	28
 <i>Références bibliographiques</i> _____	 30
 <i>Annexes</i> _____	 36
Annexe 1: Résultats des analyses effectuées par le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas _____	37
Annexe 2: Température des bacs et mortalité des huîtres <i>Crassostrea gigas</i> au cours de l'expérience _____	38
Annexe 3: Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> adultes _____	39
Annexe 4: Taux d'éclosion des larves issues de croisements d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposées à différentes concentrations d'atrazine _____	41
Annexe 5: Tailles en μm des larves en fonction des différents lots et des journées d'élevage (J) _____	42

Etat de l'art

1. L'aneuploïdie

1.1. Définition et origine

L'aneuploïdie est un phénomène cytologique qui peut être défini 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).

A la différence des altérations chromosomiques structurales (telles que délétions, duplications, inversions et translocations), les 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). En effet, ce phénomène a pour origine principalement une non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose (Bond et Chandley, 1983; Martin et Rademaker, 1990).

1.2. Chez les mammifères

Chez les mammifères, la plupart des aneuploïdies autosomiques sont létales mais il existe des cas où les individus survivent avec un nombre anormal de chromosomes mais avec une viabilité réduite (Bond et Chandley, 1983; Verma, 1990). Elles sont aussi souvent associées à un retard de croissance (ex: trisomie 21 chez l'homme) (Vig et Sandberg, 1987).

1.3. Chez les plantes et animaux inférieurs

Les effets de l'aneuploïdie chez les plantes et animaux inférieurs semblent être moins délétères ou mieux tolérés que chez les vertébrés supérieurs comme les mammifères (Verma, 1990; Wang *et al.*, 1999).

1.4. Chez les mollusques

L'aneuploïdie a été étudiée au niveau embryonnaire, larvaire ou au stade adulte chez de nombreux mollusques: l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992; Guo *et al.*, 1992; Lapègue *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999), 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, 1985, 1994), une huître plate *Ostrea angasi* (Li et Havenhand, 1997), les moules *Mytilus edulis* (Dixon, 1982; Cornet, 1993) et *Mytilus galloprovincialis* (Martínez-Expósito *et al.*, 1992), la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* (Yang *et al.*, 2000), une mactre *Mulinia lateralis* (Wada *et al.*, 1990) et l'oxynoe *Oxynoe olivacea* (Vitturi *et al.*, 2000).

Ahmed et Sparks (1970) ont en effet observé sur des œufs et embryons de *Mytilus* ($2n=28$) 5 à 10% de mitoses à nombre chromosomique anormal (27-30). De plus, Dixon (1982) a décrit 8% d'embryons aneuploïdes chez *Mytilus edulis* dans une zone non polluée et 26% dans une zone polluée tandis que Martínez-Expósito *et al.* (1992) ont observé des niveaux d'aneuploïdie de 23 à 32% sur des populations naturelles de *Mytilus galloprovincialis*. Pour d'autres familles de bivalves, des cas de métaphases aneuploïdes ont également été rapportés sur des œufs et des embryons mais sans précision quantitative: Ahmed et Sparks, 1967, Longwell *et al.*, 1967 chez les Ostreidae; Beaumont et Gruffydd, 1974 chez les Pectinidae.

Des cellules aneuploïdes (hypodiploïdie) ont aussi été décrites chez des naissains de Mytilidae et Ostreidae (animaux juvéniles de 8mm environ), montrant que ce phénomène persiste au cours du développement (Thiriot-Quiévreux et Ayraud, 1982; Thiriot-Quiévreux, 1984). Le pourcentage total d'aneuploïdie varie de 12 à 34% chez les juvéniles (5-10 mm) d'*Ostrea edulis* (Thiriot-Quiévreux, 1986) et il est de 7,62% chez *Ostrea angasi* (Li et Havenhand, 1997). En 1986, Thiriot-Quiévreux a montré non seulement que la proportion de cellules aneuploïdes (différentes du nombre diploïde normal de $2n=20$) dans les tissus somatiques d'huîtres juvéniles de *Crassostrea gigas* diffère substantiellement entre les individus (de 9 à 26%) mais que ça peut aussi être une cause importante de variation de taille. En effet, le taux d'aneuploïdie somatique a montré a posteriori avoir un effet défavorable sur le taux de croissance juvénile chez *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992). Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992; Leitão *et al.*, 2001b) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). Le pourcentage d'aneuploïdie entre les animaux à croissance rapide et ceux à croissance lente varie entre 5 et 22% (Leitão *et al.*, 2001b).

1.5. Aneuploïdie chez les animaux triploïdes et tétraploïdes

Chez les coquilles Saint-Jacques *Chlamys farreri* triploïdes et tétraploïdes, le pourcentage d'aneuploïdie varie entre 5 et 32%. La majorité des aneuploïdes sont morts rapidement durant la première semaine (Yang *et al.*, 2000). L'aneuploïdie a aussi été observée chez les huîtres *Crassostrea gigas* triploïdes et tétraploïdes (Guo et Allen, 1994; Wang *et al.*, 1999). En effet, Wang *et al.* (1999) ont montré que les méthodes pour produire des triploïdes peuvent générer des aneuploïdes (20%).

2. Les pesticides

2.1. Définition, utilisation

Les pesticides sont définis comme étant des substances destinées à lutter contre les parasites au sens large, c'est à dire en fait contre des organismes « indésirables ». Ils regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifique, tels que herbicides, fongicides et insecticides, qui sont les trois plus importants types de produits utilisés.

En France, les pesticides appelés aussi produits phytosanitaires, sont utilisés principalement (à 90%) en agriculture. D'un point de vue économique, l'utilisation de pesticides apparaît bénéfique: en l'absence de traitements, les pertes dues aux dégâts sur les cultures seraient quatre fois plus importantes (Collet, 1988). Les autres utilisations sont liées aux industries (bois, textile, agro-alimentaire) ou aux traitements des voies ferrées, routes, étangs.

L'utilisation de substances de synthèse telles que les pesticides pose cependant des problèmes en matière de santé publique et de dommages sur les écosystèmes naturels. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être a priori considéré comme étant inoffensif. Les préoccupations concernant les effets des pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de très nombreux organismes.

2.2. Contamination de l'environnement par les pesticides

Selon la définition donnée 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'application de pesticides n'implique pas forcément l'existence d'un effet donc le terme de contaminants est employé.

2.3. Les triazines: famille d'herbicides

Les herbicides de la famille des triazines sont principalement utilisés sur les cultures céréalières; leur taux d'application varie de 0,25 à 60 kg/ha (Smith *et al.*, 1982).

Les triazines, et l'atrazine en particulier, sont les principaux facteurs ayant augmenté la production de maïs aux Etats-Unis dès les années 1960. L'atrazine est apparue dès 1958 (Stevens *et al.*, 1991) et est très utilisée mondialement. Son usage est toutefois interdit ou limité dans plusieurs pays européens (Allemagne, Italie et France). En effet, en France, la dose d'atrazine est limitée à 1000 g/ha en zone agricole et son usage est interdit en zone non agricole (Coirault, 1999).

Les données de la littérature sur la demie vie de l'atrazine dans les sols agricoles montrent une grande variabilité (entre 37 jours et 3 à 5 ans), dépendant de la composition du sol (argiles ou sable, teneur en matière organique) et de paramètres physico-chimiques tels que humidité, température et pH (Jones *et al.*, 1982).

2.4. Transport dans le milieu aquatique

L'intensification de l'activité agricole entraîne une utilisation de produits phytosanitaires qui par lessivage et érosion des sols sont susceptibles d'être transportés vers le milieu aquatique. Ce sont les canaux de drainage qui constituent une voie d'entrée de l'atrazine dans le milieu marin. Par exemple, au niveau des canaux de Marennes, Charras et Grand Garçon, les concentrations en atrazine sont comprises entre 50 ng.l⁻¹ et 7787 ng.l⁻¹ (Munsch, 1995).

Les niveaux de concentrations de l'atrazine sont plus élevés en période de traitement des cultures, indiquant un transport rapide de ce produit des zones d'épandage vers le milieu aquatique. De plus, les événements pluvieux et leur intensité ont aussi une influence sur la quantité d'atrazine entraînée par érosion et/ou ruissellement des terres. Ainsi, les relations temporelles existant entre l'épandage et l'arrivée de ce contaminant en milieu aquatique sont fonction de la proximité des cultures et des canaux recevant les eaux de lessivage des sols (Munsch, 1995).

Toutefois, l'atrazine est présente en dehors de la période d'épandage donc cela montre que ce produit est rémanent dans les sols pour être présent d'une année à l'autre et qu'il est mobile. Il est persistant. Le transport de l'atrazine jusqu'en zone estuarienne et marine côtière est donc fonction de sa mobilité et de sa persistance dans les sols (Munsch, 1995).

L'adsorption par les colloïdes est un processus jouant aussi un rôle important dans les mécanismes de transport de l'atrazine vers les zones côtières (Means *et al.*, 1983).

2.5. Toxicité vis à vis des organismes aquatiques

La toxicité des pesticides reste toujours très élevée pour les organismes non cibles, plus particulièrement en milieu aquatique. Même s'ils se trouvent fortement dispersés dans ce milieu, ils peuvent provoquer des effets létaux ou sublétaux.

Les effets directs des triazines, du fait de leur mode d'action par inhibition de la photosynthèse, sont susceptibles d'intervenir essentiellement sur les végétaux. Des concentrations d'atrazine de 1 à 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ ont un effet sur la photosynthèse du phytoplancton (De Noyelles *et al.*, 1982).

L'accumulation de l'atrazine dans l'organisme dépend de l'espèce et de la concentration d'atrazine dans l'eau. Celle-ci est corrélée avec le coefficient de partage octanol/eau (Muñoz et Rosés, 2000). L'atrazine possède une toxicité aiguë vis à vis des larves d'un copépode et d'un poisson, à des concentrations minimales de 0,5 mg.l^{-1} et 2 mg.l^{-1} respectivement (LC 50 – 96h) (Hall *et al.*, 1994). Les bivalves accumulent l'atrazine essentiellement en filtrant l'eau (Moraga et Tanguy, 2000), l'atrazine est donc accumulée par les branchies (Gunkel et Streit, 1980).

Robert *et al.* (1986) ont montré la toxicité de l'atrazine sur la formation et la croissance de jeunes larves de *Crassostrea gigas* et sur la croissance de deux algues *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans* utilisées comme nourriture pour les véligères. La croissance phytoplanctonique s'est réalisée jusqu'à une teneur en atrazine de 0,1 mg.l^{-1} . Une teneur de 0,5 mg.l^{-1} représente un seuil au delà duquel la croissance larvaire est anormale. Au delà de 1 mg.l^{-1} , des mortalités sont apparues dans les élevages larvaires. Toutefois, l'action d'un polluant sur des larves de *Crassostrea gigas* et sur la croissance larvaire ne semble pas être sensible avant une semaine d'exposition (His et Robert, 1986). La toxicité de l'atrazine a aussi causé un taux de mortalité approximativement de 60 à 70% à des concentrations de 0,1 et 0,2 mg.l^{-1} après deux mois d'exposition chez l'huître *Crassostrea gigas* adulte (Moraga et Tanguy, 2000). Auffret et Oubella (1997) ont aussi observé des changements modérés dans l'agglomération des hémocytes de *Crassostrea gigas* à des concentrations d'atrazine de 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (valeur pic observée dans l'estuaire d'Elorn en rade de Brest (Thomas et Durand, 1995)) et 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Au bout de 18 jours, avec une teneur en atrazine de 15 $\mu\text{g.l}^{-1}$, un changement significatif dans le comportement de deux espèces de mollusques d'eau douce herbivores *Physa acuta* et *Ancylus fluviatilis* a été observé. Des lyses cellulaires sont apparues quand ces animaux ont été exposés à des concentrations en atrazine de 0,1 mg.l^{-1} pendant 10 jours. Par contre, il n'y a pas eu d'effet significatif sur le taux de mortalité et la biomasse (Rosés *et al.*, 1999).

Pourtant, malgré de fortes concentrations d'atrazine dans l'eau (jusqu'à 430 ng.l^{-1}), cet herbicide n'a pas été détecté dans les huîtres *Crassostrea virginica* de Chesapeake Bay (Lehotay *et al.*, 1998). De plus, sur l'ensemble des côtes des Etats-Unis, Wade *et al.* (1998) n'ont pas sélectionné l'atrazine dans leur surveillance du milieu car elle n'était détectée que dans 5% des bivalves échantillonnés.

Huber (1993) a indiqué que les effets irréversibles de l'atrazine sur les écosystèmes n'interviennent pas en dessous de niveaux de concentrations inférieurs à 20 $\mu\text{g.l}^{-1}$. De plus, suivant la contamination, l'atrazine accumulée est très rapidement perdue par les organismes quand ils sont introduits dans de l'eau propre (Streit, 1979).

3. L'atrazine et ses conséquences au niveau génétique

3.1. Activité induisant l'aneuploïdie

L'atrazine est un produit chimique capable d'induire l'aneuploïdie chez *Aspergillus nidulans* (Bignami *et al.*, 1974), *Drosophila melanogaster* (Murnik et Nash, 1977) et *Neurospora crassa* (Griffiths, 1979). Cependant, ce n'est pas un inducteur efficace de l'aneuploïdie dans les cellules humaines (Ribas *et al.*, 1998). Sous des conditions générales d'utilisation, l'atrazine ne semble donc pas poser un risque génétique pour les humains (Brusick, 1994).

3.2. Activité mutagène

Beaucoup d'herbicides trouvés dans les eaux de surface et/ou souterraines sont mutagènes (capables d'induire une altération du matériel héréditaire). Pourtant, l'atrazine, par lui-même, n'apparaît pas être mutagène chez les mammifères (Loosli, 1994) et n'apparaît pas avoir un grand potentiel pour des effets génotoxiques/mutagènes *in vivo* (Plewa *et al.*, 1984; Dearfield *et al.*, 1993).

3.3. Activité clastogène

Le terme clastogène est utilisé lorsqu'il y a des dommages chromosomiques (Dixon et Wilson, 2000). De plus, les anomalies chromosomiques structurales sont le résultat de dommages de l'ADN (Savage, 1993). Les conséquences des altérations chromosomiques sont universellement nuisibles et comprennent les anomalies congénitales, réduction de la fertilité et cancer (Hagmar *et al.*, 1994). L'atrazine est classifiée comme un carcinogène humain possible par l'International Agency for Research on Cancer (IARC, 1991) et The United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1991) donc un risque de santé humaine potentiel peut être associé avec une contamination par cet herbicide (Taets *et al.*, 1998).

Loprieno *et al.* (1980) ont observé des altérations chromosomiques dans les cellules d'os à moelle des souris exposées à l'atrazine. L'atrazine a aussi un potentiel clastogène dans les cellules d'ovaires de hamster chinois à des concentrations de 0,69 et 0,92 μM (concentrations estimées saines par l'US Environmental Protection Agency pour l'eau de boisson) (Biradar et Rayburn, 1995) ainsi qu'avec le taux de contamination le plus fort trouvé dans les eaux de l'Illinois (Taets *et al.*, 1998).

Des résultats contradictoires sur l'effet de l'atrazine ont pourtant été observés dans des cultures de lymphocytes humains. En effet, Yoder *et al.* (1973) ont trouvé une augmentation des altérations chromosomiques dans les cultures de lymphocytes des fermiers exposés à des pesticides, y compris l'atrazine et Lioi *et al.* (1998) ont montré que l'atrazine provoque des échanges de chromatides sœurs et des altérations chromosomiques. Ils ont aussi observé une réduction de l'index mitotique à de fortes concentrations d'atrazine et une baisse de la croissance cellulaire. Ce résultat est en contradiction avec celui de Kligerman *et al.* (2000) qui n'ont pas observé d'effet aux mêmes concentrations et Ribas *et al.* (1998) qui ont montré un manque d'efficacité de l'atrazine à provoquer des dommages clastogènes dans des lymphocytes humains en culture. Pour eux, l'atrazine est capable de déployer un effet cytotoxique faible.

En ce qui concerne les bivalves, des augmentations significatives dans la fréquence des cellules avec de l'ADN endommagé ont déjà été observées chez des moules exposées à des contaminants (Steinert *et al.*, 1998).

L'aneuploïdie aux stades précoces:
mise au point de la méthodologie

1. Introduction

L'aneuploïdie est un phénomène communément observé chez les bivalves: *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux, 1986; Guo *et al.*, 1992; Zouros *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Leitão *et al.*, 2001b), *Ostrea edulis* (Thiriot-Quiévreux, 1986), *Ostrea angasi* (Li et Havenhand, 1997), *Pinctada fucata martensii* (Komaru et Wada, 1994), *Mytilus edulis* (Dixon, 1982), *Mytilus galloprovincialis* (Martínez-Expósito *et al.*, 1992), *Mulinia lateralis* (Wada *et al.*, 1990) et *Chlamys farreri* (Yang *et al.*, 2000). Alors qu'une relation a été mise en évidence entre le pourcentage de cellules aneuploïdes et le taux de croissance chez *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quiévreux, 1988; Leitão *et al.*, 2001b), les causes de ce phénomène ne sont pas encore bien connues ni la période de la vie de l'animal où ce phénomène se déclenche. Chez l'adulte, l'observation de l'aneuploïdie est difficile car leur activité mitotique est souvent faible surtout à l'époque de la reproduction. Par contre, au niveau du naissain, comme l'animal est en croissance, son activité mitotique est très forte donc un plus grand nombre de mitoses peut être observé (Lapègue *et al.*, 1999). Ainsi, une étude à des stades plus précoces pourrait être envisageable et intéressante afin de savoir si l'aneuploïdie se développe dès le stade embryonnaire ou larvaire. C'est pourquoi nous avons voulu étudier l'aneuploïdie sur la descendance des populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* qui ont été exposées à différentes concentrations d'atrazine (herbicide génotoxique) au niveau embryonnaire ou larvaire.

Des études d'aneuploïdie effectuées chez la moule *Mytilus edulis* ont eu lieu au niveau embryonnaire (Dixon, 1982). Des études d'aneuploïdie au niveau embryonnaire chez la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* (Yang *et al.*, 2000) et au niveau larvaire (trochophores) chez *Mulinia lateralis* (Wada *et al.*, 1990) ont aussi été réalisées. Komaru et Wada (1994) ont étudié l'aneuploïdie de larves de 6 heures de l'huître perlière *Pinctada fucata martensii*. Guo *et al.* (1998) l'ont fait sur *Crassostrea gigas*, 8 heures après la fertilisation. *Crassostrea virginica* et *Crassostrea rhizophorae* ont déjà fait l'objet d'études chromosomiques au niveau des embryons et des larves (Rodríguez-Romero *et al.*, 1991). Xu *et al.* (2001) ont étudié la ploïdie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica* au bout de 5 à 6 heures de culture tandis que Li *et al.* (2000) l'ont fait uniquement chez *Crassostrea gigas* sur des larves de 12 heures. Chez *Mytilus galloprovincialis*, des études chromosomiques ont aussi été effectuées au niveau larvaire (Martínez-Lage *et al.*, 1994; Martínez-Expósito *et al.*, 1994). En règle générale, tous ces auteurs observent un petit nombre de métaphases par lame où le comptage chromosomique est possible. Une étude d'aneuploïdie est donc difficile à réaliser car un minimum de 30 métaphases par série d'embryons ou de larves est requis. C'est le nombre statistique minimum habituellement accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984). Il apparaît donc nécessaire d'optimiser les protocoles.

Les méthodes utilisées par différents auteurs ont été reprises tout en faisant varier certains paramètres tels que la concentration ou bien le temps de colchicine, la solution permettant le choc hypotonique (citrate de sodium ou KCl) et son temps d'action, le broyage et l'âge des embryons ou des larves. Le but est donc d'établir le meilleur protocole pour étudier l'aneuploïdie au niveau embryonnaire ou larvaire afin d'obtenir un nombre suffisant de métaphases avec le meilleur étalement possible pour pouvoir évaluer ce phénomène.

2. Matériel et Méthodes

Des fécondations ont été réalisées à partir d'animaux mûres d'écloserie. Plusieurs individus mâles et femelles ont été utilisés afin de réaliser un pool de gamètes. La fécondation s'est déroulée dans des éprouvettes d'un litre avec de l'eau de mer filtrée. Ensuite, le développement s'est poursuivi dans des jarres de 150 l en élevage larvaire. Pour un bac de 150 l, 15 millions d'ovocytes et 3 milliards de spermatozoïdes sont requis.

Les embryons (quelques heures) (Figure 1) ont été tamisés sur 25 μm tandis que les larves (24 heures) (Figure 2) ont été tamisées sur 45 μm . Ils ont été ajoutés dans une solution de colchicine diluée à 0,005% ou 0,01% dans l'eau de mer avec un système de bullage pendant 2 heures (embryons) ou 4 heures (larves). La colchicine permet le blocage des mitoses au stade de métaphase. Un nouveau tamisage a été nécessaire après cette étape. Puis une centrifugation de 1000 tours/minute pendant 5 minutes a été réalisée afin de récupérer les animaux. Il en a été de même entre chaque étape du protocole suivant. Les embryons ou larves ont subi ensuite un choc hypotonique pour permettre une meilleure dispersion chromosomique grâce à une solution de citrate de sodium à 0,9% pendant 20 minutes (embryons) ou 30 minutes (larves). Ils ont ensuite été fixés dans une solution Carnoy d'éthanol: acide acétique (3: 1) avec trois changements de 10 minutes. Puis, les tubes contenant les embryons ou larves ont été stockés à 4°C.

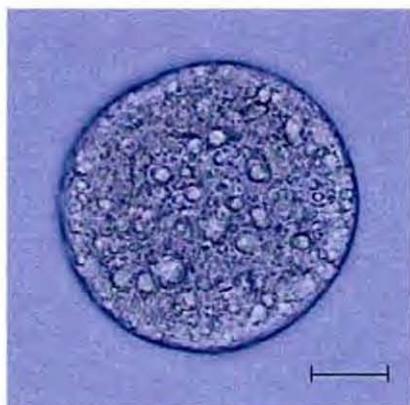


Figure 1: Embryon de 6 heures d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 14 μm .

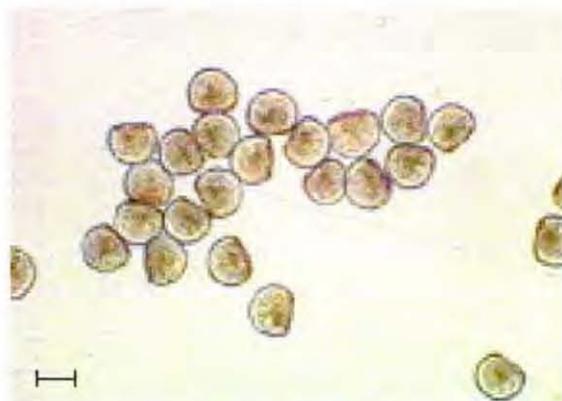


Figure 2: Larves D de 24 heures d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 54 μm .

Des préparations d'étalement chromosomique ont été effectuées afin de visualiser des chromosomes au microscope. La solution fixatrice a été enlevée et remplacée par une solution d'acide acétique à 50% en eau distillée qui doit réaliser un choc osmotique et donc faciliter la libération des noyaux interphasiques. La suspension cellulaire a été étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm environ sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. Ce procédé permet de rompre les membranes nucléaires, d'étaler les chromosomes et ainsi de faciliter la lecture. Après aspiration du liquide et séchage, les lames ont été colorées avec une solution Giemsa (4%, pH: 6,8) permettant la coloration de l'ADN pendant 10 minutes. Elles ont ensuite été séchées à l'air. Puis, l'estimation de l'aneuploïdie a été effectuée par le comptage des chromosomes au microscope optique.

3. Résultats

3.1. Etude sur des embryons

Au niveau des embryons, les chromosomes sont bien individualisés mais très éparpillés et non regroupés en métaphase (Figure 3) comme classiquement observé (Figure 4). L'appartenance des chromosomes à telle ou telle métaphase est difficile à déterminer et donc par conséquent l'étude de l'aneuploïdie sur des embryons de 4 ou 6 heures n'est pas facile à réaliser. Sur les embryons de 6 heures, une plus grande quantité de noyaux interphasiques a pu être visualisée par rapport aux embryons de 4 heures. Les résultats ont été identiques quelle que soit la concentration de colchicine utilisée.

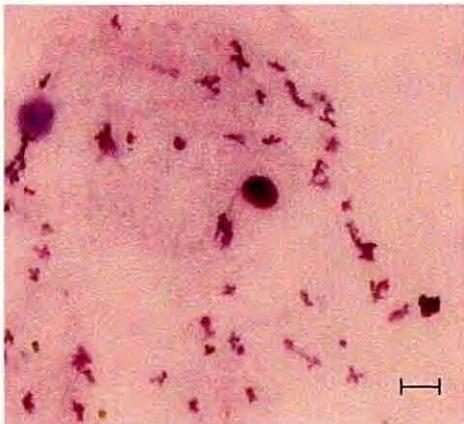


Figure 3: Chromosomes d'embryons de 6 heures d'huîtres *Crassostrea gigas* non regroupés en métaphase. Echelle = 9 µm.

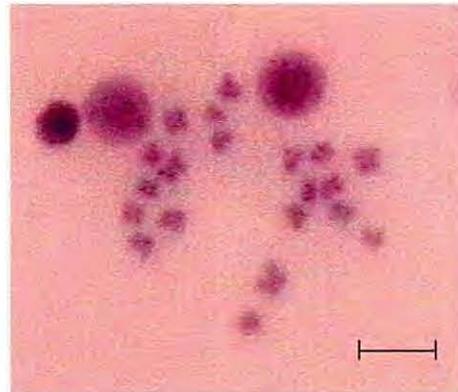


Figure 4: Métaphase d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes avec $2n=20$. Echelle 9 µm.

Le temps de colchicine a ensuite été réduit à 30 minutes ou 1 heure afin de déterminer si l'exposition initiale à la colchicine était trop forte. Des résultats identiques à ceux obtenus précédemment ont été observés. Lors d'une expérience sur des embryons de 4 heures, les chromosomes étaient individualisés mais pas assez contrastés. Cependant, les lames présentaient très peu de matériel.

Le temps de citrate a aussi été prolongé de 10 minutes en vue d'obtenir une meilleure dispersion chromosomique. Pourtant, les chromosomes qui ont été observés dans les métaphases étaient trop serrés ce qui n'a pas permis de réaliser le comptage (Figure 5). De plus, un problème de déchets est survenu au cours de cette expérience et cela a pu causer un biais.

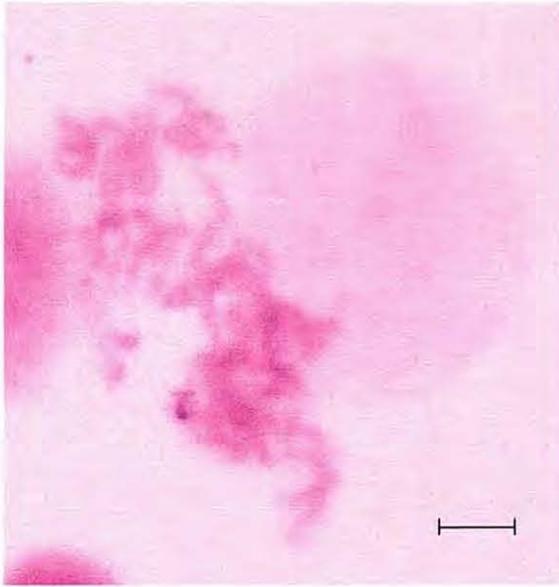


Figure 5: Métaphase d'embryons de 6 heures d'huîtres *Crassostrea gigas* avec une mauvaise dispersion chromosomique. Echelle = 5 μ m.

Trois derniers essais ont ensuite été réalisés sur des embryons de 5 heures afin de réaliser de nouveaux protocoles sur un âge intermédiaire.

Une première expérience a été réalisée en ne faisant que des filtrations sur 25 μ m à la place des centrifugations. Les embryons ont été placés dans la colchicine à 0,005% pendant 30 minutes puis exposés à un nouveau traitement hypotonique avec 0,075 mol/l de solution KCl pendant 12 minutes (KCl: larves, 9: 1) et fixés par la solution Carnoy (pas de bains successifs). Les observations des premières lames effectuées ont révélé que les embryons étaient entiers (Figure 6). Donc pour les lames suivantes, le matériel a été broyé avant l'exécution de celles-ci mais aucun noyau interphasique ni chromosome n'ont été observés.

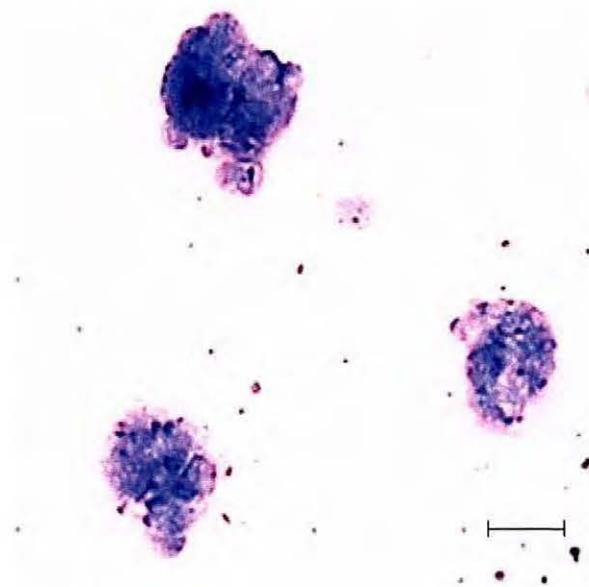


Figure 6: Embryons de 5 heures d'huîtres *Crassostrea gigas* n'ayant pas subi de centrifugations. Echelle = 29 μ m.

Une deuxième et troisième expériences ont été réalisées avec le protocole suivant: colchicine à 0,005% pendant 30 minutes, citrate ou KCl pendant 30 minutes et 3 bains de fixateur afin de savoir si une différence existe entre les deux solutions employées pour le choc hypotonique. Avec le KCl, aucune métaphase n'a été observée, seulement des noyaux interphasiques. Par contre, avec le citrate, quelques métaphases ont été observées mais elles étaient non comptables.

Une autre expérience a été réalisée en même temps avec le protocole suivant: colchicine à 0,02% pendant 1h45 dans 1 l d'eau de mer puis 3 l d'eau distillée ont été rajoutés pendant 15 minutes, enfin plusieurs changements de fixateurs ont eu lieu (3 bains de 10/10/20 minutes). Ce protocole aurait permis de tester un autre moyen de choc hypotonique, malheureusement les larves étaient quasi inexistantes et aucun matériel n'a été observé sur les lames.

Pour conclure, ces expériences n'ont pas permis d'évaluer l'aneuploïdie et ceci à cause du mauvais regroupement des chromosomes en métaphase et à la perte de matériel dus probablement au fait que les embryons ont une très petite taille.

3.2. Etude sur des larves

La visualisation de chromosomes en métaphase n'ayant pas été concluante sur des embryons, des essais ont ensuite été réalisés sur des larves D de 24 heures. Une mauvaise dispersion chromosomique a été observée dans les métaphases. Les deux concentrations testées de colchicine n'ont pas donné de visualisation différente des chromosomes. Les chromosomes étaient trop condensés et les métaphases n'étaient donc pas comptables (Figure 7). Comme les chromosomes étaient très condensés, l'hypothèse que les larves soient restées trop longtemps dans la colchicine a été émise. Pour tester cette hypothèse, les essais suivants ont été réalisés en diminuant le temps d'exposition à la colchicine à 3 heures, 2h30 et 2h tout en gardant la concentration de colchicine la plus basse soit 0,005%. Le temps de citrate a été augmenté pour atteindre 45 minutes afin de faciliter la dispersion des chromosomes au moment de l'étalement sur les lames. Les chromosomes se présentent moins condensés mais le comptage des métaphases s'est avéré toujours très difficile car les chromosomes n'ont toujours pas pu être distingués les uns des autres.

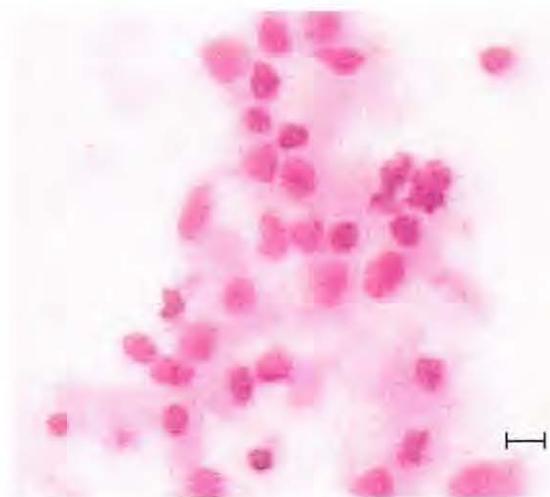


Figure 7: Métaphases de larves de 24 heures d'huîtres *Crassostrea gigas* trop serrées.
Echelle = 9 μ m.

D'autre part, beaucoup de larves étaient encore entières sur les lames lors des premières expériences donc, dans un premier temps, un broyage à l'aide du broyeur de Dulce a été réalisé après la filtration permettant d'ôter la colchicine.

Dans ce cas, le matériel a été en grande partie détruit. Donc, les larves ont été broyées après les fixations dans l'eau acidifiée afin de ne pas détruire le matériel. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un broyage dans le dernier fixateur mais ils n'étaient toujours pas assez bons pour permettre le comptage des chromosomes dans les métaphases.

Deux méthodes de choc hypotonique: citrate ou KCl ont aussi été testées avec un temps d'exposition de 30 minutes mais aucune différence n'a été observée entre ces deux méthodes.

Il est à noter que les larves de 24 heures ont déjà des coquilles. Il est donc possible que les différentes solutions n'aient peut-être pas pénétré aisément dans les cellules. De plus, les coquilles n'ont pas été détruites lors des expositions aux différentes solutions. Une bonne partie du matériel a eu tendance à se coller aux coquilles pendant l'exécution des lames empêchant ainsi la bonne dispersion du matériel (Figure 8).

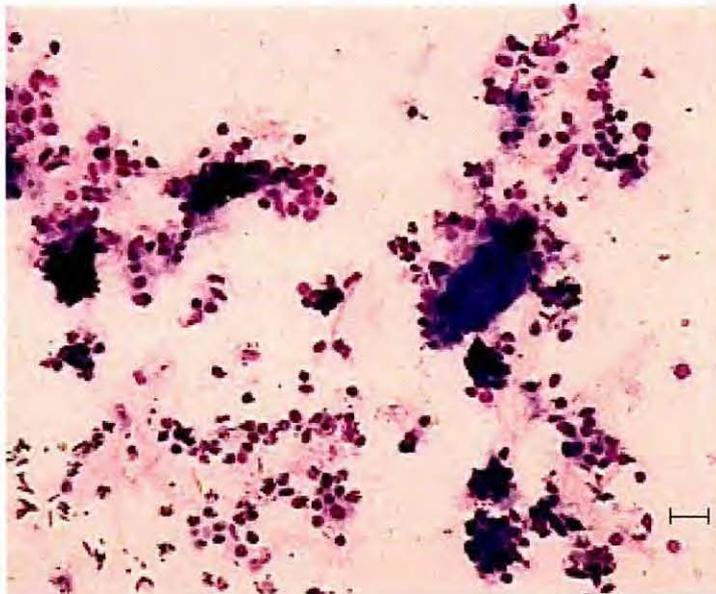


Figure 8: Coquilles et noyaux interphasiques de larves de 24 heures d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 9 µm.

En fonction de ces résultats, un essai intermédiaire entre 6 heures et 24 heures aurait été souhaitable mais pour des problèmes de logistique il n'a pas pu être réalisé.

4. Discussion

L'étude de l'aneuploïdie sur des embryons ou des larves par rapport à celle sur du naissain ou des adultes présente la difficulté supplémentaire de devoir établir un protocole sur un ensemble d'animaux qui ne sont peut-être pas tous au même stade. En effet, comme l'a décrit Dixon (1982) lors de son étude sur des embryons de 4 heures (2 heures de colchicine à 0,01%) de *Mytilus edulis*, une large proportion des noyaux étaient en métaphase mais, dû au manque de synchronisation dans la population d'embryons, l'étendue de chromosomes traités avec de la colchicine présentait différents degrés de condensation de chromatine. Au niveau des embryons et des larves, les chromosomes sont plus condensés et plus comptables avec un traitement plus long de colchicine (1 heure) par rapport à ceux qui ont eu un traitement de 30 minutes où les chromosomes sont très allongés (Rodríguez-Romero *et al.*, 1991). Le comptage du nombre de chromosomes se fait toujours à partir de métaphases bien étendues (Li *et al.*, 2000) et sans artefact de la technique (Yang *et al.*, 2000). Certains auteurs ne

comptent qu'une seule métaphase par embryon (Guo *et al.*, 1992; Dixon, 1982) et les embryons avec plus d'une métaphase comptable sont rares (Guo *et al.*, 1992). Xu *et al.* (2001), dans leur étude chez *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*, obtiennent 4 à 10 métaphases comptables par lame. Komaru et Wada (1994), chez *Pinctada fucata martensii* comptent les chromosomes sur 5 métaphases par lame.

Le nombre de métaphases étudiées par lame est donc très faible. La probabilité d'estimer correctement l'aneuploïdie en utilisant un faible nombre de métaphases est donc considérablement réduite. D'autres auteurs ont observé un plus grand nombre de métaphases (entre 70 et 100) mais le nombre de lames utilisé n'est pas précisé (Wada *et al.*, 1990; Martínez-Expósito *et al.*, 1994).

Cette étude n'a donc pas pu être réalisée pour connaître l'impact de l'atrazine sur la descendance de populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* à des stades embryonnaires et larvaires. En effet, malgré les différents essais qui ont été établis au niveau embryonnaire ou larvaire, la quantité de matériel et la dispersion chromosomique dans les métaphases ont toujours été insuffisantes pour étudier l'aneuploïdie. L'étude, au stade naissant, de la descendance de ces populations soumises à différentes concentrations d'atrazine sera cependant poursuivie ultérieurement au sein du laboratoire.

Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître
creuse *Crassostrea gigas*: étude
expérimentale sur une population
en milieu contrôlé

1. Introduction

Des anomalies cytogénétiques, telles que l'aneuploïdie, sont connues pour être communes chez les bivalves (Ahmed et Sparks, 1970; Dixon, 1982; Thiriot-Quévieux, 1986; Martínez-Expósito *et al.*, 1992; Cornet, 1993; Li et Havenhand, 1997). Ce phénomène, qui a pour origine principalement une non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose (Bond et Chandley, 1983; Martin et Rademaker, 1990), est souvent léthal chez les animaux supérieurs tels que les mammifères ou bien associé à un retard de croissance (Vig et Sandberg, 1987). L'espèce *Crassostrea gigas* qui possède un nombre diploïde de 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967; Thiriot-Quévieux, 1984) est très importante d'un point de vue économique dans le bassin de Marennes-Oléron. Cette espèce est particulièrement sensible aux facteurs d'agression tels que des polluants chimiques. Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988, 1992; Leitão *et al.*, 2001b) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). Une meilleure compréhension de ce phénomène est nécessaire. Une base génétique a été mise en évidence (Leitão *et al.*, 2001a). Par contre, nous ne savons pas si certains facteurs environnementaux (tels qu'un polluant) peuvent entraîner un effet sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres adultes ou juvéniles.

Ces dernières années, la production et l'utilisation des pesticides ont fortement augmenté, du fait de leur utilisation intensive en agriculture. En effet, en France, les pesticides sont employés à 90% en agriculture et leur utilisation apparaît être très bénéfique pour les cultures céréalières et en particulier celle du maïs. Cependant, l'utilisation de substances de synthèse telles que les pesticides pose des problèmes en matière de santé publique et de dommages sur les écosystèmes naturels. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être a priori considéré comme étant inoffensif. Les préoccupations concernant les effets des pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de très nombreux organismes. En effet, ces produits phytosanitaires, et en particulier l'atrazine (herbicide de la famille des triazines), sont susceptibles d'être transportés vers le milieu aquatique par lessivage et érosion des sols. Leur quantité dans le milieu dépend des événements pluvieux et de leur intensité ainsi que des périodes de traitement des cultures. Toutefois, ces pesticides sont présents en dehors de la période d'épandage donc leur transport vers le milieu aquatique est fonction de leur mobilité et de leur persistance dans les sols (Munschy, 1995). Même s'ils se trouvent fortement dispersés dans ce milieu, ils peuvent provoquer des effets létaux ou sublétaux.

Ainsi, Robert *et al.* (1986) ont révélé la toxicité de l'atrazine sur la formation et la croissance de jeunes larves de *Crassostrea gigas*. De plus, Moraga et Tanguy (2000) ont montré que l'atrazine cause un taux de mortalité approximativement de 60 à 70% à des concentrations de 0,1 et 0,2 mg.l⁻¹ après deux mois d'exposition. La pollution peut avoir des conséquences sur le matériel génétique, visibles au niveau des chromosomes sous forme structurelle ou numérique (aneuploïdie). Le but de notre étude est de déterminer l'éventuel effet toxique direct de l'atrazine sur une population d'huîtres creuses en milieu contrôlé.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Origine des huîtres étudiées

Des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, âgées d'environ 3 ans et demi, provenant de Bretagne et étant en claire sur le bassin de Marennes-Oléron ont été placées dans le conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade. Du naissain, provenant

d'un croisement réalisé au laboratoire le 5 février 2001 a été mis dans les mêmes conditions que les huîtres adultes (Figure 1). Le croisement qui a permis la production de ce naissain a été effectué à partir d'individus matures (24 femelles et 6 mâles) provenant d'un captage réalisé dans la Seudre.



Figure 1: Huîtres creuses *Crassostrea gigas* aux stades adulte et naissain placées dans des bacs du conservatoire de souches du laboratoire IFREMER de La Tremblade.

2.2. Protocole expérimental

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

L'atrazine a été fournie par l'INRA de St-Laurent-de-la-Prée avec une concentration de 500 g/l. Le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas, au laboratoire de l'U. R. Qualité des eaux, a réalisé régulièrement des analyses d'atrazine et de ses produits de dégradation à partir de prélèvements d'eau de chaque lot tout au long de l'expérience (Annexe 1). Pour chaque bac, un litre d'eau a été prélevé (à diverses périodes) et homogénéisé, le pH et la conductivité ont été mesurés. L'eau a ensuite été filtrée puis le pH ajusté à 7 sur une aliquote de 200 ml. Celle-ci a été extraite sur cartouches en silice greffée C18, puis la cartouche a été séchée sous courant d'azote, et éluée avec 3 ml d'acétonitrile. L'éluat a été évaporé à sec sous azote et le résidu a ensuite été repris avec un mélange acétonitrile/eau (20/80), puis injecté pour analyse sur HPLC muni d'un détecteur UV à barrettes de diodes. La détection des composés a été effectuée à 220 nm.

Chaque bac contenait 157 litres d'eau de mer. Cette eau, ainsi que l'atrazine étaient renouvelées chaque jour. Les bacs ainsi que les filtres biologiques étaient vidés puis remplis

en eau chaude ($19,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). 157ml d'atrazine à 10 mg/l et à 100 mg/l dilués dans 5 litres d'eau de mer étaient rajoutés dans les lots 2A, 2B et 3A, 3B respectivement. Les huîtres ont été nourries quotidiennement avec pour chaque lot: 8 litres d'*Isochrysis galbana* à 6.10^6 cellules/ml et 3,5 litres de *Tetraselmis suecica* à $1,5.10^6$ cellules/ml (Figure 2).

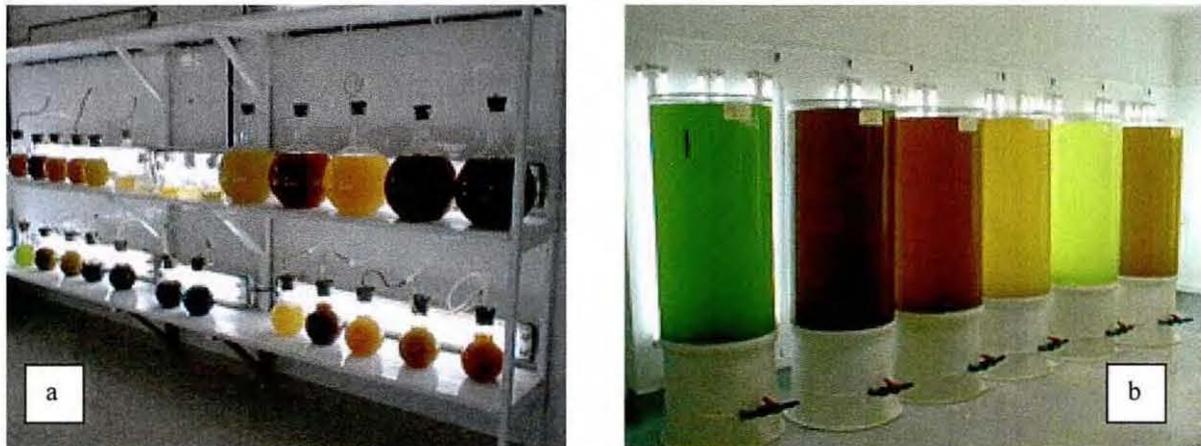


Figure 2: Salles de production du phytoplancton. a: ballons de 2 et 10 litres. b: cuves de 300 litres.

2.3. Fécondations

Pour chacun des 6 lots, des fécondations ont été réalisées à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Les gamètes de chaque animal mature ont été observés au microscope afin de choisir 6 mâles et 6 femelles ayant la meilleure activité reproductrice. Les gonades de chaque individu ont été scarifiées afin de récupérer les gamètes dans des béchers. Les gamètes ont ensuite été filtrés. Les gamètes mâles (Figure 3) ont été dilués avec de l'éosine puis placés sur une cellule de Thoma avant d'être dénombrés. Les gamètes femelles (Figure 4) ont également été dénombrés après avoir été disposés sur des cellules de Mallasez. Les fécondations ont eu lieu dans des béchers en verre d'un litre contenant, pour chaque lot, de l'eau de mer filtrée, 3 millions d'ovocytes et 600 millions de spermatozoïdes. Des réplicats de chaque lot ont été réalisés. Le développement s'est poursuivi dans des jarres de 30 l en salle d'élevage larvaire (Figure 5). Les croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été identifiés lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 respectivement et leurs réplicats: lots 7, 8, 9, 10, 11 et 12 respectivement.

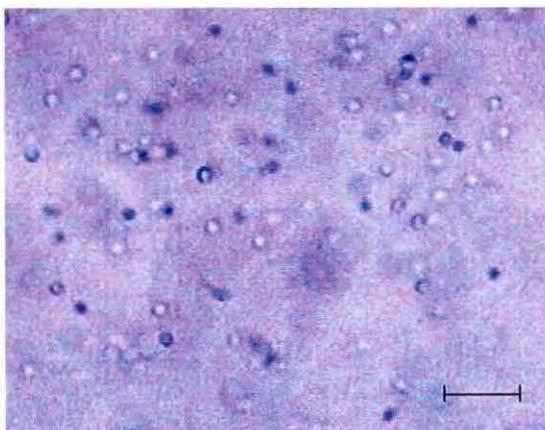


Figure 3: Spermatozoïdes d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 11 μm .

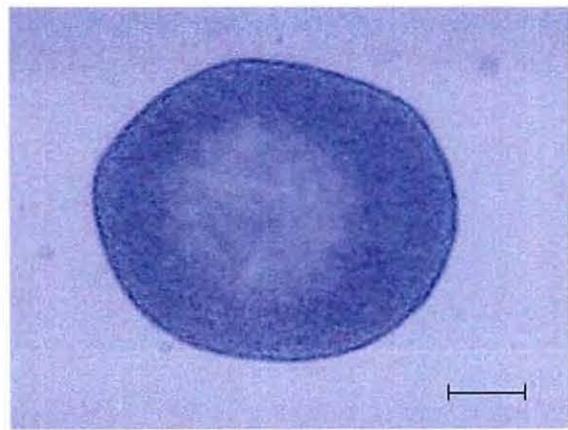


Figure 4: Ovocyte d'huîtres *Crassostrea gigas*. Echelle = 11 μm .



Figure 5: Salle d'élevage larvaire avec les 12 lots étudiés.

2.4. Elevage larvaire

Trois fois par semaine, les larves ont été filtrées sur des tamis variant en fonction de leur taille, leur densité a été évaluée par comptage au microscope optique et leur croissance a été étudiée en mesurant la taille de 50 larves par lot en moyenne à partir d'un programme d'analyse d'images. Chaque jour, chaque lot a été nourri avec un mélange de trois phytoflagellés *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* et *Tetraselmis suecica* et une diatomée *Chaetoceros calcitrans* avec des concentrations de 25, 10, 2 et 25 cellules/ μ l respectivement. Le mélange de ces 4 espèces favorise la croissance et augmente le taux de survie. Au bout de 22 ou 24 jours, les larves retenues sur un tamis de 220 μ m ont été placées en micronurserie afin de permettre leur fixation (Figure 6). Les larves ont été disposées sur des tamis de 150 μ m avec du sable (les grains de sable ont à peu près la taille des larves permettant ainsi la fixation d'une seule larve par grain de sable).

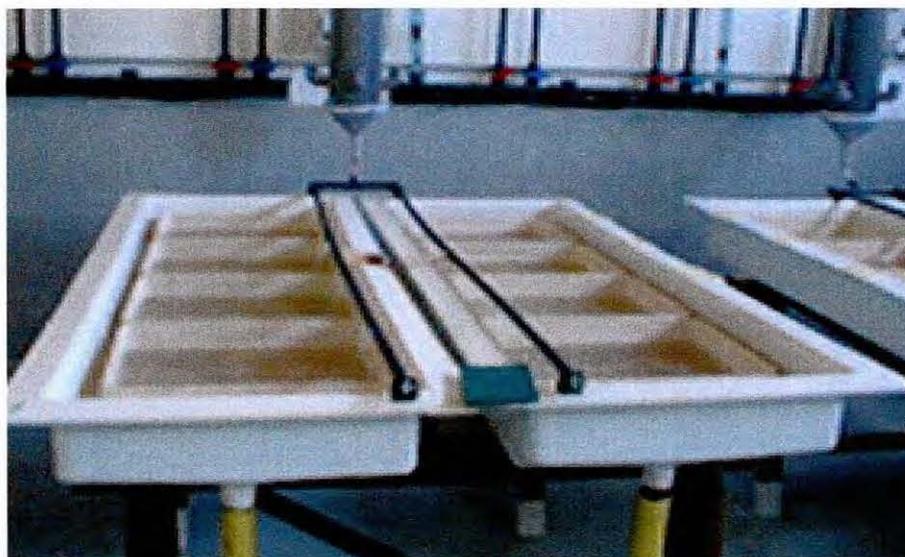


Figure 6: Bacs contenant des larves de *Crassostrea gigas* placées en micronurserie sur des tamis de 150 μ m.

2.5. Etude de l'aneuploïdie

2.5.1. Préparations chromosomiques

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

Arrêt des cellules en métaphase

Afin d'étudier l'aneuploïdie, les animaux ont tout d'abord été incubés dans une solution de colchicine diluée dans de l'eau de mer à 0,005%. La colchicine est un alcaloïde qui détruit la tubuline inhibant ainsi la formation des fibres du fuseau achromatique auxquelles se fixent les centromères de chaque chromosome et empêchant de cette façon l'ascension anaphasique. La colchicine permet donc le blocage en métaphase des mitoses. Le temps d'action de la colchicine 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 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 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 une branchie ou à un morceau de branchie selon la taille 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 été séchées à l'air.

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.

2.5.2. Analyse des données

Le pourcentage d'aneuploïdie a été estimé en comptant 30 métaphases (directement au microscope optique Olympus à l'objectif 40) choisies au hasard par individu montrant un étalement chromosomique similaire. Tout le comptage a été effectué par un seul observateur pour éliminer un éventuel biais dans l'obtention des résultats lié à l'utilisation de plusieurs observateurs. Nous avons considéré comme aneuploïdes les cellules présentant $2n=19$, 18 ou 17 chromosomes. Pour chaque lot, 10 individus ont été étudiés. 30 métaphases par individu représente le nombre statistique minimal habituellement accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984). Dans notre étude, la probabilité

que les cellules aneuploïdes soient le résultat d'artefacts de la méthode de suspension cellulaire est réduite par le nombre élevé de métaphases. 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 d'atrazine et réplicats) sur SYSTAT 9.0. (Wilkinson, 1990). La mortalité des huîtres et le taux d'éclosion ont été analysés avec un test G (Sherrer, 1984; Sokal et Rohlf, 1995). La croissance larvaire a été étudiée statistiquement à l'aide d'un test F de Fisher-Snedecor (Legendre et Legendre, 1998).

3. Résultats

3.1. Action de l'atrazine sur les mortalités des huîtres *Crassostrea gigas* adultes

Les mortalités ont été peu importantes tout au long de l'expérience. Elles ont varié entre 5,33% et 11,33% selon les lots (lots 1, 2 et 3: 0; 0,01 et 0,1 mg/l d'atrazine respectivement) (Annexe 2, Figure 7). Un test G a permis de mettre en évidence que la différence entre lots n'était pas statistiquement significative. Le test de conformité (test du χ^2) nous a permis d'admettre que les lots étudiés ont été prélevés dans une même population homogène ne présentant pas de différence significative en ce qui concerne leurs taux respectifs de mortalité. Le test t de student pour une comparaison de pourcentage a montré que toutes les valeurs de t étaient inférieures à la valeur critique (valeur de t la plus élevée: 1,93).

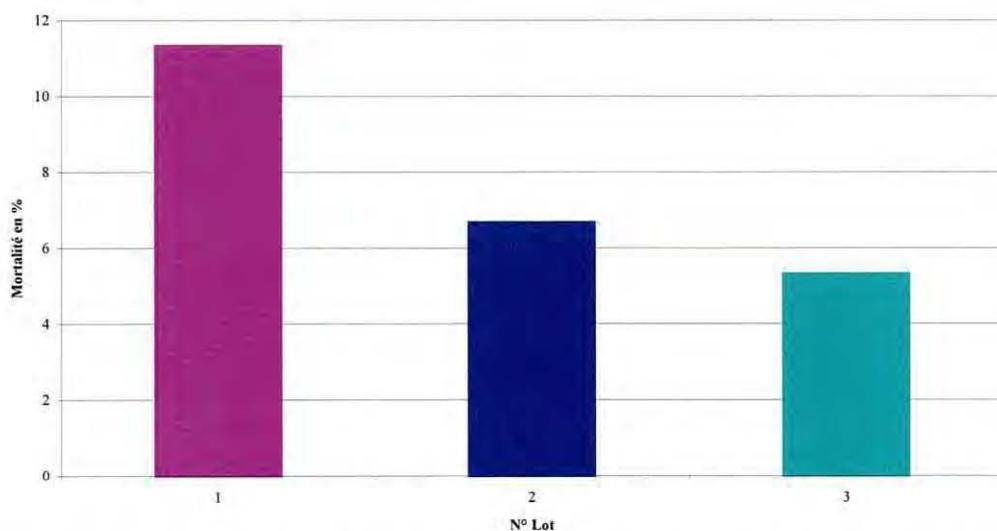


Figure 7: Taux de mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* adultes en fonction du lot: lot 1 (0 mg/l), lot 2 (0,01 mg/l) et lot 3 (0,1 mg/l).

3.2. Action de l'atrazine sur le matériel génétique des huîtres *Crassostrea gigas* adultes

Bien que l'huître *Crassostrea gigas* ait un nombre diploïde normal de 20 chromosomes (Figure 8) (Ahmed et Sparks, 1967), des cellules hypodiploïdes de $2n = 19$ (Figure 9), 18 (Figure 10) ou 17 (Figure 11) chromosomes ont été observées dans tous les lots étudiés (Annexe 3). Donc, 1, 2 ou 3 chromosomes ont été perdus parmi les 10 paires de chromosomes métacentriques qui constituent le caryotype de cette espèce (Figure 12).

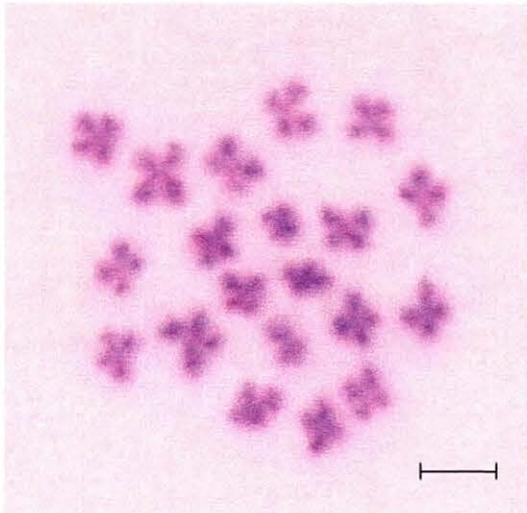


Figure 8: Métaphase avec $2n = 20$ chromosomes de *Crassostrea gigas*. Echelle = 5 μm .

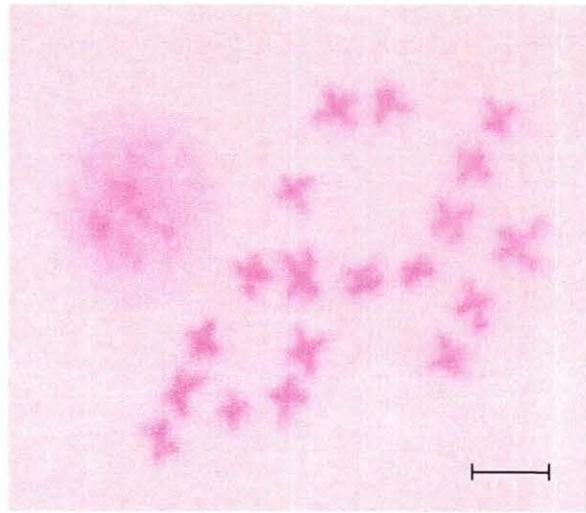


Figure 9: Métaphase avec $2n = 19$ chromosomes de *Crassostrea gigas*. Echelle = 5 μm .

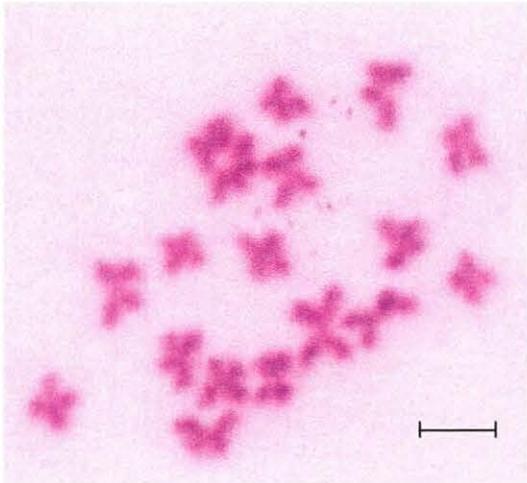


Figure 10: Métaphase avec $2n = 18$ chromosomes de *Crassostrea gigas*. Echelle = 5 μm .

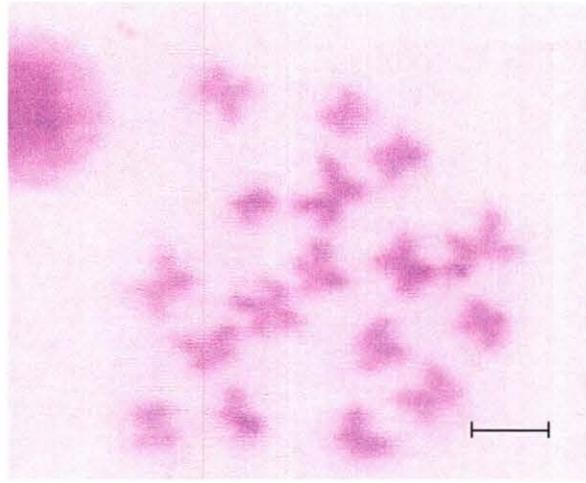


Figure 11: Métaphase avec $2n = 17$ chromosomes de *Crassostrea gigas*. Echelle = 5 μm .

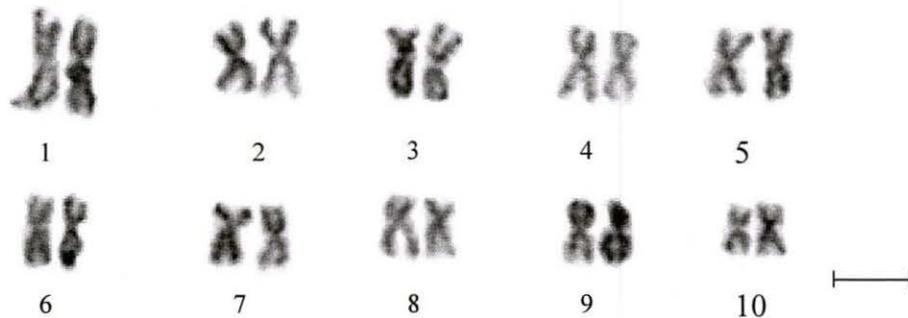


Figure 12: Caryotype de *Crassostrea gigas* ($2n = 20$) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. Echelle = 5 μm .

Les lots qui ont été soumis à différentes concentrations d'atrazine ont montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que les lots témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots 1 (A et B, témoins), 2 (A et B, 0,01 mg/l) et 3 (A et B, 0,1 mg/l) varient de 7 à 10%, 14,67 à 18% et 19,33 à 21% respectivement (Figure 13). Des analyses statistiques ont révélé que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ($F = 0,089$; $P = 0,766$) mais qu'il était significativement différent entre les trois lots étudiés ($F = 9,458$; $P < 0,001$).

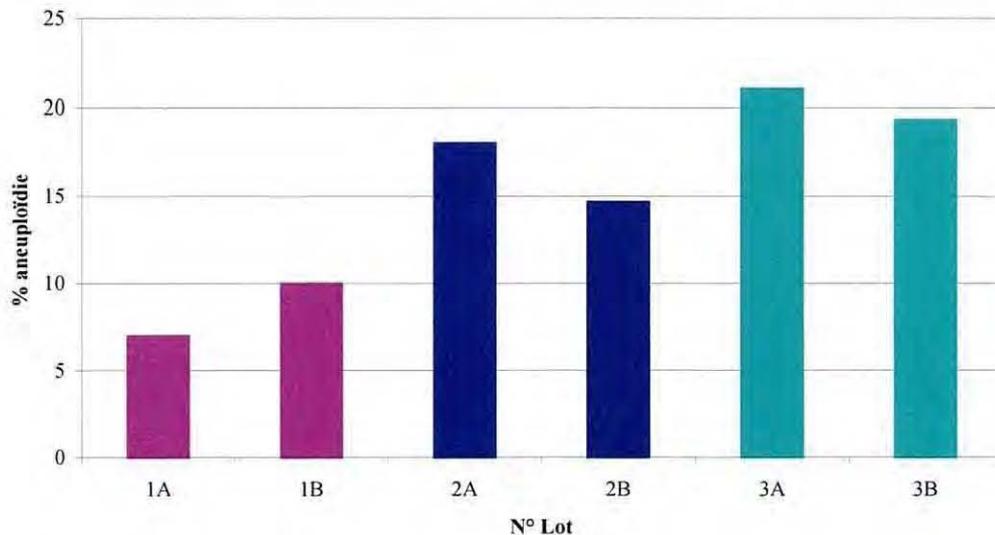


Figure 13: Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes en fonction du lot: lots 1A, 1B (0 mg/l), lots 2A, 2B (0,01 mg/l) et lots 3A, 3B (0,1 mg/l).

3.3. Action de l'atrazine sur le matériel génétique du naissain de *Crassostrea gigas*

L'évaluation de l'aneuploïdie sur le naissain n'a malheureusement pas pu être menée à terme au cours de cette étude. En effet, le protocole d'étude de l'aneuploïdie a été réalisé deux fois sur le naissain mais celui-ci avait une très petite taille. Lors de la première expérience la moyenne des poids des 6 lots de naissain était de 0,16921 g et de 0,22042 g lors de la seconde. Les branchies étaient donc trop petites et les lames présentaient un faible nombre de métaphases dû probablement à une quantité de matériel insuffisante. Etant donné que sur les 10 individus par lot, les 30 métaphases nécessaires à une étude de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981; Wenger *et al.*, 1984) n'étaient pas souvent observées, l'étude de l'aneuploïdie sur le naissain soumis à différentes concentrations d'atrazine n'a pas pu être réalisée mais elle le sera ultérieurement au sein du laboratoire.

3.4. Action de l'atrazine sur la descendance d'une population d'huîtres *Crassostrea gigas*

3.4.1. Action sur le taux d'éclosion

Les lots où les géniteurs ont été exposés à de l'atrazine ont montré un taux d'éclosion plus faible que les lots témoins. En effet, les taux d'éclosion dans les lots où les géniteurs ont été exposés à 0, 0,01 et 0,1 mg/l d'atrazine sont de 74,25%, 62,1% et 55,5% respectivement (Annexe 4, Figure 14). Un test G a permis de mettre en évidence qu'il existe une différence très significative entre les 3 lots. Les valeurs de t entre les trois lots ont été calculées et elles sont toutes beaucoup plus élevées que la valeur critique.

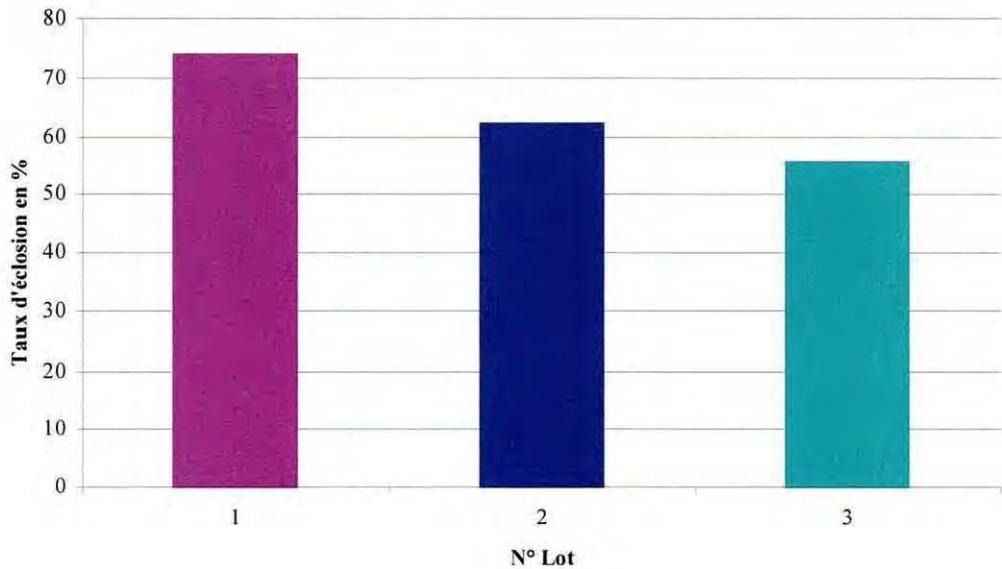


Figure 14: Taux d'éclosion en pourcentage en fonction du lot: lot 1 (0 mg/l), lot 2 (0,01 mg/l) et lot 3 (0,1 mg/l).

3.4.2. Action sur la croissance larvaire

Un test F de Fisher-Snedecor a permis d'établir que les différentes séries de croissance sont corrélées et qu'elles obéissent donc à une même loi de croissance (Annexe 5, Figure 15). Le calcul des coefficients de corrélation (R) entre les différentes séries de mesures des croissances des 3 lots (0; 0,01 et 0,1 mg/l) a été effectué. La plus forte valeur de R était de 0,9925.

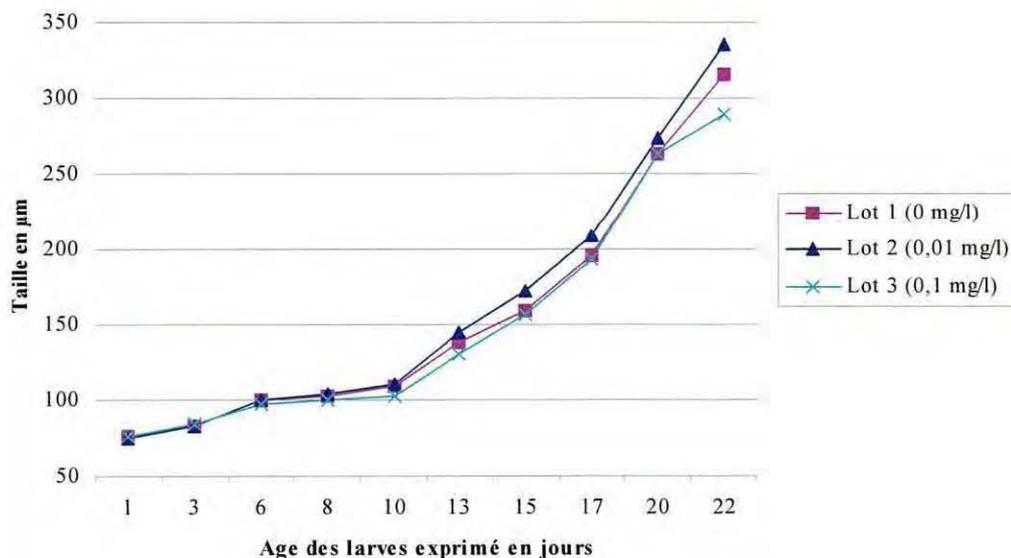


Figure 15: Taille des larves en µm en fonction de leur âge exprimé en jours et en fonction du lot.

4. Discussion

Dans notre étude, il est apparu que l'atrazine n'a pas d'effet significatif sur la mortalité observée au sein de la population de *Crassostrea gigas*. En effet, pour les 3 lots étudiés, les pourcentages de mortalité obtenus ont été très faibles. Le lot avec la concentration la plus élevée d'atrazine (0,1 mg/l représentant une valeur dix fois supérieure à la valeur pic trouvée dans le milieu) a montré un faible taux de mortalité (5,33%) malgré un temps d'exposition de 51 jours. Ce résultat est en contradiction avec celui de Moraga et Tanguy (2000) qui ont observé un taux de mortalité de 60% à une concentration de 0,1 mg/l après deux mois d'exposition. Les différents résultats obtenus entre notre étude et celle de Moraga et Tanguy (2000) peuvent être dus à des différences dans les méthodologies, source et pureté de l'atrazine utilisée.

Cependant, l'atrazine a montré un effet sur le taux d'aneuploïdie chez les huîtres *Crassostrea gigas* adultes ici étudiées. En effet, le taux d'aneuploïdie évalué pour chaque lot a augmenté avec la concentration d'atrazine. De plus, même à une concentration de 0,01 mg/l (valeur pic observée dans le milieu), une augmentation significative du pourcentage d'aneuploïdie a été observée par rapport aux lots témoins (sans atrazine). Donc une relation positive atrazine-aneuploïdie a été mise en évidence.

Les résultats obtenus dans cette étude sont particulièrement importants étant donné que le bassin de Marennes-Oléron est un centre de production, d'élevage et de commercialisation de l'huître creuse *Crassostrea gigas* très important d'un point de vue économique. La juxtaposition des activités agricoles et aquacoles, toutes deux utilisatrices des ressources en eau douce a suscité l'inquiétude des conchyliculteurs, par crainte d'une dégradation de la qualité des eaux du bassin. En général, les traitements phytosanitaires débutent dans le cas de l'atrazine dès le mois d'avril et jusqu'en juillet. En juin 1993, le canal du Grand-Garçon à Brouage présentait une concentration élevée en atrazine de 7787 ng/l (Munsch, 1995). Cette concentration est proche de celle testée ici dans le lot intermédiaire. Les concentrations en atrazine sont plus élevées en période de traitement des cultures mais ce contaminant est aussi présent en dehors des périodes d'épandage donc il est persistant dans l'environnement.

Nos résultats ont montré l'impact de ce facteur environnemental (atrazine) sur le matériel génétique de l'huître *Crassostrea gigas*. Ces résultats sont donc très importants pour la conchyliculture de la région d'autant plus que le lien entre environnement et aneuploïdie est encore très peu étudié chez les bivalves. En effet, seuls 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 les 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 causes de l'aneuploïdie ne sont pas encore très claires. Toutefois, chez les humains et chez les plantes, des facteurs génétiques sont impliqués dans l'origine de l'aneuploïdie (Bond et Chandley, 1983; Verma, 1990). L'hypothèse de l'existence d'une base génétique pour le contrôle du taux d'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* a été émise car des différences significatives d'aneuploïdie ont été observées parmi différentes familles ayant le même âge, élevées dans les mêmes conditions et où les individus échantillonnés avaient le même poids (Leitão *et al.*, 2001a). Pourtant, l'effet de l'environnement sur le taux d'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* restait à montrer. Notre étude nous a permis pour la première fois de mettre en évidence une cause environnementale pour ce phénomène.

Il a été mis en évidence que la perte de chromosomes dans les cellules somatiques de juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est associée avec un taux de croissance faible (Leitão *et al.*, 2001b). 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 des huîtres *Crassostrea gigas*. Le bassin de Marennes-Oléron a une production avec une croissance de plus en plus faible due à de fortes densités d'huîtres mais en fait, des polluants chimiques (dont l'atrazine) pourraient aussi en être responsables en partie.

Les descendances d'huîtres *Crassostrea gigas* soumises aux différentes concentrations d'atrazine ont montré une croissance larvaire identique à celle des lots non soumis à ce contaminant. La présence d'atrazine dans le milieu où étaient les géniteurs n'a pas montré d'influence sur la croissance larvaire, par contre, elle a montré un effet sur le taux d'éclosion. Il aurait été intéressant de connaître l'effet de l'atrazine sur la croissance de larves directement exposées à ce pesticide pendant leur développement ainsi que l'incidence de l'atrazine pendant l'élevage larvaire au niveau de l'aneuploïdie. Un temps d'exposition plus long à l'atrazine aurait peut-être pu avoir des incidences sur la croissance larvaire ou bien sur la croissance du naissain.

Il serait également intéressant de voir si l'augmentation du taux d'aneuploïdie causée par l'atrazine est héréditaire. La croissance du naissain issu des croisements effectués entre les huîtres *Crassostrea gigas* soumises aux différentes concentrations d'atrazine ainsi qu'une étude de l'aneuploïdie à ce stade seront évaluées ultérieurement au sein du laboratoire.

Une étude de l'aneuploïdie sur du naissain soumis aux mêmes conditions d'atrazine que les huîtres adultes permettra de montrer une éventuelle plus grande sensibilité au stress de l'atrazine du naissain. Il serait aussi intéressant de voir si le fait de remettre des individus issus de la même population et conservés dans les mêmes conditions environnementales que les huîtres *Crassostrea gigas* étudiées dans de l'eau propre (non contaminée par l'atrazine) aurait un impact sur le taux d'aneuploïdie.

Références bibliographiques

- 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.
- Ahmed, M. & Sparks, A. K.**, 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 138: 1-13.
- Auffret, M. & Oubella, R.**, 1997. Hemocyte Aggregation in the Oyster *Crassostrea gigas*: *In Vitro* Measurement and Experimental Modulation by Xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 118A, No. 3: 705-712.
- Beaumont, A. R. & Gruffydd, T. T.**, 1974. Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 54: 713-718.
- Bignami, M., Morpurgo, G., Pagliani, R., Carere, A., Conti, G. & Di Giuseppe, G.**, 1974. Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. Mutation Res. 26: 159-170.
- Biradar, D. P. & Rayburn, A. L.**, 1995. Flow Cytogenetic Analysis of Whole Cell Clastogenicity of Herbicides Found in Groundwater. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28: 13-17.
- Bond, D. J. & Chandley, A. C.**, 1983. Aneuploidy. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Brusick, D. J.**, 1994. An assesment of the genetic toxicity of atrazine: relevance to human health and environmental effects. Mutation Res. 317: 133-144.
- Coirault, S.**, 1999. Etude de configuration d'un réseau régional de surveillance de la qualité des eaux vis-à-vis des produits phytosanitaires. Tome I. Rapport d'étude.
- Collet, M.**, 1988. Evaluation des transferts existants ou potentiels de produits phytosanitaires utilisés en agriculture vers le milieu marin. Rapport IFREMER, DERO-88-04-EL, 30 pages + annexes.
- Cornet, M.**, 1993. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). Experientia 49: 87-90.
- Dearfield, K. L., Frank Stack, H., Quest, J. A., Whiting, R. J. & Waters, M. D.**, 1993. A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity: I. Introduction and first ten chemicals. Mutation Res. 297: 197-233.
- De Noyelles, F., Kettle, W. D. & Sinn, D. E.**, 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. Ecology 63 (5): 1285-1293.
- 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.
- Griffiths, A. J. F.**, 1979. *Neurospora* prototroph selection system for studying aneuploid production. Environ. Health Perspect. 31: 75-80.
- Gunkel, G. & Streit, B.**, 1980. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis* Müll.) and a fish (*Coregonus fera* Jurine). Water Research, Vol. 14: 1573-1584.
- Guo, X. & Allen, S. K. Jr.**, 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3 (1): 42-50.
- 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.

- Hagmar, L. & al.**, 1994. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes - nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54: 2919-2922.
- Hall, L. W., Ziegenfuss, M. C., Anderson, R. D., Spittler, T. D. & Leichtweis, H. C.**, 1994. Influence of salinity on atrazine toxicity to a Chesapeake Bay copepod (*Eurytemora affinis*) and fish (*Cyprinodon variegatus*). *Estuaries* 17, 1B: 181-186.
- His, E. & Robert, R.**, 1986. Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Halictis* 15: 301-308.
- Huber, N.**, 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol. and Chem.* 12: 1865-1881.
- Jones, T. W., Kemp, W. M., Stevenson, J. C. & Means, J. C.**, 1982. Degradation of atrazine in estuarine water/sediment systems and soils. *J. Environ. Qual.* 11, 4: 632-638.
- Kligerman, A. D., Doerr, C. L., Tennant, A. H. & Zucker, R. M.**, 2000. Cytogenetic studies of three triazine herbicides I. *In Vitro* studies. *Mutation Research* 465: 53-59.
- Komaru, A. & Wada, K. T.**, 1985. Karyotype of the Japanese Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii*, Observed in the Trochophore Larvae. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 7: 105-107.
- 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., Thiriot, C., McCombie, H., Heurtebise, S., Boudry, P., Robert, S., Soletchnik, P., Gouletquer, P. & Gérard, A.**, 1999. Etude du niveau d'aneuploïdie dans les populations des zones de captage du bassin de Marennes-Oléron. Contrat Région Poitou-Charentes 1999. Convention 99 RPC-A-201 « Génétique ». 39 pp.
- Legendre, P. & Legendre, L.**, 1998. Numerical ecology. Elsevier Science B. V., Amsterdam. 853 pp.
- Lehotay, S. J., Harman-Fetcho, J. A. & McConnell, L. L.**, 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 37, Nos 1-2: 32-44.
- Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources*, sous presse.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193: 39-48.
- 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* 66: 91-96.
- Li, X. X. & Havenhand, J. N.**, 1997. Karyotype, nucleous organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Marine Biology* 127: 443-448.
- Lioi, M. B., Scarfi, M. R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Berardino, D. & Ursini, M. V.**, 1998. Cytogenetic Damage and Induction of Pro-Oxidant State in Human Lymphocytes Exposed *In Vitro* to Glyphosate, Vinclozolin, Atrazine, and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32: 39-46.
- Longwell, A. C., Stiles, S. S. & Smith, D. G.**, 1967. Chromosome complement of the american oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. *Can. J. Gen. Cyt.* 9: 845-856.
- Loosli, R.**, 1995. Epidemiology of Atrazine, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 47-57.

- Loprieno, N., Barale, R., Mariani, L., Presciuttini, S., Rossi, A. M., Sbrana, L. & Zaccaro, A.**, 1980. Results of mutagenicity tests on the herbicide atrazine. *Mut. Res.* 74: 250.
- Martin, R. H. & Rademaker, A.**, 1990. The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet. Cell Genet.* 53: 103-107.
- Martínez-Expósito, M. J., Martínez-Lage, A. A., Pasantes, J. J. & Méndez, J.**, 1992. A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. *Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos* 6: 49-55.
- Martínez-Expósito, M. J., Pasantes, J. J. & Méndez, J.**, 1994. NOR activity in larval and juvenile mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 155-165.
- Martínez-Lage, A., González-Tizón, 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.
- Means, J. C., Wijayarathne, R. D. & Boynton, W. R.**, 1983. Fate and transport of selected herbicides in an estuarine environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40 (2): 337-345.
- 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: 706-711.
- Muñoz, I. & Rosés, N.**, 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). *Wat. Res.*, Vol. 34, No. 10: 2846-2848.
- Munsch, C.**, 1995. Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de doctorat de l'université Paris 6.
- Murnik, M. R. & Nash, C. L.**, 1977. Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health* 3: 691-697.
- Plewa, M. J., Wagner, E. D., Gentile, G. J. & Gentile, J. M.**, 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutation Res.* 136: 233-245.
- Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N. & Marcos, R.**, 1998. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutation Research* 416: 93-99.
- Robert, R., His, E. & Maurer, D.**, 1986. Toxicité d'un desherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis* 15: 319-325.
- Rodríguez-Romero, F., Gasca-Montes de Oca, M. & Rosa-Vélez, J.**, 1991. Un metodo citogenetico para la obtencion de cromosomas para estudios de bandeo y de morfologia fina de los cariotipos de moluscos bivalvos de la familia Ostreidae. *Ciencias Marinas*, Vol. 17, No. 4: 1-10.
- Rosés, N., Poquet, M. & Muñoz, I.**, 1999. Behavioural and Histological Effects of Atrazine on Freshwater Molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). *J. Appl. Toxicol.* 19: 351-356.
- Savage, J. R. K.**, 1993. Update on target theory as applied to chromosome aberrations. *Envir. Mol. Mutagen.* 22: 198-207.
- Scherrer, B.**, 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin, Montréal.
- Smith, A. E., Muir, D. C. G. & Grover, R.**, 1982. The triazine herbicides. Dans "Analysis of pesticides in water", Vol. III, Chau, A.S., Afghan, B.K., CRC Press: 213-239.

- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J.**, 1995. Biometry. W. H. Freeman & Company, New York.
- 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.
- Steinert, S. A., Streib-Montee, R., Leather, J. M. & Chadwick, D. B.**, 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Res.* 399: 65-85.
- Stevens, J. T. & Sumner, D. D.**, 1991. Herbicides, dans: Hayes, W. J., Jr., Laws, E. R., Jr. (Eds), *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, San Diego, USA: 1317-1408.
- Streit, B.**, 1979. Uptake, accumulation, and release of organic pesticides by benthic invertebrates. 3. Distribution of [¹⁴C]-atrazine and [¹⁴C]-lindane in an experimental 3-step food chain microcosm. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 55: 373-400.
- Taets, C., Aref, S. & Rayburn, A. L.**, 1998. The Clastogenic Potential of Triazine Herbicide Combinations Found in Potable Water Supplies. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 106, No. 4: 197-201.
- Thiriot-Quévrevex, C.**, 1984. Les caryotypes de quelques Ostreidae et Mytilidae. *Malacologia* 25 (2): 465-475.
- Thiriot-Quévrevex, C.**, 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231.
- Thiriot-Quévrevex, C. & Ayraud, N.**, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 70: 165-172.
- Thiriot-Quévrevex, 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-Quévrevex, C., Pogson, G. H. & Zouros, E.**, 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45.
- Thomas, S. & Durand, G.**, 1995. Suivi des pesticides dans la rade de Brest. *Ingénieries – EAT – Spécial Rade de Brest*: 95-101.
- 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.
- Vitturi, R., Gianguzza, P., Colomba, M. S., Jensen, K. R. & Riggio, S.**, 2000. Cytogenetics in the sacoglossan *Oxynoe olivacea* (Mollusca: Opisthobranchia): karyotype, chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization. *Marine biology* 137: 577-582.
- Wada, K. T., Scarpa, J. & Allen Jr., S. K.**, 1990. Karyotype of the dwarf surfclam *Mulinia lateralis* (Say, 1822) (Mactridae, Bivalvia). *Journal of Shellfish Research*, Vol. 9, No. 2: 279-281.
- Wade, T. L., Sericano, J. L., Gardinali, P. R., Wolff, G. & Chambers, L.**, 1998. NOAA's 'Mussel Watch' Project: Current use Organic Compounds in Bivalves. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 37, Nos 1-2: 20-26.
- Wang, Z., Guo, X., Allen Jr., S. K. & 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.
- Yoder, J., Watson, M. & Benson, W. W.**, 1973. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mut. Res.* 21: 335-340.
- Zouros, E., Thiriot-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.

Annexes

Annexe 1: Résultats des analyses effectuées par le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas. Concentrations des triazines exprimées en µg/l. "-": composé non détecté. e: entrée. s: sortie. Des prélèvements en entrée (donc juste après avoir versé l'atrazine) ont été effectués au départ afin de vérifier les concentrations d'atrazine versées dans le milieu. Les prélèvements suivants (à partir du 05/03/01) ont tous été effectués en sortie (un jour après l'entrée d'atrazine).

<i>Date prelev.</i>	<i>Bac n°</i>	<i>Atrazine</i>	<i>DIA</i>	<i>DEA</i>	<i>Simazine</i>
28/02/01	3e	98,03	0,02	0,03	0,62
02/03/01	1s	0,05	0,06	-	-
	2e	10,98	-	-	0,07
	3s	79,47	0,03	0,09	0,51
	3e	105,47	0,03	0,05	0,65
05/03/01	1	0,03	-	-	-
	2	11,77	0,02	-	0,08
	3	89,04	0,04	0,14	0,55
28/03/01	1	0,03	-	0,01	-
	2	8,70	-	-	-
	3	88,13	-	-	-
30/03/01	1	0,13	0,02	-	-
	2	6,08	-	-	-
	3	70,70	-	-	0,92
06/04/01	1	-	-	-	-
	2	9,94	-	0,02	-
	3	4,31	-	-	-
09/04/01	1	9,57	-	-	-
	2	8,39	-	-	-
	3	81,23	0,04	0,07	0,42
11/04/01	1	-	-	-	-
	2	8,11	-	0,04	0,08
	3	63,78	-	0,06	0,21
13/04/01	1	0,78	-	-	0,01
	2	8,87	0,03	0,03	-
	3	70,83	0,01	0,05	0,48
18/04/01	1	0,95	-	-	0,02
	2	9,35	-	0,04	0,08
	3	73,84	-	0,08	0,46
20/04/01	1	0,04	-	0,03	-
	2	7,54	-	0,04	-
	3	73,06	-	0,07	0,29
23/04/01	1	0,79	-	-	-
	2	8,28	-	0,03	-
	3	62,11	-	0,08	0,25
25/04/01	1	-	-	-	-
	2	7,25	-	-	0,07
	3	70,65	-	0,07	0,27
27/04/01	1	1,15	-	-	-
	2	8,13	-	-	-
	3	61,04	0,06	0,08	0,22
29/04/01	1	0,71	-	-	0,03
	2	8,74	-	0,04	-
	3	86,99	0,09	0,10	0,33
02/05/01	1	1,23	-	-	-
	2	9,69	-	-	-
	3	57,03	0,06	0,07	0,16
04/05/01	1	0,06	-	-	0,03
	2	9,53	-	0,02	0,05
	3	69,54	0,07	0,08	0,21
11/05/01	1	0,07	-	-	-
	2	10,09	-	0,03	-
	3	70,07	0,04	0,07	0,37
14/05/01	1	0,93	-	0,01	0,04
	2	8,73	-	0,03	-
	3	85,15	-	0,14	0,31

Annexe 2: Température des bacs et mortalité des huîtres *Crassostrea gigas* au cours de l'expérience.

Jours	Date	Lot 1A		Lot 1B		Lot 2A		Lot 2B		Lot 3A		Lot 3B		Mort/Jour
		T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	T	Mort	
	20/03/01	14,5		15,2		14		14,7		14,5		14		
	21/03/01	14,8	0	15,5	0	14	0	15	0	14,8	1	14,2	0	1
	22/03/01	14	0	15	0	13,5	1	14,3	0	14	0	13,5	0	1
	23/03/01	15	0	15,7	0	14	1	15	0	14,7	0	14,5	0	1
	24/03/01	16	0	17	0	17	0	16	0	16	0	15	0	0
	25/03/01	16	0	17	0	16	0	16	0	16	0	15	0	0
1	26/03/01	16,7	0	16,8	0	16,6	0	16,8	0	16,8	1	16,1	0	1
2	27/03/01	19,5	2	19,5	0	18,6	0	19	0	19,1	0	18,5	1	3
3	28/03/01	19,6	0	19,5	1	18,8	0	19,4	0	18,8	1	18,8	0	2
4	29/03/01	19	0	19,5	0	19,3	0	20	0	20	0	19,8	0	0
5	30/03/01	19,2	0	19,5	0	19	0	19,2	0	19	1	19	0	1
6	31/03/01	18,5	0	19,2	0	17,8	0	18,5	0	18,2	0	17,8	0	0
7	01/04/01	18,5	0	19	1	17,8	0	18,5	1	18,2	0	17,8	0	2
8	02/04/01	19,8	0	19,8	0	19,2	0	19,7	0	19,6	0	19,2	0	0
9	03/04/01	19,5	0	19,7	0	19,3	0	19,6	0	19,3	0	19,5	1	1
10	04/04/01	19,2	0	19,5	0	19,2	0	19,5	0	19	0	19	0	0
11	05/04/01	19,1	0	19,7	1	18,8	0	19,2	0	19	0	18,5	0	1
12	06/04/01	19,6	1	19,5	0	19,1	0	19,6	0	19	0	18,5	0	1
13	07/04/01	19	0	20	0	19	0	19	0	19	0	19	0	0
14	08/04/01	19	0	21	0	19	0	19	0	19	0	19	0	0
15	09/04/01	19,1	2	19,1	1	18,8	1	19	0	19,5	0	18,9	2	6
16	10/04/01	20	0	20	0	19,2	0	19,7	0	19,8	0	18,7	1	1
17	11/04/01	19,2	1	19,8	0	18,8	0	19	0	19,8	0	18,8	0	1
18	12/04/01	19,3	0	19,9	1	18,7	0	19,5	0	19,1	0	18,6	0	1
19	13/04/01	19,6	0	20	0	18,7	0	19,3	1	19,8	0	18,7	0	1
20	14/04/01	20	0	20	1	19	0	20	0	20	0	20	0	1
21	15/04/01	20	0	19,5	0	20	0	19	0	19	0	20	0	0
22	16/04/01	20	0	19	0	18,5	0	19,5	0	19	0	19	0	0
23	17/04/01	19,8	0	20	0	19,5	0	19,7	0	20	0	19,5	0	0
24	18/04/01	19	0	20	0	19	0	19,5	1	19,5	0	19,5	0	1
25	19/04/01	19	0	19,6	0	19,5	0	19,5	1	19,5	0	19	0	1
26	20/04/01	19	0	19,8	0	18,7	0	19,7	0	19,7	0	19	0	0
27	21/04/01	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	0
28	22/04/01	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	0
29	23/04/01	19,5	0	19,6	0	19	0	19,2	1	19,8	0	19,5	0	1
30	24/04/01	19,8	0	20	0	19,1	0	20	0	19,8	0	19,4	0	0
31	25/04/01	20	0	19,6	0	18,5	0	19,2	0	19	0	18,5	0	0
32	26/04/01	19,8	0	20,6	1	18,8	0	19,7	0	19,5	0	19,8	0	1
33	27/04/01	19,5	0	20	0	18,8	0	20	0	19,6	0	19,3	0	0
34	28/04/01	19,7	0	20,2	1	19,3	0	20	0	19,7	0	19,2	0	1
35	29/04/01	19,5	0	20	0	19	0	19,5	0	19,5	0	19	0	0
36	30/04/01	19	0	19,8	0	18	0	18,7	0	19	0	18,2	0	0
37	01/05/01	19,5	0	20	0	18,7	0	19,5	0	19,5	0	19	0	0
38	02/05/01	19,6	0	20	1	18,9	0	19,5	1	19,4	0	19	0	2
39	03/05/01	19	0	19,3	0	18,5	0	19	0	19,2	0	18,7	0	0
40	04/05/01	19,5	0	20	0	19	0	19,5	0	19,4	0	19	0	0
41	05/05/01	20,2	0	20,4	1	19	0	20	0	19,8	0	19	0	1
42	06/05/01	19,5	0	19,8	0	18,5	0	19,2	1	19,6	0	19	0	1
43	07/05/01	19,5	0	20,3	0	19	0	19,9	0	19,8	0	18,8	0	0
44	08/05/01	20	1	20	0	19	0	20	0	20	0	19	0	1
45	09/05/01	20	0	20,2	0	19	0	19,8	1	19,8	0	19,2	0	1
46	10/05/01	19,8	0	20	0	18,8	0	19,5	0	19,6	0	19,2	0	0
47	11/05/01	20	0	20	0	19	0	19,5	0	19,2	0	18,9	0	0
48	12/05/01	20,2	0	20,8	0	20	0	20,4	0	20,2	0	20	0	0
49	13/05/01	20	0	20,2	0	19,9	0	20,1	0	20,2	0	19,8	0	0
50	14/05/01	20	0	20,5	0	19,5	0	20	1	20	0	19,2	0	1
51	15/05/01	19,8	0	20,2	0	19,2	0	19,9	0	19,9	0	19,2	0	0
Somme			7		10		1		9		3		5	35
Mortalité en %			9,33		13,33		1,33		12		4		6,67	7,78
Moyenne			11,33		6,67		5,33							

Annexe 3: Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez les huîtres creuses *Crassostrea gigas* adultes.

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
1A	1	28	0	2	0	2	6,666666667	7	2
1A	2	28	2	0	0	2	6,666666667		1
1A	3	28	0	1	1	2	6,666666667		2
1A	4	27	2	1	0	3	10		4
1A	5	28	0	0	2	2	6,666666667		1
1A	6	29	0	1	0	1	3,333333333		1
1A	7	27	2	0	1	3	10		2
1A	8	28	2	0	0	2	6,666666667		2
1A	9	27	2	1	0	3	10		2
1A	10	29	1	0	0	1	3,333333333		2
1B	1	28	1	1	0	2	6,666666667	10	1
1B	2	28	0	1	1	2	6,666666667		2
1B	3	27	3	0	0	3	10		2
1B	4	28	1	1	0	2	6,666666667		3
1B	5	24	1	3	2	6	20		2
1B	6	24	4	2	0	6	20		1
1B	7	28	1	1	0	2	6,666666667		1
1B	8	26	1	1	2	4	13,333333333		2
1B	9	28	1	1	0	2	6,666666667		2
1B	10	29	1	0	0	1	3,333333333		1
2A	1	28	2	0	0	2	6,666666667	18	1
2A	2	25	3	2	0	5	16,666666667		2
2A	3	24	2	1	3	6	20		1
2A	4	29	0	1	0	1	3,333333333		2
2A	5	25	2	2	1	5	16,666666667		2
2A	6	22	3	5	0	8	26,666666667		1
2A	7	25	1	1	3	5	16,666666667		3
2A	8	27	1	1	1	3	10		2
2A	9	22	6	2	0	8	26,666666667		2
2A	10	19	9	1	1	11	36,666666667		1
2B	1	26	3	0	1	4	13,333333333	14,66667	1
2B	2	22	5	1	2	8	26,666666667		1
2B	3	29	1	0	0	1	3,333333333		2
2B	4	24	4	1	1	6	20		1
2B	5	27	0	1	2	3	10		1
2B	6	25	3	0	2	5	16,666666667		1
2B	7	26	3	1	0	4	13,333333333		1
2B	8	28	1	0	1	2	6,666666667		1
2B	9	24	4	1	1	6	20		1
2B	10	25	1	2	2	5	16,666666667		2

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie			Nb lames étudiées
N° Lot	N° Animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% aneuploïdie	Moyenne	
3A	1	27	2	1	0	3	10	21	1
3A	2	27	1	1	1	3	10		1
3A	3	25	2	0	3	5	16,66666667		2
3A	4	27	1	1	1	3	10		1
3A	5	28	2	0	0	2	6,666666667		1
3A	6	22	6	2	0	8	26,66666667		1
3A	7	22	5	2	1	8	26,66666667		1
3A	8	17	6	4	3	13	43,33333333		1
3A	9	16	7	6	1	14	46,66666667		2
3A	10	26	2	1	1	4	13,33333333		1
3B	1	28	1	0	1	2	6,666666667	19,33333	1
3B	2	24	4	2	0	6	20		2
3B	3	24	3	1	2	6	20		1
3B	4	26	1	2	1	4	13,33333333		2
3B	5	22	4	0	4	8	26,66666667		2
3B	6	20	5	4	1	10	33,33333333		1
3B	7	24	5	1	0	6	20		1
3B	8	25	3	0	2	5	16,66666667		1
3B	9	25	3	2	0	5	16,66666667		1
3B	10	24	2	4	0	6	20		1

Annexe 4: Taux d'éclosion des larves issues de croisements d'huîtres *Crassostrea gigas* exposées à différentes concentrations d'atrazine.

Lot	Nombre d'ovocytes	Nombre de larves à J1	Taux d'éclosion en %
1	3000000	2416000	80,53
2	3000000	2300000	76,67
3	3000000	2673000	89,10
4	3000000	1027000	34,23
5	3000000	1387000	46,23
6	3000000	1813000	60,43
7	3000000	2407000	80,23
8	3000000	1787000	59,57
9	3000000	2152000	71,73
10	3000000	1600000	53,33
11	3000000	1647000	54,90
12	3000000	1813000	60,43

Moyenne

Lot	Taux d'éclosion en %
0 mg/l	74,25
0,01 mg/l	62,1
0,1 mg/l	55,5

Annexe 5: Tailles en μm des larves en fonction des différents lots et des journées d'élevage (J). La tête de lot représente les larves retenues sur un tamis de 220 μm et la queue de lot représente les larves retenues entre 125 et 220 μm .

Lot	J1	J3	J6	J8	J10	J13	J15	J17	J20	J22 tête	J22 queue	J24 tête
1	73,84	81,33	97,08	98,60	101,42	125,73	143,74	182,76	245,95		286,63	349,49
2	76,28	81,27	98,11	103,03	114,16	145,44	170,55	201,78	274,05	349,17		342,15
3	75,13	78,55	99,19	102,82	103,12	132,49	158,54	187,09	260,92		285,91	338,95
4	75,32	82,42	95,28	99,90	100,03	129,88	161,08	183,80	234,22	347,84		344,37
5	76,48	85,00	97,97	101,48	104,63	138,30	166,81	213,27	293,49	351,31		336,35
6	74,28	84,68	97,15	99,84	103,70	141,38	173,44	215,71	303,48	359,64		348,62
7	76,27	83,12	99,73	102,27	105,86	133,85	157,31	202,27	288,31	355,33		343,88
8	77,71	87,20	104,53	107,34	113,39	143,63	162,29	195,38	247,46		270,72	336,14
9	76,09	86,28	101,49	105,91	119,47	154,17	189,94	244,15	300,68	355,65		346,16
10	75,31	83,51	100,94	106,79	120,77	162,74	177,61	220,93	298,51	351,42		349,28
11	76,50	85,03	97,51	99,03	102,48	125,05	139,61	175,42	220,26		221,66	
12	76,35	83,00	97,21	97,65	100,21	115,88	144,22	167,63	239,52		224,65	

Moyenne

Lot	J1	J3	J6	J8	J10	J13	J15	J17	J20	J22
0 mg/l	76,03	83,23	99,86	102,81	108,71	137,16	158,47	195,55	263,95	315,46
0,01 mg/l	75,46	82,69	99,23	103,85	110,85	144,82	171,79	208,99	273,58	335,21
0,1 mg/l	75,90	84,43	97,46	99,5	102,75	130,15	156,02	193,01	264,19	289,32