

**Sébastien Sabatier**

Maîtrise des Sciences de l'environnement mention Océanographie

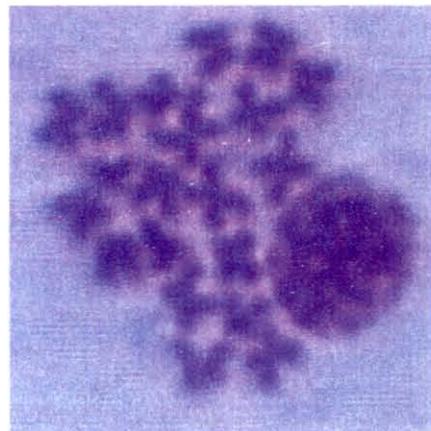


Stage effectué du 15 juin au 31 août 2001

---

**POLLUTION ET TAUX D'ANEUPLOÏDIE CHEZ L'HUÎTRE  
CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* :**

étude expérimentale sur une population en milieu contrôlé



Sous la direction de :

**Sylvie Lapègue**

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

---

# SOMMAIRE

1. Introduction.....	1
2. Matériel et Méthodes.....	4
2.1. Origine du naissain.....	4
2.2. Protocole expérimental.....	4
2.3. Etude de l'aneuploïdie.....	5
2.3.1. Arrêt des cellules en métaphase.....	5
2.3.2. Choc hypotonique.....	6
2.3.3. Fixation.....	6
2.3.4. Exécution des préparations chromosomiques.....	6
2.3.5. Coloration.....	6
2.4. Analyse de données.....	7
3. Résultats.....	9
3.1. Action de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez <i>Crassostrea gigas</i> au stade naissain.....	9
3.2. Comparaison des résultats obtenus chez <i>Crassostrea gigas</i> aux stades adulte et naissain.....	11
4. Discussion.....	13
Bibliographie.....	17

## Annexes

Annexe 1 : Protocole détaillé de la méthode de suspension cellulaire mise au point par Thiriot-Quiévreux et Ayraud (1982)

Annexe 2 : Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez *Crassostrea gigas* au stade naissain

# Introduction

Le Bassin de Marennes-Oléron est le plus grand bassin conchylicole d'Europe. L'espèce la plus exploitée est l'huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*. Du fait de son importance économique, l'huître creuse fait l'objet de nombreuses études. Par ailleurs, l'essor de l'agriculture a entraîné une utilisation croissante de pesticides, que l'on retrouve pour certains de façon importante dans le milieu naturel. Leur utilisation pose donc problème et des études concernant leurs effets sur les organismes marins sont entreprises. Dans cette perspective, une étude est menée au laboratoire Génétique et Pathologie de La Tremblade pour savoir s'il existe une relation entre le taux de cellules aneuploïdes chez *Crassostrea gigas* et la concentration d'atrazine, herbicide de la famille des triazines, très utilisé dans les cultures céréalières, notamment le maïs.

L'aneuploïdie est une anomalie cytogénétique, que l'on retrouve communément chez les bivalves (Ahmed et Sparks, 1970 ; Dixon, 1982 ; Thiriot-Quévieux, 1986 ; Martinez-Exposito *et al.*, 1992 ; Cornet, 1993 ; Li et Havenhand, 1997). Elle correspond à une réduction ou à une augmentation du nombre diploïde normal de chromosomes. C'est le plus souvent le résultat d'une non-disjonction de ceux-ci lors de la mitose ou de la méiose (Bond et Chandley, 1983). Chez les huîtres par exemple, l'aneuploïdie se traduit par des cellules comprenant  $2n = 19, 18$ , voire  $17$  chromosomes au lieu des  $20$  chromosomes observés normalement.

Des études antérieures ont montré qu'il existait une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance dans la descendance d'huîtres cultivées *Crassostrea gigas* (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitao *et al.*, 2001a) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). Il a également été émis l'hypothèse d'une base génétique pour le contrôle du taux d'aneuploïdie (Leitao *et al.*, 2001b). Cependant, aucune étude n'avait démontré si certains facteurs environnementaux (tels qu'un polluant) pouvaient entraîner un effet sur le taux d'aneuploïdie chez l'huître.

L'atrazine est un produit phytosanitaire qui possède des propriétés mutagènes (Hazardous Substances Data Bank, 1995). Il est surtout présent dans le milieu en période de traitement des cultures, mais aussi en dehors des périodes d'épandage. Du fait de leur mode de nutrition, les bivalves accumulent l'atrazine essentiellement en filtrant l'eau (Moraga et Tanguy, 2000), donc au niveau des branchies (Gunkel et Streit, 1980).

La toxicité de l'atrazine a été mise en évidence dès les premiers stades de développement. En effet, Robert *et al.* (1986) ont montré son impact sur la formation et la croissance de jeunes larves de *Crassostrea gigas*. Au-delà de 0,5 mg/l, la croissance larvaire est anormale, et à une concentration supérieure à 1 mg/l, des mortalités sont apparues. Il a également été observé une mortalité de 60 à 70 % à des concentrations de 0.1 à 0.2 mg/l après 2 mois d'exposition chez *Crassostrea gigas* adulte (Moraga et Tanguy, 2000).

De plus, Bouilly (2001) a montré qu'il existait une relation positive entre le taux d'aneuploïdie et la concentration d'atrazine, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte. La même expérience a donc été entreprise sur du naissain afin de déterminer si l'effet de l'atrazine se retrouve également à des stades plus précoces. Cet intérêt pour un stade plus précoce est motivé par l'importance du recrutement de naissain dans le bassin de Marennes-Oléron. En effet, les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron fournissent en naissain naturel plus de 90% de la production française (Gouletquer et Héral, 1981 ; figure 1). La qualité et les performances de croissance de ce naissain naturel sont donc des facteurs économiques importants. Le but de mon travail a donc été de tester l'effet direct de l'atrazine sur le taux d'aneuploïde chez *Crassostrea gigas* au stade naissain, et de comparer les données obtenues avec celles réalisées avec les adultes.

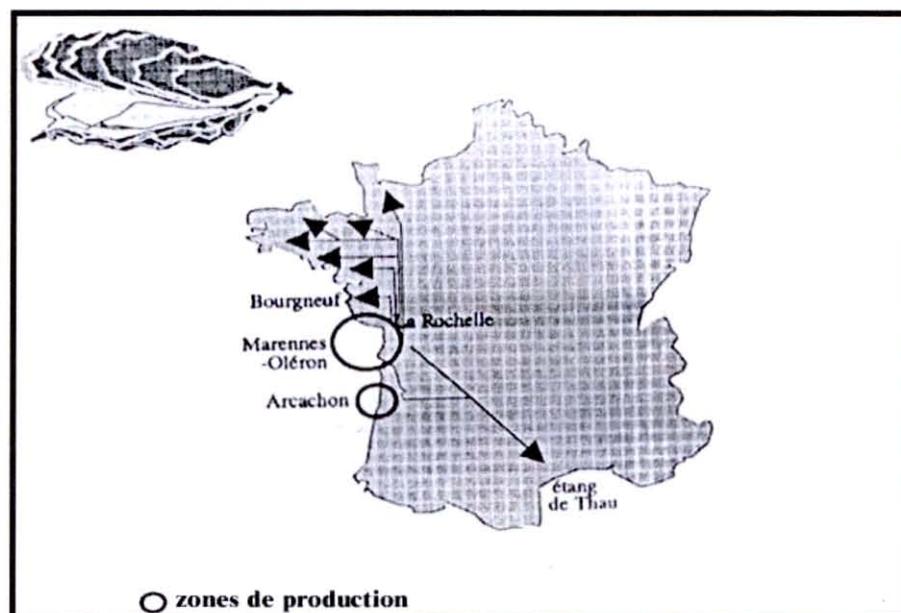


Figure 1 : Zones de production et transfert de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* ( Gouletquer et Héral, 1981).

# Matériel et Méthodes

### 2.1 Origine du Naissain :

La présente étude a été menée sur du naissain issu d'un croisement réalisé à l'écloserie de La Tremblade à partir de 24 femelles et 6 mâles récoltés en Seudre. La fécondation faite, le développement larvaire s'est poursuivi en jarres de 150 litres jusqu'à ce que les larves atteignent la taille de 330  $\mu\text{m}$ , qui correspond à la taille de fixation. Au cours de son cycle de développement, l'huître passe par différents stades. Les phases principales sont la phase larvaire planctonique, qui dure environ une vingtaine de jours suivant la température extérieure, puis la phase benthique après métamorphose et fixation. L'étape de fixation est la dernière phase importante du cycle de développement de l'espèce (Huvet, 2000 ; figure 2). Après fixation, les animaux ont été transférés dans des bacs adaptés à la réalisation de l'expérience.

### 2.2 Protocole Expérimental :

Des représentants de la population précédemment décrite ont été soumis à deux concentrations différentes d'atrazine : la première à 0,01 mg/l, qui est proche de la valeur pic observée à la sortie de canaux d'irrigation dans le bassin de Marennes-Oléron, et la seconde à 0,1 mg/l. Six lots ont été mis en place : deux lots témoins (1A et 1B), deux lots avec 0,01 mg/l d'atrazine (2A et 2B), et deux lots avec 0,1 mg/l d'atrazine (3A et 3B). Les lots ont eu une période d'acclimatation de 6 jours en circuit ouvert, et ont ensuite été soumis à l'atrazine pendant 3 mois et demi (figure 3).

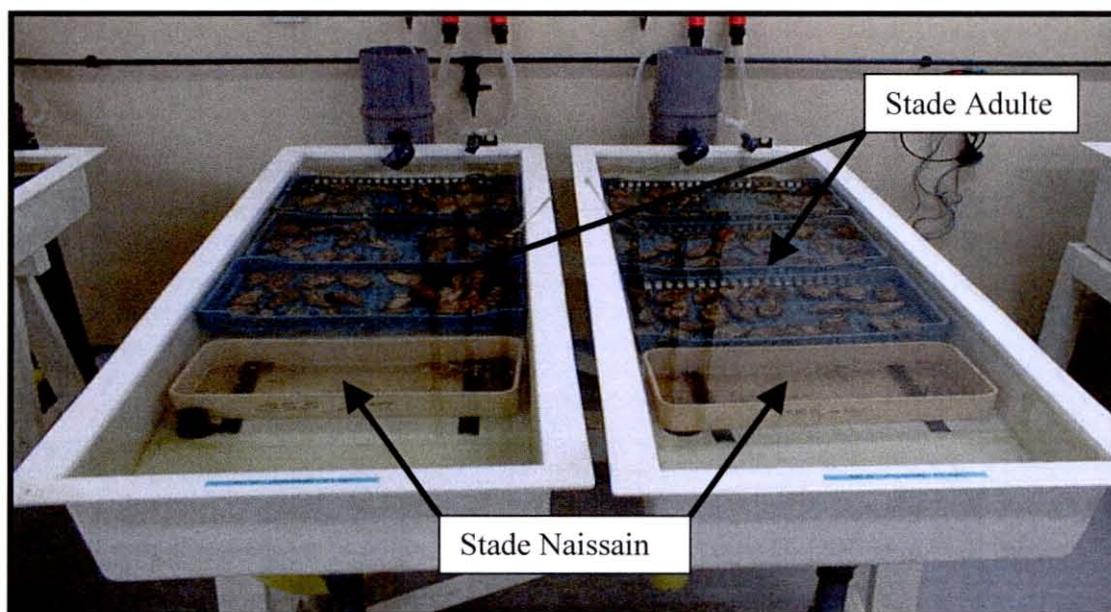


Figure 3 : Huîtres creuses *Crassostrea gigas* aux stades adultes et naissain placées dans les bacs d'expérimentations. Exemple de 2 lots à 0,1 mg/l d'atrazine.

Chaque bac est rempli avec 157 litres d'eau de mer. Pour chacun des lots, un volume d'atrazine est rajouté afin d'obtenir la concentration désirée. Ainsi, pour les lots 2A, 2B et 3A, 3B, 157 ml d'atrazine à 10 mg/l et à 100 mg/l dans 5 litres d'eau de mer sont respectivement rajoutés. Les bacs étaient vidés et nettoyés chaque jour, de même que les filtres biologiques, puis remplis de la même manière. La ration quotidienne des huîtres était constituée de 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 4).

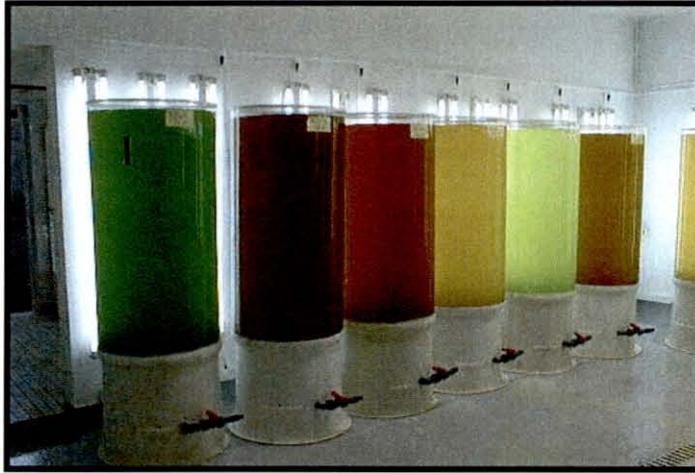


Figure 4 : Salle d'élevage phytoplanctonique. Des cuves de 300 L de différentes espèces d'algues sont visibles sur la photographie.

### 2.3 Etude de l'aneuploïdie :

Le taux d'aneuploïdie est le pourcentage de cellules d'un animal contenant 17, 18, ou 19 chromosomes au lieu des 20 habituels chez *Crassostrea gigas*. Afin de pouvoir observer et compter ces chromosomes, la méthode de préparation chromosomique retenue est la méthode de suspension cellulaire de Thiriot-Quévieux et Ayraud (1982). Elle comporte plusieurs étapes successives (détails en Annexe 1).

#### *2.3.1 Arrêt des cellules en métaphase :*

L'étude de l'aneuploïdie se fait sur les cellules bloquées en métaphase. Pour ce faire, les animaux sont placés 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.

Le temps d'exposition à la colchicine varie de 7 à 8 heures. C'est une étape nocturne pour 2 raisons : la première étant que les huîtres ont une plus grande activité mitotique la nuit, et donc une plus grande filtration et absorption de colchicine, et la seconde étant que la colchicine est un produit photosensible. Les animaux sont ensuite disséqués afin d'en prélever les branchies.

### 2.3.2 *Choc hypotonique :*

Les branchies sont soumises à un choc hypotonique afin de provoquer la turgescence des cellules et permettre une bonne dispersion des chromosomes. Cette étape est réalisée avec du citrate de sodium à 0,9% pendant 40 minutes.

### 2.3.3 *Fixation :*

Afin de préserver les structures internes des cellules, les branchies sont plongées dans des bains successifs d'éthanol absolu - acide acétique (3:1) : 4 bains au total, les deux premiers de 10 minutes et le deux suivant de 20 minutes.

Les branchies sont postérieurement placées dans une solution identique, et peuvent être conservées ainsi pendant plusieurs jours au réfrigérateur.

### 2.3.4 *Exécution des préparations chromosomiques :*

Deux lames par animal sont réalisées en moyenne. Pour chacune des lames, un morceau de branchies est placé dans une solution acide acétique à 50% afin de faciliter la libération des noyaux. La suspension cellulaire obtenue est récupérée grâce à une pipette pasteur et ensuite étalée en la laissant tomber par goutte, à une hauteur de 40 cm environ, sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. La suspension cellulaire est ensuite aspirée progressivement. Les lames sont séchées à l'air.

### 2.3.5 *Coloration :*

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

## 2.4 Analyse des données :

Le nombre statistique minimal de métaphases dans les études cytogénétiques est de l'ordre de 30 (Stallard *et al*, 1981 ; Wenger *et al*, 1984). Ainsi pour chaque lot, 10 individus ont été étudiés, et pour chacun d'entre eux, 30 métaphases ont été observées au hasard (microscope optique Olympus à l'objectif 40). Les cellules à  $2n=19$ , 18, 17 chromosomes ont été retenues comme cellules aneuploïdes. Ceci permet de déterminer le pourcentage moyen d'aneuploïdie par lot.

L'origine de l'aneuploïdie peut être due, pour certains auteurs, à des artefacts de la méthode de suspension cellulaire. Cependant, la probabilité pour que les cellules aneuploïdes aient cette origine est réduite par le nombre de métaphases observées.

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 2 facteurs (concentration d'atrazine et effet bac) sur SAS (SAS Institute), avec un risque d'erreur de 5%. Un test de Duncan (test de niveau multiple) est ensuite réalisée, avec le même risque d'erreur.

Les données obtenues sur le naissain peuvent être comparées avec celles obtenues pour les adultes. Effectivement, il est possible de réaliser une analyse de variance à 3 facteurs (concentration d'atrazine, effet bac, et stade de développement (naissain ou adulte)) sur SAS également.

# RESULTATS

### 3.1 Action de l'atrazine sur le naissain de *Crassostrea gigas* :

Les différents lots observés ont révélé, chez chaque individu, des cellules hypodiploïdes à  $2n = 19$ ,  $18$  et  $17$  chromosomes (figures 5).



Figure 5a : Métaphases avec  $2n = 20$  chromosomes de *Crassostrea gigas*. (Ech :  $1\text{ cm} \leftrightarrow 5\mu\text{m}$ ).

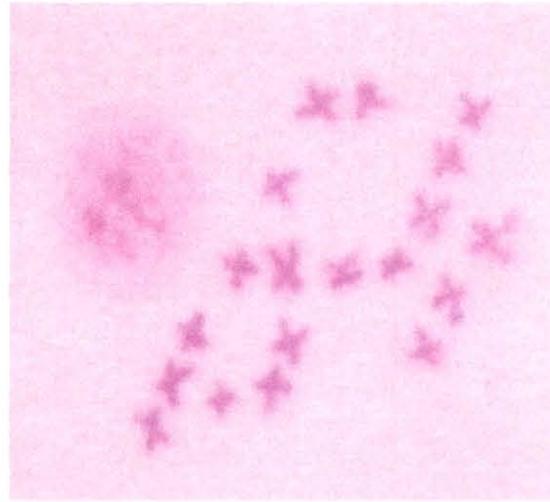


Figure 5b : Métaphases avec  $2n = 19$  chromosomes de *Crassostrea gigas*. (Ech :  $1\text{ cm} \leftrightarrow 5\mu\text{m}$ ).

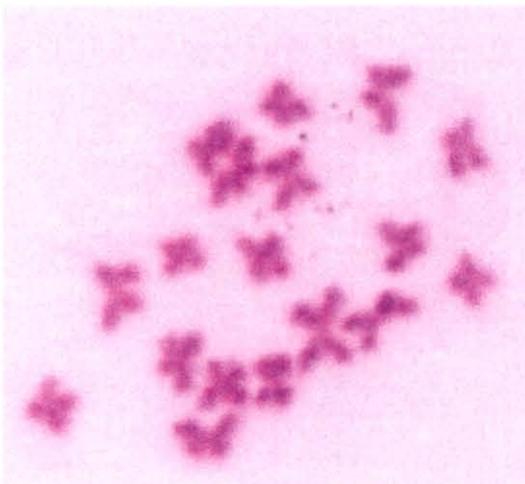


Figure 5c : Métaphases avec  $2n = 18$  chromosomes de *Crassostrea gigas*. (Ech :  $1\text{ cm} \leftrightarrow 5\mu\text{m}$ ).

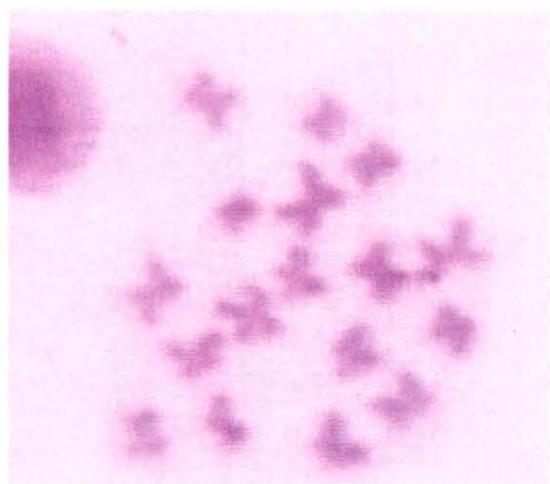


Figure 5d : Métaphases avec  $2n = 17$  chromosomes de *Crassostrea gigas*. (Ech :  $1\text{ cm} \leftrightarrow 5\mu\text{m}$ ).

Figure 5 : Métaphases prises en compte lors de l'étude de l'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas* aux stades adultes et naissain.

Le nombre normal de chromosomes étant de 20, 1 à 3 chromosomes ont été perdus parmi les 10 paires de chromosomes métacentriques qui constituent le caryotype de cette espèce (figure 6).

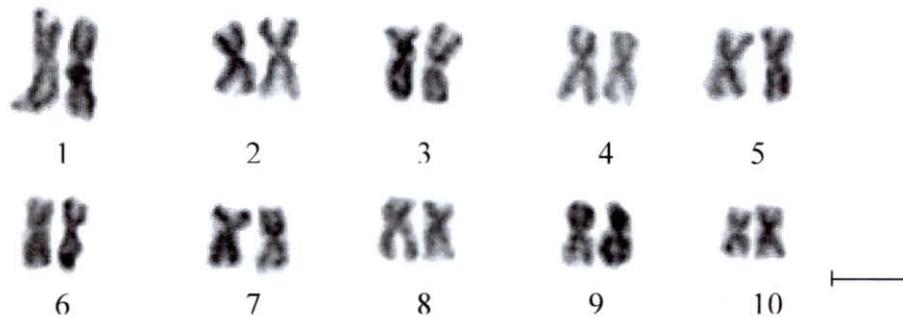


Figure 6 : Caryotype de *Crassostrea gigas* ( $2n = 20$ ) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. (Ech :  $1\text{ cm} \leftrightarrow 5\mu\text{m}$ ).

Des pourcentage différents de cellules aneuploïdes ont pu être constatés d'une concentration à l'autre. Effectivement, le pourcentage de cellules aneuploïdes augmente avec la concentration d'atrazine. Pour les lots 1A (10,33%), 1B (9,67%), 2A(14,67%), 2B (16%) et 3A (25,33%), 3B (24,33)% les pourcentages calculés sont représentés sur le graphique suivant (figure 7) :

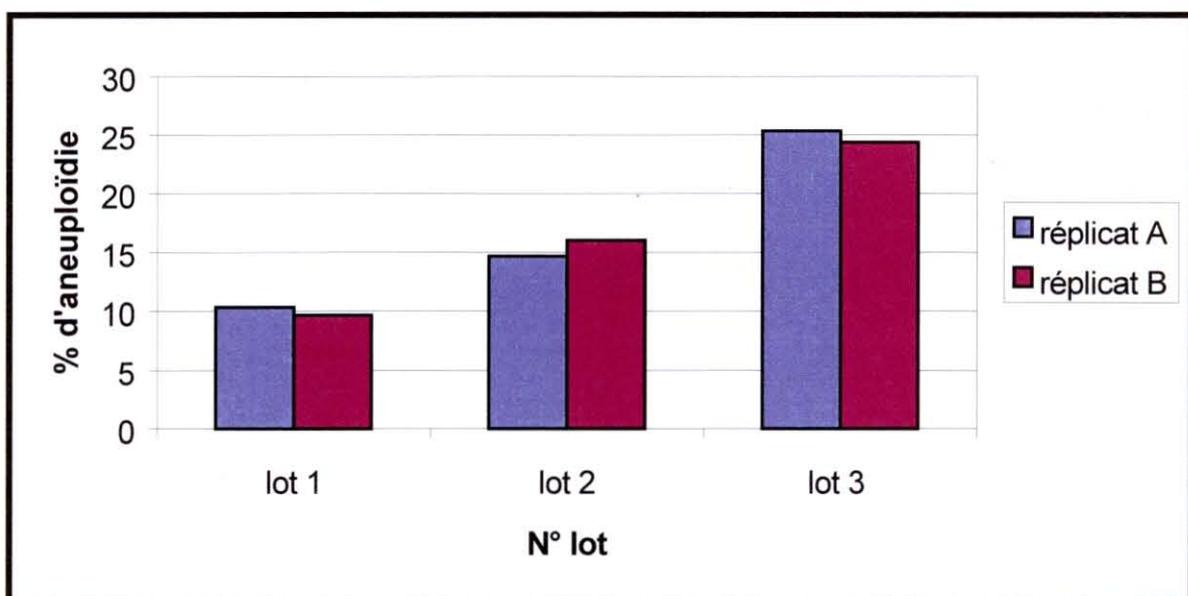


Figure 7 : Pourcentage de cellules aneuploïdes chez *Crassostrea gigas* au stade naissain en fonction de la concentration d'atrazine : 0 mg/l (lot1), 0,01 mg/l (lot2) et 0,1 mg/l (lot3).

L'analyse de variance permet de tester d'une part, le facteur représenté par la concentration d'atrazine et d'autre part, l'effet bac. Ce test révèle une différence statistique significative entre les lots ayant des concentrations différentes d'atrazine ( $F=33,81$  ;  $P=0,0001$ ), mais ne permet pas de dire que les réplicats A et B, pour une même concentration, sont statistiquement différents ( $F=0,16$  ;  $P=0,9222$ ).

Le test de Duncan permet de conclure que les lot 1, 2 et 3 sont significativement différents les uns par rapport aux autres.

### 3.2 Comparaison de données obtenues chez *Crassostrea gigas* aux stades adulte et naissain

La première remarque qu'il est possible de faire en comparant les deux séries de données (adulte (Bouilly, 2001) et naissain) est que dans les deux cas , il y a une augmentation du taux d'aneuploïdie avec la concentration d'atrazine.

Pendant les résultats des expériences sur les huîtres aux stades adulte et naissain font apparaître des pourcentages de cellules aneuploïdes différents (figure 8). L'analyse de variance qui permet de tester ce 3<sup>ème</sup> facteur, qui est le stade de développement renseigne sur le fait qu'il n'y pas de différences significatives entre les adultes et le naissain ( $F=0,95$  ;  $P=0,3308$ ).

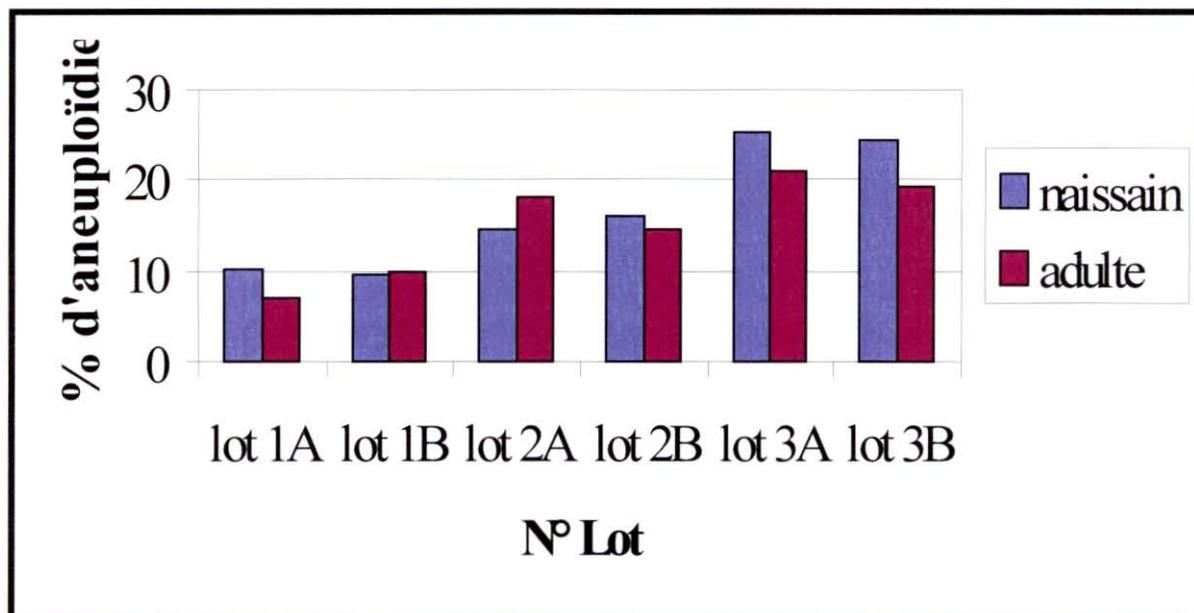


Figure 8 : Pourcentage des cellules aneuploïdes chez *Crassostrea Gigas* aux stades adulte et naissain en fonction de la concentration d'atrazine : 0 mg/l (lot 1A et 1B), 0,01 mg/l (lot 2A et 2B), 0,1 mg/l (lot 3A et 3B).

# Discussion

Les études antérieures à la notre ont permis d'émettre une hypothèse sur l'existence d'une base génétique pour le contrôle du taux d'aneuploïdie chez *Crassostrea gigas*. Effectivement, des différences significatives d'aneuploïdie ont été observées parmi différentes familles ayant le même âge, élevées dans les mêmes conditions dont les individus échantillonnés avaient le même poids (Leitão et al, 2001a). Grâce à nos résultats, il est possible d'attribuer un facteur environnemental à ce phénomène.

La première partie de l'étude menée par K. Bouilly (2001) a permis de mettre en évidence que l'atrazine entraînait une augmentation de cellules aneuploïdes chez *Crassostrea gigas* au stade adulte. Cette relation positive atrazine-aneuploïdie conforte ainsi les résultats montrant un effet toxique de l'atrazine sur l'huître même à des taux pouvant être rencontrés dans le milieu. Cependant, elle a également mis à jour des contradictions avec des résultats antérieurs. Ainsi pour les trois conditions testées lors de l'expérience, aucun effet significatif de l'atrazine sur la mortalité n'a été observé alors que Moragua et Tanguy (2000) ont remarqué un taux de mortalité de 60 % à une concentration de 0,1 mg/l après deux mois d'exposition. Ces résultats contradictoires peuvent être dues à des différences de méthodologie ou encore à l'origine de l'atrazine utilisée.

Notre étude, réalisée dans les mêmes conditions mais au stade naissain, confirme les résultats obtenus sur les adultes avec à nouveau une faible mortalité du naissain étudié. L'effet de l'atrazine sur la ploïdie est donc également observé chez l'huître creuse au stade naissain. Ainsi, pour les deux stades étudiés (adulte et naissain), le taux d'aneuploïdie augmente de façon significative avec la concentration d'atrazine. Ce résultat est d'autant plus important que cette différence apparaît dès la concentration de 0,01 mg/l, valeur pic que l'on retrouve dans le milieu (Munsch, 1995). De plus, l'huître au stade naissain apparaît aussi sensible qu'au stade adulte.

Les concentrations d'atrazine les plus élevées sont mesurées pendant la période d'épandage, c'est à dire mai-juillet (*figure 9*) mais cet herbicide est également présent en dehors de cette période. Ceci montre que ce produit est persistant et mobilisable d'une année sur l'autre (Munsch, 1995). Par ailleurs, la période d'épandage coïncide avec la période de maturité sexuelle des adultes. En effet, en fin d'automne l'huître présente une activité réduite de la gonade jusqu'au printemps suivant (octobre à mars). La gamétogénèse se déroule selon un rythme très lent pendant cette période qui ne correspond pas à un véritable repos sexuel. La lignée germinale se développe de façon active, à la fin de l'hiver, pour accélérer au printemps et arriver à la maturité sexuelle en juillet (Gouletquer, 1985).

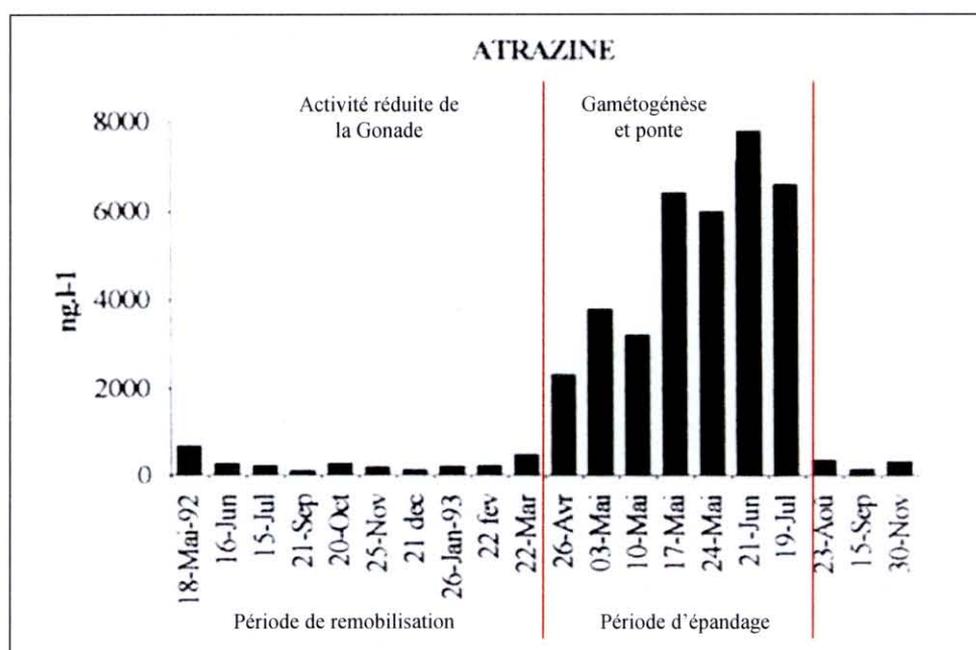


Figure 9 : Evolution temporelle des concentrations (ng/l) en atrazine dans le canal du Grand Garçon (Brouage). Relation avec le cycle reproducteur de l'huître (en haut sur le graphique) (Munsch, 1995 ;modifié).

De ce fait l'atrazine pourrait avoir un effet sur les gamètes et à plus long terme sur la descendance. Il était donc important d'observer l'impact de l'atrazine sur l'adulte et le naissain, mais également sur la descendance d'individus en contact avec l'atrazine.

L'étude des premiers stades de développement d'huîtres issues de parents soumis à l'atrazine n'a révélée aucun effet sur la croissance larvaire, mais elle a montré un effet négatif sur le taux d'éclosion (Bouilly, 2001). Il aurait été également intéressant de pouvoir observer l'action directe de l'atrazine sur cette descendance, au niveau de la croissance larvaire ainsi qu'au niveau de la croissance du naissain mais ceci n'a pu être réalisé cette année pour des raisons techniques.

Du fait de nos résultats révélant une augmentation du pourcentage de cellules aneuploïdes, au stade adulte et naissain, l'étude permettant de savoir si cet effet se retrouve sur la descendance d'huître soumis aux différentes concentrations d'atrazine est envisagée et sera réalisée au sein du laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade.

---

Il a également été démontré qu'il existait une corrélation négative entre le taux d'aneuploïdie et le taux de croissance (Leitão *et al.*, 2001a). La grande variabilité de croissance est un problème important pour la production aquacole des huîtres *Crassostrea gigas*.

Le Bassin de Marennes-Oléron a vu une production avec une croissance de plus en plus faible qui semble due principalement à des densités plus importantes (Héral *et al.*, 1998). Cependant, suite à la présente étude, l'hypothèse d'action de polluants chimiques, tel que l'atrazine, pouvant agir sur la croissance, doit être approfondie pour en connaître l'étendue et l'intensité. L'intensification de l'activité agricole entraîne en effet une utilisation de produits phytosanitaires qui par lessivage et érosion des sols sont susceptibles d'être transportés vers le milieu aquatique. La juxtaposition des activités agricoles et aquacoles, toutes deux utilisatrices des ressources d'eau douce, suscite l'inquiétude des conchyliculteurs, par crainte d'une dégradation de la qualité des eaux des bassins maritimes français. Les premiers résultats ainsi obtenus méritent donc une attention certaine et, il est envisageable de réaliser une étude afin de déterminer si le facteur polluant peut intervenir de la même façon que le facteur densité dans la baisse de croissance observée chez *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Il serait également intéressant de savoir si le taux d'aneuploïdie est réversible, dans le cas où les individus d'une même population et conservés dans les mêmes conditions environnementales que les huîtres *Crassostrea gigas* étudiées sont replacés dans de l'eau propre, c'est à dire non contaminée par de l'atrazine. Cette étude est actuellement menée au laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade. Elle permettra peut être, dans le cas où un effet d'un polluant (dans notre cas l'atrazine) sur la croissance est prouvé, de savoir si l'arrêt de l'utilisation de ce polluant réduirait le problème.

# Bibliographie

---

Il a également été démontré qu'il existait une corrélation négative entre le taux d'aneuploïdie et le taux de croissance (Leitão *et al.*, 2001a). La grande variabilité de croissance est un problème important pour la production aquacole des huîtres *Crassostrea gigas*.

Le Bassin de Marennes-Oléron a vu une production avec une croissance de plus en plus faible qui semble due principalement à des densités plus importantes (Héral *et al.*, 1998). Cependant, suite à la présente étude, l'hypothèse d'action de polluants chimiques, tel que l'atrazine, pouvant agir sur la croissance, doit être approfondie pour en connaître l'étendue et l'intensité. L'intensification de l'activité agricole entraîne en effet une utilisation de produits phytosanitaires qui par lessivage et érosion des sols sont susceptibles d'être transportés vers le milieu aquatique. La juxtaposition des activités agricoles et aquacoles, toutes deux utilisatrices des ressources d'eau douce, suscite l'inquiétude des conchyliculteurs, par crainte d'une dégradation de la qualité des eaux des bassins maritimes français. Les premiers résultats ainsi obtenus méritent donc une attention certaine et, il est envisageable de réaliser une étude afin de déterminer si le facteur polluant peut intervenir de la même façon que le facteur densité dans la baisse de croissance observée chez *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Il serait également intéressant de savoir si le taux d'aneuploïdie est réversible, dans le cas où les individus d'une même population et conservés dans les mêmes conditions environnementales que les huîtres *Crassostrea gigas* étudiées sont replacés dans de l'eau propre, c'est à dire non contaminée par de l'atrazine. Cette étude est actuellement menée au laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade. Elle permettra peut être, dans le cas où un effet d'un polluant (dans notre cas l'atrazine) sur la croissance est prouvé, de savoir si l'arrêt de l'utilisation de ce polluant réduirait le problème.

- 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.
- Bond, D.J. & Chandley, A.C.**, 1983. Aneuploidy. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Bouilly, K.**, 2001. Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude expérimentale sur une population en milieu contrôlé. Rapport de DEA Exploitation Durable des Ecosystèmes Littoraux.
- Cornet, M.**, 1993. A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*). Experientia 49: 87-90.
- Dixon, D. R.**, 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. Mar. Biol. Lett. 3: 155-161.
- GEN-TOX Program** : Current status of bioassay in Genetic Toxicology. U.S.Environmental Protection Agency, Washington, DC. Office of toxic substances and Pesticides. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine, USA, 1995.
- 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.
- Gouletquer, P.**, 1985. Cycle de reproduction naturelle de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivées en France. Rapport de groupe de travail sur la reproduction des mollusques bivalves d'aquaculture marine. Direction des ressources vivantes – IFREMER.
- Gouletquer, P. & Héral, M.**, 1991. Aquaculture of *Crassostrea gigas* in France. The ecology of *C.gigas* in Australia, New Zealand, France and Washington State. Oyster Ecology Workshop, Annapolis, USA : 12-19.
- Héral, M., Hawkins, A.J.S., Smaal, A., and Navarro, E.**, 1998. Trophic capacity of the coastal areas for the culture of oyster, mussels and cockles. Third european marine sciences and technology conference MAST. Lisbon 23-27 May 1998. Fishery and Aquaculture AIR 1990-1994 selected projects, 5 : 125-128.
- Huvet, A.**, 2000. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites. Thèse de doctorat l'université François Rabelais de Tours.
- 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.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quiévreux, C.**, 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. Aquaculture 193: 39-48.
- Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A. & Thiriot-Quiévreux, C.**, 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquatic Living Resources, sous presse.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- SAS Institute.** SAS for Windows. Copyright© 1989-1996. Cary, N.C, USA.
- 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.
- Thiriou-Quiévreux, C.**, 1984. Les caryotypes de quelques *Ostreidae* et *Mytilidae*. *Malacologia* 25 (2): 465-475.
- Thiriou-Quiévreux, C.**, 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'*Ostreidae* (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231.
- Thiriou-Quiévreux, C. & Ayraud, N.**, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes marins. *Mar. Biol.* 70: 165-172.
- Thiriou-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.
- Thiriou-Quiévreux, C., Pogson, G. H. & Zouros, E.**, 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45.
- Wenger, S. L., Golden, W. L., Dennis, S. P., & Steele, M. W.**, 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Am. J. Med. Genet.* 19: 715-719.
- Zouros, E., Thiriou-Quiévreux, 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 : Protocoles détaillées de la méthode de suspension cellulaire mise au point par Thiriou-Quiévreux et Ayraud (1982).

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**1- Solutions**

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

**a) Les solutions suivantes:**

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

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

**CITRATE** : Solution de citrate de sodium à 0,9%, donc:  
 900 mg de citrate de sodium dans  
 100 ml H<sub>2</sub>O **distillée (stockage au réfrigérateur)**

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

*e.g. Les tubes ont la capacité de 2.2 ml et il y a 120 animaux:*

$$\begin{aligned} 2.2 \text{ ml} \times 120 &= 264 \text{ ml} \\ + \text{ extra} &= 300 \text{ ml} \end{aligned}$$

*Si on a 900 mg de citrate de sodium dans 100 ml H<sub>2</sub>O distillée*

*On a besoin de 3 x 900 mg*

$$= 2700 \text{ mg sodium citrate pour } 300 \text{ ml H}_2\text{O distillée}$$

**COLCHICINE 'MÈRE'**: Solution 'Mère' de colchicine à 0,1%, donc:  
 100 mg colchicine  
 100ml H<sub>2</sub>O **de mer filtrée (stockage au réfrigérateur)**

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

$$\begin{aligned} 100 \text{ ml solution 'fille' (faite le soir juste avant de lancer le traitement)} \\ = 5 \text{ ml solution 'mère'} \\ + 95 \text{ ml H}_2\text{O de mer avec Isochrisis} \end{aligned}$$

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

e.g. Si on utilise 50 ml par petit animal (<2 g) et que l'on a 120 animaux, on a besoin de 6 litres de solution 'fille'.

6 litres de solution 'fille' est requis

$6000 \text{ ml} / 100 = 60$

$60 \times 5 \text{ ml} = 300 \text{ ml}$

Donc 300 ml de solution 'mère' est requis. Et si on a 100 mg de colchicine dans 100 ml de H<sub>2</sub>O de mer, dans 300 ml on va avoir besoin de 300 mg.

**ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, A PESER AVEC GANTS ET MASQUE EN SALLE DES POUDRES.**

**b) Numéroté les tubes de 2.2 ml qui seront utilisés.**

**A préparer la nuit, juste avant le manip.**

**COLCHICINE 'FILLE' :** Juste avant la manip, la solution 'fille' est préparée à partir de la solution 'mère'

100 ml solution 'fille'

=5 ml solution 'mère'

+95 ml H<sub>2</sub>O **de mer avec Isochrisis**

L'eau de mer avec *Isochrisis* est composée du mélange (2/1) Eau de mer filtrée/ *Isochrisis* pris dans la salle des algues (à choisir dans un 300 litres à couleur brune moyenne).

*Dans l'exemple ci-dessus, 6000 ml de solution 'fille' est requis*

*Dont 300 ml de solution mère de colchicine (5%)*

*Et du mélange (2/1) de 3800 ml d'eau de mer filtrée/1900 ml Isochrisis,*

**A préparer le matin juste avant le fixation**

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

*Dans l'exemple ci-dessus, 2.2 ml tubes x 120 animaux = 264 ml*

*264 ml x 5 = 1320 ml*

*+ extra = 1500 ml*

*1500/4=375*

*Donc 1125 ml éthanol absolu*

*Et 375 ml acide acétique glacial*

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

## Annexe 1 : Protocole détaillé (suite)

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**2- Manip de nuit.**

Cette fiche décrit la manip avec lancement manuel la nuit.  
Le soir, avant de partir, préparer d'abord les choses suivantes:

**Pour la nuit:**

- Colchicine (solution mère),
- Eprouvettes graduées pour mesurer les différents volumes,
- Pichet/s et bêcher/s pour les algues et le mélange avec la solution 'fille',
- Bols/bêchers/aquariums pour le traitement des huîtres,
- Gants,
- Bulleur (tubes et pierres) pour oxygéner l'eau,
- Agitateur magnétique,
- Blouse de laboratoire.

**Pour le matin (à préparer le soir ou pendant la nuit):**

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

**Mise en marche la nuit**

Le traitement à la colchicine, permettant le blocage des mitoses en métaphase, est lancé à minuit et arrêté entre 8 à 10 heures plus tard pour du comptage (6 heures pour du banding).

Avant le lancement, la solution fille de colchicine (5%) est préparée avec la solution mère, l'eau de mer filtré et *Isochrisis* (voir Fiche 1).

Ce mélange est fait dans un bêcher/s ou pichet avec l'agitateur magnétique en marche pendant quelques minutes. Les huîtres sont mises dans leurs bols ou autres récipients de façon à ne pas les entasser mais en leur laisser de l'espace pour s'ouvrir et filtrer. La solution est ajoutée et le bulleur mis en marche pour aérer l'eau.

Annexe 1 : Protocole détaillé (suite).

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.**  
**3- Dissection et fixation le matin**

Les démarches décrites ci-dessous sont à faire suite à la manip détaillée en fiche 2: Manip de nuit. Elles sont à faire le matin suivant le traitement des huîtres à la colchicine. Pour une visualisation du nombre de chromosomes, la manip est arrêtée après 6 heures (à 6 heures du matin si elle a été lancée à minuit).

La fixation concerne les solutions suivantes:

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

**Dissection**

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

Pour découper les branchies, l'huître est ouverte avec un scalpel et regardée avec le microscope de dissection (fig. 1). Le manteau et les branchies sont découpés ensemble en prenant soin de ne pas abîmer la glande digestive ni la gonade si il y en a. Les branchies (et peut-être le manteau avec!) sont enlevées ensemble puis le manteau (plus épais avec les poils) est découpé afin de garder seulement les lamelles des branchies qui sont entre les deux couches de manteau. Avant de mettre le tissu dans le citrate, 2 petites coupures sont faites du haut vers le bas des branchies pour faciliter la pénétration de citrate (fig. 2.). Ces coupures ne sont pas faites sur la totalité mais seulement deux tiers de la largeur des branchies. Ceci permet d'éviter que les branchies ne se séparent en morceaux. Elles restent attachées lès unes avec les autres à la base.

**Fixation**

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

Citrate pendant	40 min
F1	10 min
F1'	10 min
F2	20 min
F3	20 min
F5 final (dans lequel l'échantillon va être stocké au réfrigérateur)	

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

Annexe 1 : Protocole détaillé (suite).

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des lames microscopiques.**  
**1- Fixation des chromosomes**

Les lames peuvent être préparées à partir de 24 heures après la fin de fixation

**Matériel**

Le matériel suivant est nécessaire:

Microscope de dissection binoculaire  
Une table chauffante pour lames (mis à 44°C)  
Lames 'porte objets' (lavées à l'acide chlorhydrique, voir ci-dessous)  
Lame avec dépression circulaire (ou petit verre de cristallisation)  
Pincettes fines  
Ciseaux fins  
2 Pipettes pasteurs  
Boîte pétri  
Bol poubelle

Les solutions suivantes sont également nécessaires :

1/1 Acide Acétique/ Eau distillée  
Fixateur 3/1 Ethanol Absolu/ Acide Acétique Glaciale (frais)

**Méthodologie**

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

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

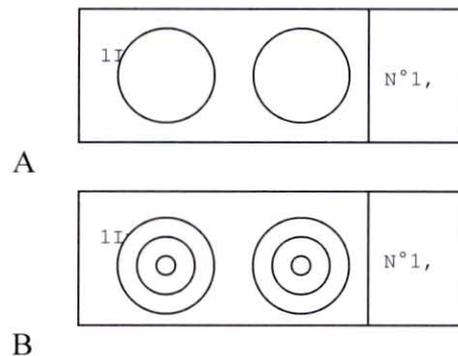
Remettre le reste des branchies dans le tube, remplir avec du fixateur frais et remettre le tube au réfrigérateur.

Le morceau découpé est séché sur une serviette en papier et mis sur la lame avec la dépression avec le mélange 1/1 Acide/Eau de façon à remplir cette dépression (Utilisation de la pipette Pasteur n°1). La lame est posée sous le microscope.

Après quelques minutes il apparaît de petites bulles autour du morceau. Le morceau peut être agité dans la solution avec la pince pour libérer ces bulles. Enfin le morceau, qui est devenu transparent, est enlevé et jeté. Le liquide restant contient les noyaux. Le liquide est aspiré avec une pipette pasteur (Pipette Pasteur n°2) et laissé tombé sur la lame de la manière suivante:

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

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



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

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

Annexe 1 : Protocole détaillé (suite).

**Aneuploïdie:**  
**Préparation des lames microscopiques.**  
**2- Coloration des lames**

**Matériel**

Le matériel suivant est nécessaire:

- pHmètre (la première fois et lorsque l'on a besoin de mélanger du tampon)
- Bain à lames = "baignoire"
- Eprouvettes graduées
- Pipette (pour le bain de coloration), filtres et cônes
- Parafilm et ciseaux
- Bouteille en verre pour faire le mélange (si le cylindre n'est pas en verre)
- Minuteur

Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

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

**Méthodologie 1: Préparation du tampon phosphate.**

Le tampon est composé de deux solutions stock qui sont mélangées afin de produire une solution à pH 6.8.

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

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

Le mélange est fait à partir de 51ml de A et 25ml environ de solution B et le pH est mesuré avec le pHmètre. De la solution B (prévoir 25 autres ml) est ajoutée progressivement jusqu'à ce que le pH voulu (6.8) soit atteint. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour donner 200ml au total.

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

Les solutions de base sont stockées.

**Méthodologie 2: Coloration des lames.**

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

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

Les trois liquides sont mis dans la bouteille, qui est fermée par du parafilm et agitée pour mélanger le contenu en tournant 12 fois !

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

Lorsque la coloration est finie, jeter la solution dans l'évier et rincer les lames dans leur baignoire 3 fois avec de l'eau du robinet et 1 fois enfin avec de l'eau distillée. Les lames peuvent être séchées sur du sopalin sur une surface plane.

Annexe 2 : Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez l'huîtres creuses  
*Crassostrea gigas* au stade naissain.

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	30	0	0	0	0	0,0	10,3%	2
1A	2	27	1	1	1	3	10,0		2
1A	3	26	3	1	0	4	13,3		1
1A	5	25	4	1	0	5	16,7		2
1A	6	27	2	1	0	3	10,0		1
1A	7	26	2	0	2	4	13,3		2
1A	8	28	1	1	0	2	6,7		2
1A	9	26	3	0	1	4	13,3		2
1A	10	28	1	1	0	2	6,7		1
1A	11	26	3	1	0	4	13,3		1
1B	1	27	1	2	0	3	10,0		9,7%
1B	2	26	2	2	0	4	13,3	2	
1B	3	27	2	1	0	3	10,0	2	
1B	4	27	3	0	0	3	10,0	2	
1B	7	28	1	1	0	2	6,7	1	
1B	8	26	4	0	0	4	13,3	1	
1B	9	28	1	1	0	2	6,7	1	
1B	10	26	3	1	0	4	13,3	2	
1B	11	28	1	1	0	2	6,7	2	
1B	12	28	1	1	0	2	6,7	2	
2A	2	26	6	0	1	7	23,3	14,7%	
2A	3	27	2	1	0	3	10,0		2
2A	4	26	4	0	0	4	13,3		1
2A	5	25	3	2	0	5	16,7		2
2A	6	26	4	0	0	4	13,3		2
2A	7	28	2	0	0	2	6,7		2
2A	8	26	2	2	0	4	13,3		1
2A	9	24	5	0	1	6	20,0		2
2A	11	27	2	0	1	3	10,0		1
2A	12	24	3	3	0	6	20,0		2
2B	1	26	2	1	1	4	13,3		16,00%
2B	2	23	4	2	1	7	23,3	2	
2B	3	25	2	3	0	5	16,7	2	
2B	4	23	3	1	3	7	23,3	2	
2B	5	28	1	0	1	2	6,7	1	
2B	6	25	3	2	0	5	16,7	1	
2B	7	24	6	0	0	6	20,0	2	
2B	8	26	3	1	0	4	13,3	1	
2B	9	27	1	0	2	3	10,0	1	
2B	11	25	3	1	1	5	16,7	2	

Annexe 2 : Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés chez l'huîtres creuses  
*Crassostrea gigas* au stade naissain.

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	25	3	1	1	5	16,7	25,3%	2
3A	2	22	4	4	0	8	26,7		2
3A	3	22	3	1	4	8	26,7		1
3A	4	24	4	1	1	6	20,0		2
3A	5	24	4	1	1	6	20,0		2
3A	6	20	5	4	1	10	33,3		2
3A	7	22	5	2	1	8	26,7		1
3A	8	22	3	3	2	8	26,7		1
3A	9	23	4	2	1	7	23,3		2
3A	10	20	5	2	3	10	33,3		1
3B	1	21	4	2	3	9	30,0	24,3%	2
3B	2	20	5	2	3	10	33,3		2
3B	3	25	3	2	0	5	16,7		1
3B	4	24	4	1	1	6	20,0		2
3B	5	20	5	5	0	10	33,3		2
3B	6	20	2	5	3	10	33,3		2
3B	7	26	1	3	0	4	13,3		2
3B	8	25	4	1	0	5	16,7		2
3B	9	20	7	3	0	10	33,3		2
3B	10	26	3	1	0	4	13,3		1