



Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006
Convention 2004- RPC-A-114 "Génétique"
Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les
apports de la génétique
Année 2004

Etude des anomalies chromosomiques chez
Crassostrea gigas

K. Bouilly , M. Bonnard, S. Lapègue



IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie

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

Sommaire

1	<i>Introduction</i>	3
2	<i>Impact des conditions d'élevage sur le taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse Crassostrea gigas (DYNAMO)</i>	5
3	<i>Etude de l'aneuploïdie chez des huîtres Crassostrea gigas de la vasière de Brouage (site atelier du PEVS)</i>	11
4	<i>Etude des facteurs génétiques</i>	16
5	<i>Identification des chromosomes manquants par digestion enzymatique</i>	19
6	<i>Publications/Colloques</i>	24
6.1	<i>Publications 2004</i>	24
6.2	<i>Communications orales et posters</i>	24
7	<i>Références bibliographiques</i>	25

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; 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). Chez *Crassostrea gigas*, l'aneuploïdie est l'altération du nombre diploïde normal de 20 chromosomes (Ahmed et Sparks, 1967; Thiriot-Quévieux, 1984) en cellules hypodiploïdes avec 19, 18 ou 17 chromosomes (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1992).

Les causes environnementale et/ou génétique de l'aneuploïdie restent encore largement inconnues, mais la compréhension de ce phénomène progresse. Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a déjà été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *C. gigas* (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988, 1992; Leitão *et al.*, 2001a) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère (Leitão *et al.*, 2001b) a été émise et il existerait une perte préférentielle de certains chromosomes (Leitão *et al.*, 2001c).

Nos études précédentes ont permis de mettre en évidence un effet toxique direct de l'atrazine (herbicide de la famille des triazines) sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses *C. gigas* en milieu contrôlé (Bouilly *et al.*, 2003). Celle-ci a été approfondie et il s'est avéré que l'impact observé persistait dans le temps (deux mois et demi) et à la génération suivante (Bouilly *et al.*, 2004). Par contre, l'atrazine n'a pas d'effet sur l'aspect qualitatif de la perte de chromosome dans le sens où les chromosomes perdus sont les mêmes que pour une aneuploïdie « spontanée » (Bouilly *et al.*, soumis). L'approche environnementale a été poursuivie avec un autre polluant, le cadmium. Aux concentrations testées, des différences significatives ont été observées entre les traitements chez des huîtres adultes (Bouilly, 2003a) mais pas chez des juvéniles ni sur la descendance (Bouilly, 2003b). De plus, diverses études ont été réalisées dans le milieu naturel afin d'avoir des éléments de comparaison *in situ* et en conditions contrôlées. Des familles issues d'écloserie, ayant des mortalités différentielles dans le milieu, ont été comparées. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les familles, par contre, une différence selon les conditions environnementales a pu être montrée (Bouilly, 2003b).

Ce rapport présente d'autres résultats obtenus en milieu naturel. Tout d'abord, l'impact de conditions d'élevage différentes sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses *C. gigas* issues d'écloserie a été évalué. Ensuite, le taux d'aneuploïdie d'huîtres issues du milieu naturel (vasière de Brouage) a été estimé à différentes périodes au cours d'une année. Une nouvelle étude de l'aneuploïdie entre lignées consanguines et leurs hybrides a été réalisée afin de poursuivre l'étude des facteurs génétiques. Enfin, nous nous sommes intéressés plus finement aux chromosomes manquants dans les cellules aneuploïdes, par la technique de marquage par digestion enzymatique récemment mise au point sur les huîtres. L'expérience a été réalisée sur des animaux dont le taux d'aneuploïdie important avait été induit par l'exposition de leurs parents à de l'atrazine.

2 Impact des conditions d'élevage sur le taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (DYNAMO)

Le projet DYNAMO se propose d'étudier la dynamique de la mortalité printanière et estivale de *Crassostrea gigas* dans des environnements discriminants par rapport à la mortalité (distance par rapport au sédiment, positionnement dans la colonne d'eau et environnement peu sensible). Les 3 conditions expérimentales proposées sont des élevages sur tables ostréicoles et en poches traditionnelles :

- 1- élevage sur estran à proximité du fond (15 cm du fond) sur site atelier de Perquis (Figure 1A)
- 2- élevage sur estran à 70 cm du fond sur site atelier de Perquis (Figure 1B)
- 3- élevage en marais sur site d'Artouan



Figure 1 : Poches d'huîtres posées sur des tables ostréicoles à différents niveaux par rapport au sédiment sur le site atelier de Perquis. (A) 15 cm du fond (Perquis 15), (B) 70 cm du fond (Perquis 70)

Nous souhaitons évaluer l'impact des conditions environnementales sur le taux d'aneuploïdie et donc de façon directe ou indirecte, sur la croissance. Nous avons étudié une population avec une variabilité génétique assez large (pool de la série 3 de la première génération du programme MOREST). Un premier prélèvement a été réalisé avant la mise sur sites (le 13 mars 2002) afin d'estimer le taux d'aneuploïdie de cette population. Ce premier prélèvement a été nommé Point 0 et les huîtres provenaient de la nurserie de la station Ifremer de Bouin. Les lames microscopiques ont été réalisées au mois d'avril 2002. Un deuxième prélèvement nommé Point 1 a ensuite été réalisé après plus de deux mois de mise sur sites (le 27 mai 2002 pour Artouan et le 28 mai pour Perquis) pour chaque condition environnementale. Un troisième et dernier prélèvement nommé Point 2 a eu lieu après une période de mortalité dans le milieu naturel (le 3 juillet 2002), et ce, pour chaque site. Les lames de ces deux prélèvements ont été réalisées au cours de l'été 2002. A chaque fois, 35 individus ont été prélevés par site et par point. Les huîtres ont été conditionnées pendant 3 semaines au sein de l'écloserie avant de réaliser la fixation des branchies. Pour chaque lot d'huîtres, nous avons réalisé deux classes de taille : petites et grandes et nous avons étudié 10 huîtres « petites » et 10 huîtres « grandes » par lot.

Nous souhaitons répondre aux questions suivantes en réalisant cette étude :

- 1- Le mode de culture a-t-il une influence sur le taux d'aneuploïdie?
- 2- En cas de mortalité, les animaux survivants sont-ils moins aneuploïdes (dans l'hypothèse où les animaux les plus sensibles seraient les plus aneuploïdes)?

Les lames ont été lues de novembre 2003 à février 2004. La Figure 2 présente les pourcentages d'aneuploïdie obtenus pour chaque site en fonction du point et de la taille. La Figure 3 présente les pourcentages d'aneuploïdie obtenus pour chaque site en fonction du point et sans distinction de la taille. Des analyses statistiques (ANOVA) ont été réalisées afin de comparer les résultats obtenus. Les résultats de ces tests sont présentés dans les tableaux suivants : Tableau 1, Tableau 2 et Tableau 3. Afin de tenter d'expliquer les résultats observés en aneuploïdie, ces derniers ont été mis en relation avec des données sur la mortalité ainsi que sur le poids (et donc de la croissance) obtenues par le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes de l'Ifremer de La Tremblade. La mortalité a été étudiée à partir de 3 poches ostréicoles contenant chacune 200 huîtres au départ pour chaque site. La Figure 4 montre le taux de mortalité des huîtres en fonction du site et du moment de prélèvement. Les mesures de poids ont été effectuées sur 30 individus par lot. La Figure 5 montre le poids total des huîtres en fonction du point et du site.

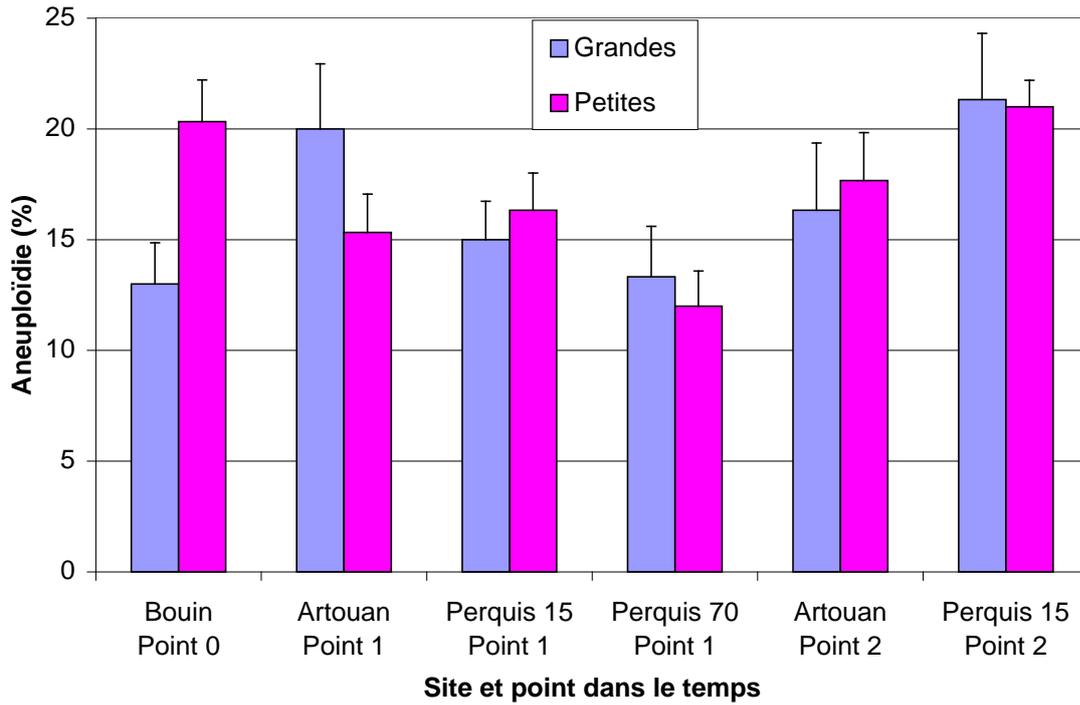


Figure 2 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* pour chaque site en fonction du point dans le temps et de leur taille

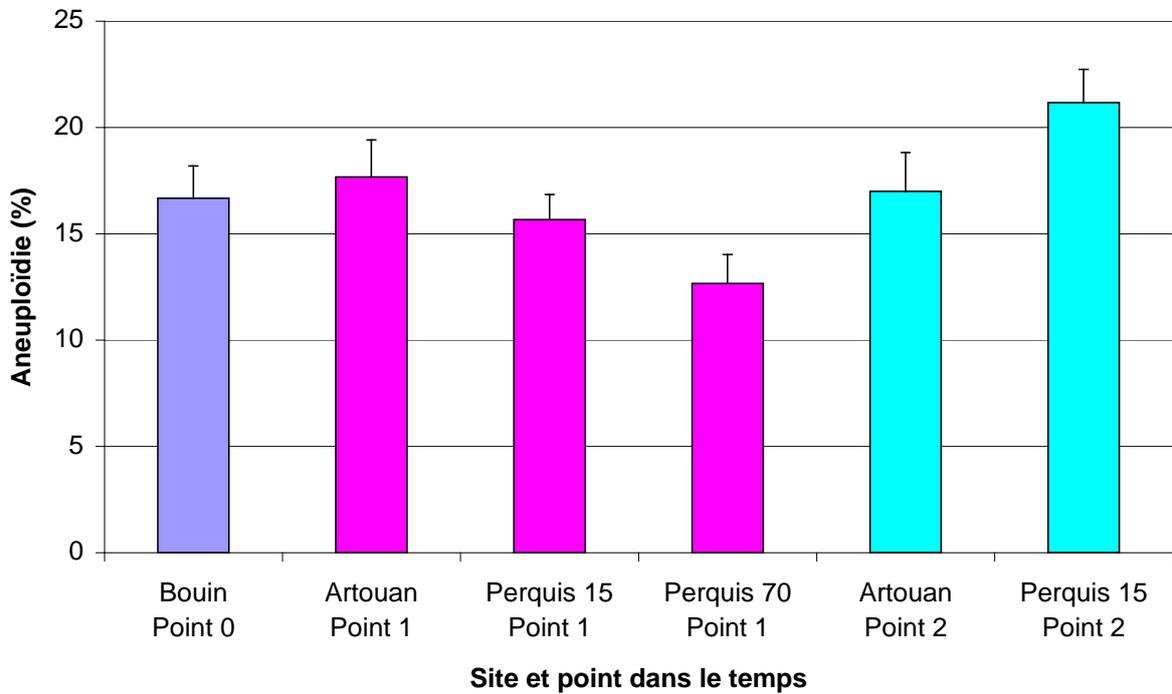


Figure 3 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* pour chaque site en fonction du point dans le temps

	PO	P1			P2	
	Bouin	Artouan	Perquis15	Perquis70	Artouan	Perquis15
G-P	0,017*	0,188	0,684	0,637	0,725	0,838

Tableau 1 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre les grandes (G) et les petites (P) pour chaque point (Point 0 : P0, Point 1 : P1 et Point 2 : P2) et chaque site

		Artouan	Perquis 15	Perquis 70
P0P1	Grandes	0,071	0,442	1,000
	Petites	0,067	0,131	0,003*
	Ensemble	0,721	0,606	0,048*
P0P2	Grandes	0,411	0,036*	-
	Petites	0,366	0,883	-
	Ensemble	0,944	0,064	-
P1P2	Grandes	0,397	0,100	-
	Petites	0,412	0,050*	-
	Ensemble	0,793	0,012*	-

Tableau 2 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre chaque point pris deux à deux, pour chaque site, en fonction ou non de la taille

		P1	P2
3 sites	Grandes	0,144	-
	Petites	0,177	-
	Ensemble	0,055	-
Artouan-	Grandes	0,188	0,256
	Petites	0,684	0,242
Perquis15	Ensemble	0,390	0,105
Artouan-	Grandes	0,090	-
	Petites	0,173	-
Perquis70	Ensemble	0,030*	-
Perquis15-	Grandes	0,494	-
	Petites	0,077	-
Perquis70	Ensemble	0,087	-

Tableau 3 : Résultats (p) de l'analyse statistique (ANOVA) de comparaison entre 2 ou 3 sites, pour chaque point, en fonction ou non de la taille

* : différence significative à un risque d'erreur de 5%.

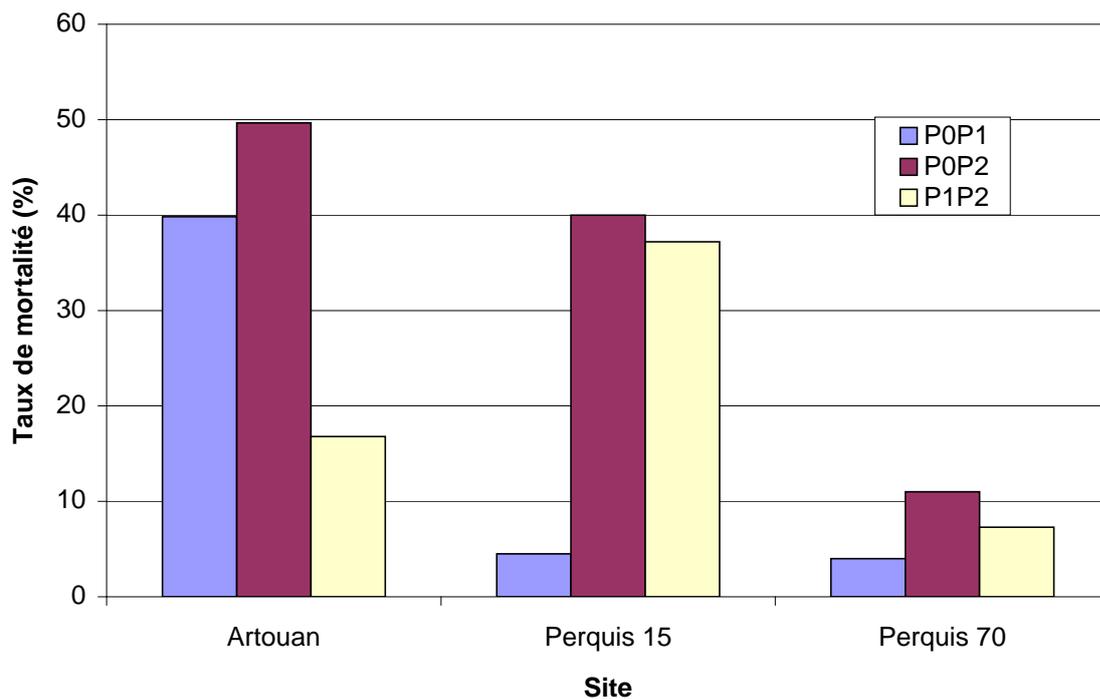


Figure 4 : Taux de mortalité (en %) des huîtres *Crassostrea gigas* en fonction du site et entre chaque point

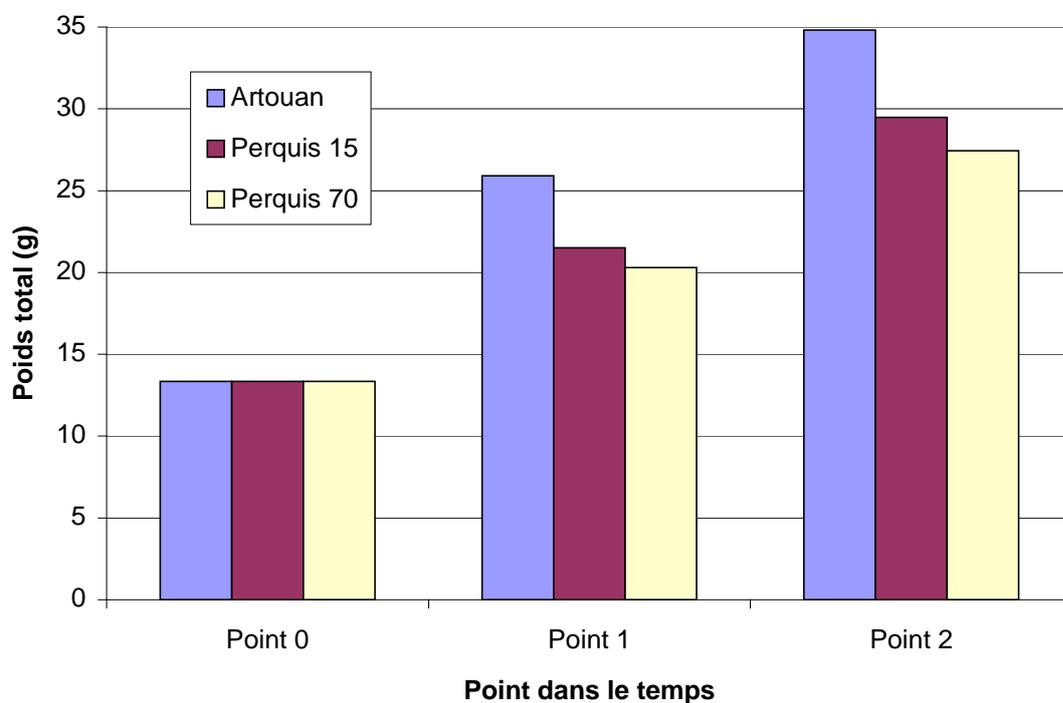


Figure 5 : Poids total (en g) des huîtres *Crassostrea gigas* en fonction du point dans le temps et du site

L'ensemble de ces analyses nous a permis de constater qu'il existait une différence significative entre les huîtres « petites » et « grandes » uniquement pour le Point 0, donc avant mise sur sites (Figure 2, Tableau 1). Entre le Point 0 et le Point 1, une différence significative du taux d'aneuploïdie a été observée pour Perquis 70 (Figure 3, Tableau 2). En effet, le taux d'aneuploïdie des huîtres sur ce site était plus faible qu'au départ, ce qui est difficilement explicable. Au Point 1, une différence significative a été observée entre les huîtres d'Artouan et celles de Perquis 70 (le taux d'aneuploïdie des huîtres d'Artouan étant plus élevé que celui de celles de Perquis 70) (Figure 3, Tableau 3). Ce plus fort taux d'aneuploïdie à Artouan au Point 1 peut peut-être être mis en relation avec le fort taux de mortalité observé avant ce point sur le site d'Artouan (Figure 4). En effet, il semblerait que la mortalité soit corrélée avec un plus fort taux d'aneuploïdie. Ainsi, le taux d'aneuploïdie des huîtres du site Perquis 15 au Point 1 est significativement différent de celui des huîtres du même site au Point 2 qui est plus élevé (Figure 3, Tableau 2) et justement la mortalité sur ce site est apparue entre le Point 1 et le Point 2 (Figure 4). Cette différence est aussi significative entre le Point 0 et le Point 2 (Figure 3, Tableau 2). Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier le taux d'aneuploïdie des huîtres en provenance de Perquis 70 au Point 2 à cause d'une erreur de manipulation lors des fixations des branchies. Il aurait été très intéressant de vérifier l'hypothèse d'une relation entre mortalité et taux d'aneuploïdie étant donné qu'un très faible taux de mortalité a été observé tout au long de l'expérience à Perquis 70 (Figure 4). Si un faible taux d'aneuploïdie avait pu être observé au Point 2 à Perquis 70 et qu'il soit identique à celui observé au Point 1, nous aurions pu confirmer cette hypothèse. Il est aussi intéressant de montrer que le poids le plus élevé au Point 1 est obtenu sur le site d'Artouan (Figure 5). La meilleure croissance est donc sur le site d'Artouan mais ceci est sûrement dû au fort taux de mortalité observé sur ce site avant le Point 1. En effet, le fort taux de mortalité a entraîné une densité plus faible, la pression trophique a ainsi diminué et la croissance des survivantes a été plus importante.

Cette étude nous a permis de montrer que le mode de culture avait une influence sur le taux d'aneuploïdie. En effet, l'élevage en poches sur des tables ostréicoles placées à 70 cm du sol semble être le meilleur mode de culture car c'est dans ces conditions que nous avons observé le plus faible taux d'aneuploïdie. Après une période de mortalité, il semblerait que le taux d'aneuploïdie des huîtres soit plus élevé. Ainsi, les animaux les plus sensibles seraient les plus aneuploïdes mais peut-être que les huîtres ne tolèrent qu'un certain pourcentage de pertes chromosomiques puis meurent.

3 Etude de l'aneuploïdie chez des huîtres *Crassostrea gigas* de la vasière de Brouage (site atelier du PEVS)

La vasière de Brouage est le site expérimental du Programme Environnement, Vie et Sociétés (PEVS). Plusieurs prélèvements ont été effectués au cours d'une année sur ce site. Cette analyse dans le milieu naturel, sur un même site, à des périodes différentes est intéressante afin de voir si le taux d'aneuploïdie des huîtres a évolué dans le temps. Nous avons quelques informations sur la teneur en différents pesticides sur ce site mais malheureusement pas au moment des prélèvements. La quantification du cadmium au sein des huîtres a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) de l'Université de La Rochelle. Quatre prélèvements d'huîtres ont été réalisés les 5 mars (PEVS 1), 17 juin (PEVS 2), et 30 septembre 2003 (PEVS 3), et le 9 février 2004 (PEVS 4). Les huîtres, provenant d'un captage naturel, ont dû être détroquées. A chaque prélèvement, une centaine d'huîtres juvéniles de taille approximativement équivalente a été conservée. Elles ont été placées dans différentes salles de l'écloserie afin de les conditionner (augmentation de température jusqu'à 15°C et addition de nourriture) excepté pour le prélèvement du mois de septembre. En effet, à cette période de l'année, l'écloserie est en vide sanitaire et les huîtres ont été placées dans des bassins extérieurs. Au bout de 3 à 4 semaines, 35 branchies d'huîtres ont été fixées par prélèvement. A chaque fois, les lames ont été réalisées à la suite des fixations. Les huîtres des deux premiers prélèvements étaient très riches en métaphase et 30 individus par prélèvement ont pu être analysés. Par contre, l'index mitotique de celles de septembre était très faible et une nouvelle fixation a été réalisée lorsque nous disposions de cultures d'algues (2 mois après le prélèvement sur le milieu). Malheureusement, l'index mitotique de ces nouvelles huîtres était à nouveau très faible et seulement 10 individus ont pu être analysés pour l'estimation de l'aneuploïdie. La Figure 6 présente les pourcentages d'aneuploïdie des huîtres aux différents points de prélèvements. Une analyse de variance a montré qu'il existait des différences significatives entre les différents points de prélèvements ($F=4,670$; $p=0,004$). Une analyse statistique plus poussée a révélé une différence significative entre mars et septembre 2003 ($F=10,38$; $p=0,003$) et les mois de mars 2003 et février 2004 ($F=9,312$; $p=0,003$) ; mais pas entre les mois de mars et juin 2003 ($F=2,274$; $p=0,137$), de juin et septembre 2003 ($F=3,349$; $p=0,071$), de juin 2003 et février 2004 ($F=1,289$; $p=0,261$) et de septembre 2003 et février 2004 ($F=3,193$; $p=0,082$). Au cours de l'année 2003, le taux d'aneuploïdie a diminué. Le plus fort taux d'aneuploïdie observé était de 18,78% en mars

2003. Au début de l'année 2004, le taux d'aneuploïdie est plus faible que l'année précédente en période hivernale. Nous avons déjà montré que l'atrazine était corrélée positivement avec le taux d'aneuploïdie chez l'huître *C. gigas* (Bouilly *et al.*, 2003). De plus, Munaron *et al.* (2003) ont montré, dans une étude portant sur l'estimation des apports d'herbicides dans le bassin de Marennes-Oléron pour l'année 2001, que les produits phytosanitaires se trouvaient en plus grande quantité en hiver (ruissellement plus important) et au printemps (période d'épandage d'avril à juillet). Ainsi, les résultats observés peuvent s'expliquer en partie avec les quantités d'atrazine retrouvées dans le milieu étant donné que le plus faible taux d'aneuploïdie est observé en période estivale (septembre 2003). Cependant, le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas a réalisé des analyses de pesticides au niveau de l'eau interstitielle des sédiments sur la vasière de Brouage en juin 2002. Ces analyses ont montré que l'atrazine était très peu présente sur ce site au moment du prélèvement (seulement $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$) et en faible quantité ($0,15 \mu\text{g l}^{-1}$) au niveau du canal de Montportail, à l'est de la radiale du PEVS, à la sortie d'une parcelle agricole drainée. Pourtant, en général, les valeurs pics en atrazine dans le milieu aquatique sont retrouvées au mois de juin. Malheureusement, nous n'avons aucune donnée sur les teneurs en pesticides dans l'eau au moment des prélèvements. Le plus faible taux d'aneuploïdie observé en février 2004 par rapport à mars 2003 pourrait peut-être s'expliquer par des précipitations plus faibles pendant l'hiver 2004 (et donc un apport plus faible en herbicides) et/ou par une diminution des quantités de pesticides (et en particulier l'atrazine) utilisées par les agriculteurs. En effet, l'interdiction totale de l'atrazine a été décidée fin 2001. Toutefois, la date limite de distribution de l'atrazine était fixée au 30 septembre 2002 et son utilisation au 30 septembre 2003. Il se peut donc que les quantités d'atrazine épandues au cours de l'été 2003 aient été moindres et donc que ce soit une des raisons pour laquelle nous observons un plus faible taux d'aneuploïdie au cours de l'hiver 2004. Nous avons aussi montré l'effet potentiel du cadmium sur l'aneuploïdie d'huîtres *C. gigas* adultes (Bouilly, 2003a). Nous avons donc évalué les teneurs en cadmium au sein des huîtres afin d'établir ou non une relation entre les concentrations en cadmium et les taux d'aneuploïdie observés. En effet, les fluctuations des taux d'aneuploïdie observés au cours du temps dépendent probablement de plusieurs facteurs environnementaux et de nombreux polluants sont présents dans le bassin de Marennes-Oléron.

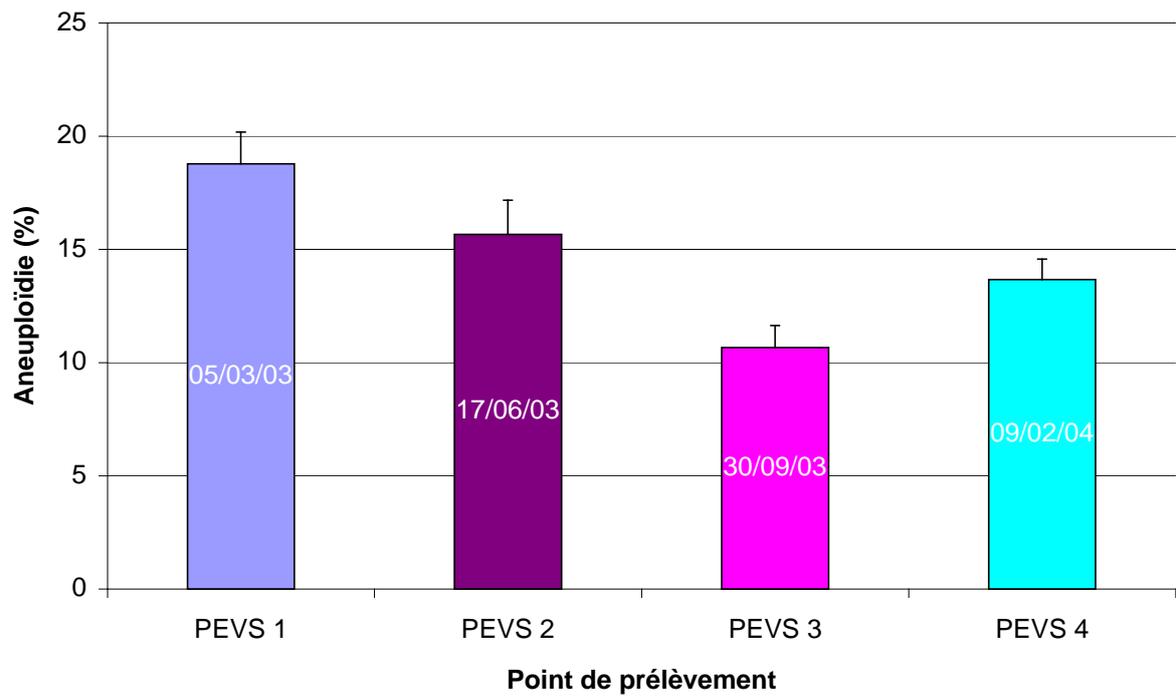


Figure 6 : Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* de la vasière de Brouage à différents points de prélèvements

Les analyses de cadmium au sein des huîtres ont été effectuées de fin avril à début mai 2004. Nous avons réalisé 5 pools de 7 huîtres par lot. Ces pools de chair d'huîtres ont été lyophilisés (Figure 7). Chaque pool d'huîtres a ensuite été broyé. Le broyage permet l'homogénéisation, il n'est pas nécessaire pour des échantillons inférieurs à 500 mg. Nous avons ensuite réalisé une minéralisation de nos échantillons. Pour cela, nous avons pesé 500 mg de poids sec par échantillon que nous avons mis dans un bécher. Deux DOLTS (DOLT-3 foie de roussette avec teneurs en métaux connues : Cd : $19,4 \pm 0,6 \text{ mg kg}^{-1}$) à 150 mg ainsi que deux blancs ont aussi été réalisés. Dans chaque bécher, nous avons ajouté 5ml d' HNO_3 14N. Tous nos béchers, recouverts d'un verre de montre, ont ensuite été placés sur une plaque chauffante à 150°C pendant 4 jours (Figure 8). A la fin de cette période, nous avons enlevé les verres de montre pour permettre l'évaporation et nous avons sorti les béchers de la plaque chauffante pour les refroidir.

Nous avons ajouté alors 10 ml d' HNO_3 0,3N dans chaque bécher. Nous avons laissé agir pendant 30 à 60 minutes puis nous avons placé chaque solution dans des flacons à scintillations. Les échantillons ont ensuite été analysés par spectrophotométrie à la flamme (Figure 9). Les résultats sont présentés sur la Figure 10. Une différence significative entre les 4 points de prélèvements a été observée ($F=20,618$; $p=0,000$). La teneur en cadmium dans les huîtres est donc différente entre chaque point excepté entre juin et septembre 2003 ($F=0,568$; $p=0,473$).



Figure 7 : Lyophilisateur contenant nos pools de chair d'huîtres dans des boîtes de Pétri



Figure 8 : Minéralisation de nos échantillons sur une plaque chauffante à 150°C



Figure 9 : Spectrophotomètre d'absorption atomique à la flamme

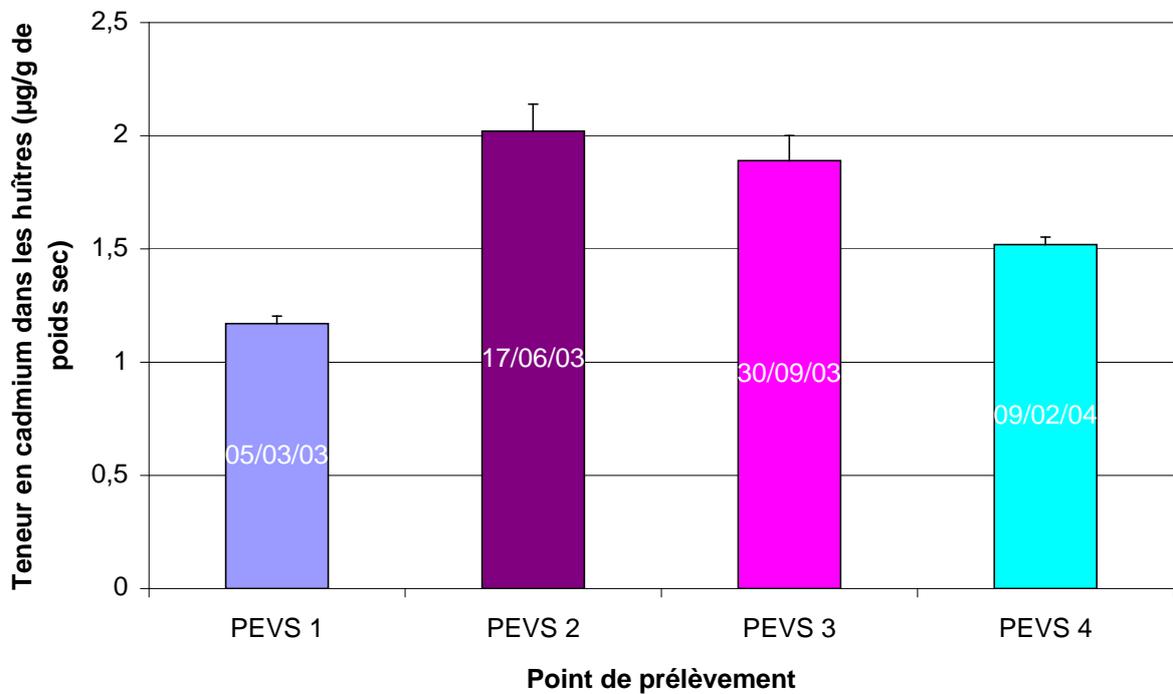


Figure 10 : Teneur en cadmium dans les huîtres *Crassostrea gigas* (en $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec) à différents points de prélèvements sur la vasière de Brouage

Nous avons observé des teneurs en cadmium au sein des huîtres plus importantes en période estivale. En effet, les teneurs en cadmium au sein des huîtres en juin 2003 et septembre 2003 étaient de 2,02 et 1,89 $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec respectivement alors qu'elles étaient de 1,17 et 1,52 $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec en mars 2003 et février 2004 respectivement. Ces résultats diffèrent de ceux d'Amiard *et al.* (1994) qui observaient des quantités en cadmium dans les tissus mous des huîtres plus élevées en période hivernale. Toutefois, leurs conditions expérimentales n'étaient pas identiques puisque les huîtres étaient en milieu contrôlé et non en milieu naturel. Le plus fort taux d'aneuploïdie a été observé au sein d'animaux ayant la plus faible teneur en cadmium. Le cadmium ne peut donc pas expliquer, en partie, les fluctuations des taux d'aneuploïdie des huîtres au cours d'une période d'un an. Plusieurs causes doivent expliquer ces variations d'aneuploïdie mais elles ne sont pas encore toutes connues ; les quantités de produits phytosanitaires (et en particulier l'atrazine) doivent en être une malgré le fait que nous n'ayons aucune donnée sur la quantité de ces produits dans l'eau ou bien dans les huîtres au moment des prélèvements.

4 Etude des facteurs génétiques

Dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire américain de l'Université de DAVIS, Californie, et de la Taylor Shellfish Farms, Washington, des analyses ont été effectuées afin de comparer le taux d'aneuploïdie (au stade naissain) de lignées consanguines d'huîtres creuses et de leurs hybrides. En effet, il a été mis en évidence un fort effet d'hétérosis sur la croissance d'animaux hybrides entre lignées consanguines (Hedgecock et Davis, 2000) et il apparaît tout à fait intéressant d'observer s'il existe une corrélation entre ce phénomène et l'aneuploïdie. Des premières analyses ont eu lieu au mois de septembre 2002 avec un séjour de trois semaines dans une éclosérie de la Taylor Shellfish Farms à Quilcene, Washington. Les lignées consanguines 6 x 6 et 16 x 16, ainsi que leurs hybrides 6 x 16 et 16 x 6 ont été étudiées. Les lignées consanguines et les hybrides 6 x 16 présentaient la même longueur moyenne de coquille et le même poids moyen. Seuls les hybrides 16 x 6 avaient une longueur moyenne de coquille plus élevée et donc un poids moyen plus élevé. Hedgecock et Davis (2000) ont montré que les hybrides ont une plus forte croissance que les consanguins. Or, notre lignée hybride 16 x 6 avait bien une croissance plus élevée que les consanguines 6 x 6 et 16 x 16 mais ce n'était pas le cas pour la lignée hybride 6 x 16. Aucune différence significative du taux d'aneuploïdie entre les lignées consanguines et leurs hybrides n'avait été

observée (Bouilly, 2003a). Etant donné qu'une des lignées hybrides avait une croissance identique à celle des consanguines, une étude complémentaire nous a semblé nécessaire pour vérifier ce résultat. Nous avons donc reçu de nouvelles lignées des Etats-Unis en octobre 2003 afin de valider ou non les premiers résultats observés. Les lignées consanguines 35 x 35 et 51 x 51 de troisième génération ainsi que leurs hybrides 35 x 51 et 51 x 35 ont été conditionnés dans le conservatoire de souches pendant 3 mois. Les fixations ont eu lieu à la mi-janvier 2004 et les lames ont été réalisées juste après. Les lames ont ensuite été lues jusqu'à la fin du mois de mars 2004. Nous voulions aussi étudier 30 huîtres juvéniles par lignée et 35 individus ont donc été fixés par lignée. Les mesures de la longueur des coquilles ainsi que le poids de chaque huître ont été effectuées. Le Tableau 4 donne la moyenne de la longueur des coquilles ainsi que le poids moyen pour chaque lignée sur les 35 huîtres étudiées ainsi que sur les 10 huîtres analysées. En effet, seulement 10 huîtres ont été analysées par lignée sur les 35 au départ car certaines huîtres étaient très pauvres en métaphases (elles avaient donc un faible index mitotique) et il était donc impossible de trouver 30 métaphases pour une grande partie des individus. Comme lors de la première expérience, ce sont à nouveau les lignées hybrides qui présentent le plus faible index mitotique.

Lignée	Moyenne longueur coquille (mm)		Moyenne Poids (g)	
	10 analysés	35 étudiés	10 analysés	35 étudiés
35 x 35	40	37,4	4,101	3,273
51 x 51	33,8	33,5	2,030	1,966
51 x 35	46,8	46,1	4,363	4,212
35 x 51	38,6	37,7	3,307	3,253

Tableau 4 : Longueur de la coquille moyenne (en mm) et poids moyen (en g) des huîtres analysées et étudiées pour chaque lignée (lignées consanguines 35 x 35 et 51 x 51, lignées hybrides 51 x 35 et 35 x 51)

La lignée consanguine 51 x 51 présente la plus faible longueur moyenne de coquille et donc le plus faible poids moyen. Par contre, l'autre lignée consanguine 35 x 35 présente la même longueur moyenne de coquille et le même poids moyen que la lignée hybride 35 x 51. Seule la lignée hybride 51 x 35 a une longueur moyenne de coquille plus élevée et donc un poids moyen plus élevé. Hedgecock et Davis (2000) ont montré que les hybrides avaient une plus forte croissance que les consanguins. Or, notre lignée hybride 51 x 35 a bien une croissance plus élevée que les consanguines 35 x 35 et 51 x 51 mais ce n'est pas le cas pour la

lignée hybride 35 x 51. Nous ne retrouvons donc pas le phénomène d'hétérosis sur la croissance normalement observé chez les hybrides, tout comme lors de la première expérience. Il aurait peut être fallu attendre que les huîtres juvéniles aient atteint une plus grande taille afin d'observer ce phénomène. La Figure 11 montre le taux d'aneuploïdie des lignées consanguines et de leurs hybrides. Aucune différence significative entre les lots n'a été observée ($F=0,635$; $p=0,597$). Si nous comparons les lignées consanguines et leurs hybrides entre elles, nous n'observons aucune différence significative ($F=0,902$; $p=0,349$). Au vu des résultats identiques obtenus pour les deux expérimentations, il n'existerait aucune relation entre la consanguinité et l'aneuploïdie. Cependant, il ne faut pas oublier que cette étude a été réalisée parce qu'une relation négative entre l'aneuploïdie et le taux de croissance a été démontrée chez des huîtres *Crassostrea gigas* (ex : Leitão *et al.*, 2001a) et que les hybrides ont normalement une croissance plus élevée que les consanguines (Hedgecock et Davis, 2000), ce qui n'était pas le cas dans nos deux études.

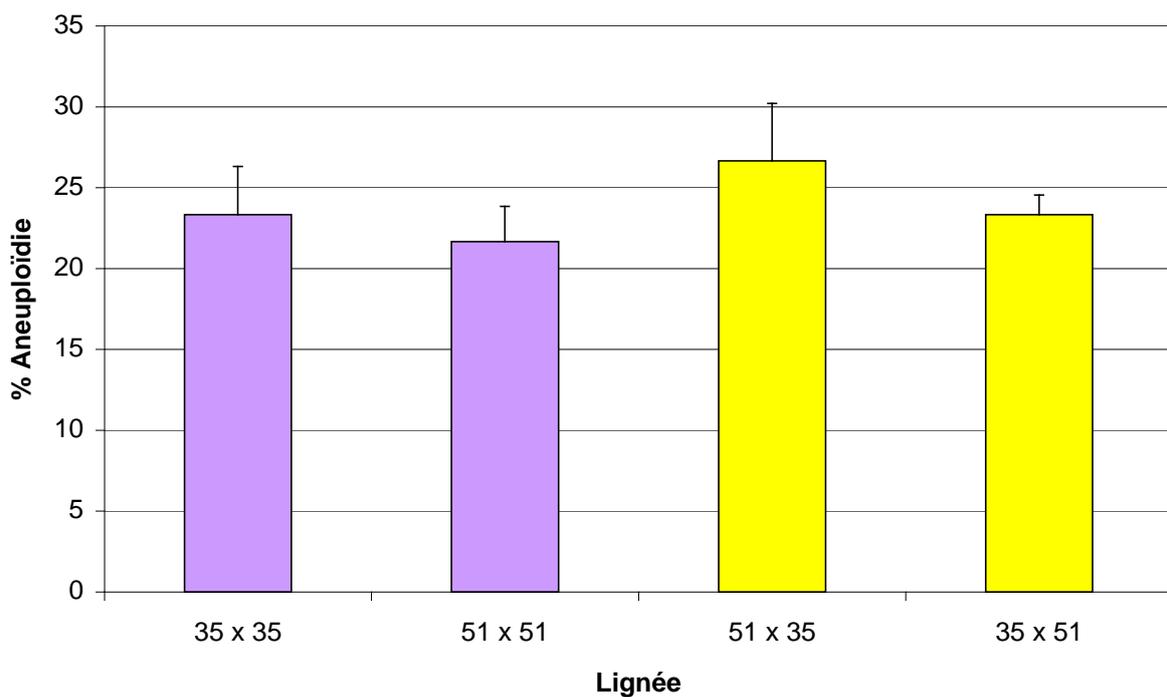


Figure 11 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* consanguines (lignées 35 x 35 et 51 x 51) et de leurs hybrides (lignées 51 x 35 et 35 x 51)

5 Identification des chromosomes manquants par digestion enzymatique

Une perte préférentielle de certains chromosomes dans les cellules aneuploïdes d'huîtres *Crassostrea gigas* a déjà été montrée par Leitão *et al.* (2001) par la technique de marquage en bandes G. En effet, seulement 4 parmi les 10 paires de chromosomes de *C. gigas* (1, 5, 9 et 10 avec des pourcentages de 56, 19, 33 et 43 respectivement) sont affectées par la perte d'un des deux homologues. Nous souhaitons savoir si les mêmes chromosomes sont affectés lorsqu'un facteur environnemental précis intervient. En d'autres termes, nous voulons savoir si l'aneuploïdie agit toujours sur les mêmes chromosomes ou bien si certains facteurs agissent sur différents chromosomes cibles. Pour cela, les chromosomes manquants dans des caryotypes aneuploïdes, obtenus à partir d'une expérience où l'atrazine a induit le phénomène de l'aneuploïdie, ont été déterminés et comparés aux chromosomes manquants dans des caryotypes aneuploïdes observés sans action de l'atrazine. Les lames des huîtres adultes ou juvéniles ayant subi une exposition à l'atrazine n'étant pas utilisables (trop peu de métaphases allongées), les lames des descendants des huîtres exposées à l'atrazine ont été utilisées pour déterminer si une induction même indirecte de l'aneuploïdie par l'atrazine touche les mêmes chromosomes. Grâce à une collaboration franco-portugaise, ces analyses ont pu avoir lieu au Centro de Genética e Biotecnologia de l'Universidade de Trás-os-Montes et Alto Douro CGB-UTAD à Vila Real (Portugal) en utilisant la technique de marquage avec des enzymes de restriction. Cette technique a déjà eu du succès chez quelques espèces de bivalves comme les moules (Martínez-Lage *et al.*, 1994), les peignes (Gajardo *et al.*, 2002) et les huîtres (Leitão *et al.*, 2004).

Les lames des descendants des huîtres exposées à l'atrazine ont été utilisées afin d'identifier les chromosomes manquants par la méthode de marquage par digestion d'enzymes de restriction car nous avons plus de matériel à disposition pour ces lots et elles étaient plus récentes. De plus, au fil du temps, l'ADN peut se dégrader donc il était préférable d'utiliser le matériel le plus récent possible. Cette technique utilisant des enzymes de restriction permet de réaliser un marquage sur les chromosomes (différent selon la paire chromosomique) et donc d'identifier chaque paire chromosomique.

Les lames ont tout d'abord été décolorées dans deux bains successifs de méthanol-acide acétique (3 : 1). Les lames ont ensuite été vieillies dans une étuve sèche à 65°C pendant 6 h. Puis, les lames ont été soumises toute la nuit à la digestion enzymatique. Nous avons utilisé l'enzyme de restriction *Hae* III. L'enzyme a été diluée dans le tampon indiqué par le

fournisseur (Invitrogen, Life Technologies) de façon à obtenir une concentration finale de 30 U pour 100 μ l. La solution avec l'enzyme de restriction ainsi préparée (100 μ l) a été dispersée sur chaque préparation chromosomique en utilisant une lamelle. La digestion s'est déroulée la nuit dans une chambre humide placée dans une étuve à 37°C. Après l'incubation, les lames ont été lavées 2 fois avec de l'eau ultra pure, à température ambiante, puis séchées. Les préparations ont ensuite été colorées pendant 20 min au Giemsa (1%).

Un microscope optique Zeiss Axioplan 2 Imaging, une caméra digitale AxioCam et le logiciel Axio Vision ont été utilisés afin de visualiser les métaphases aneuploïdes sur un ordinateur. Les caryotypes ont été réalisés à partir d'Adobe Photoshop (version 5.0). Seules les fonctions de contraste, couche et optimisation des couleurs affectant l'image entière ont été utilisées.

Nous avons analysé 26 caryotypes marqués avec l'enzyme *Hae* III mais aussi 26 caryotypes standards, c'est-à-dire réalisés en mesurant uniquement la taille des paires chromosomiques. Le test du χ^2 a été utilisé afin de comparer le pourcentage de perte de chromosomes d'une population d'huîtres où de l'aneuploïdie a été observée naturellement à notre population où l'aneuploïdie a été induite chimiquement.

L'analyse de tous les caryotypes aneuploïdes des huîtres étudiées a montré que seulement 4 des 10 paires de chromosomes (1, 5, 9 et 10) étaient affectées par la perte d'un chromosome. L'absence des deux chromosomes homologues dans une paire chromosomique n'a jamais été observée. Ainsi, une, deux ou trois paires peuvent être affectées par la perte d'un chromosome dans un caryotype (Figure 12).

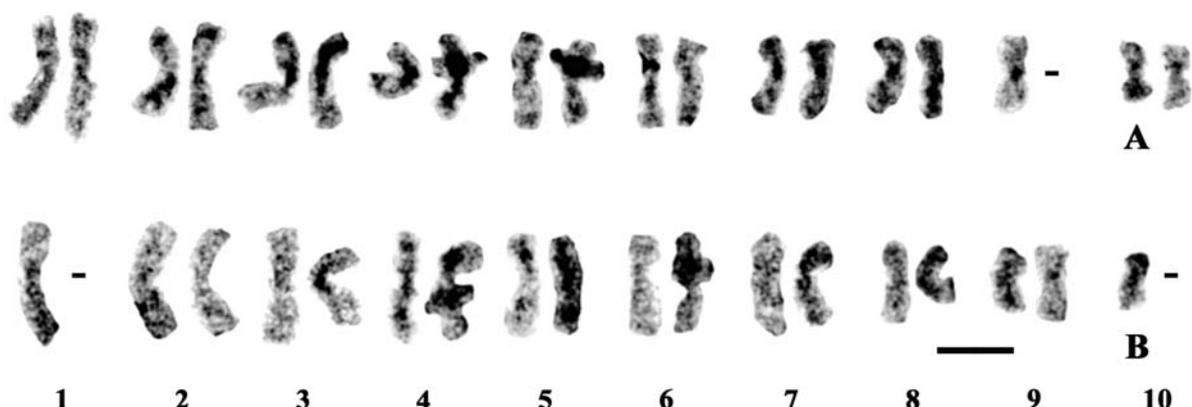


Figure 12 : Caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III chez des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées indirectement par l'atrazine. (A) Perte d'un chromosome dans la paire 9. (B) Perte de deux chromosomes dans les paires 1 et 10. Echelle = 5 μ m.

Les pourcentages de perte de chromosomes, indépendamment calculés pour chaque paire dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III sont présentés dans le Tableau 5. Parmi les 26 métaphases observées, 42 chromosomes étaient manquants étant donné que 13, 10 et 3 métaphases avec $2n=19$, 18 et 17 chromosomes respectivement ont été analysées. Différentes combinaisons de chromosomes perdus ont été observées (Figure 13). Il est intéressant de noter que la paire de chromosome 1 a été préférentiellement perdue seule en comparaison avec les paires 9 et 10, et que la perte de chromosome 5 n'a jamais été perdue seule.

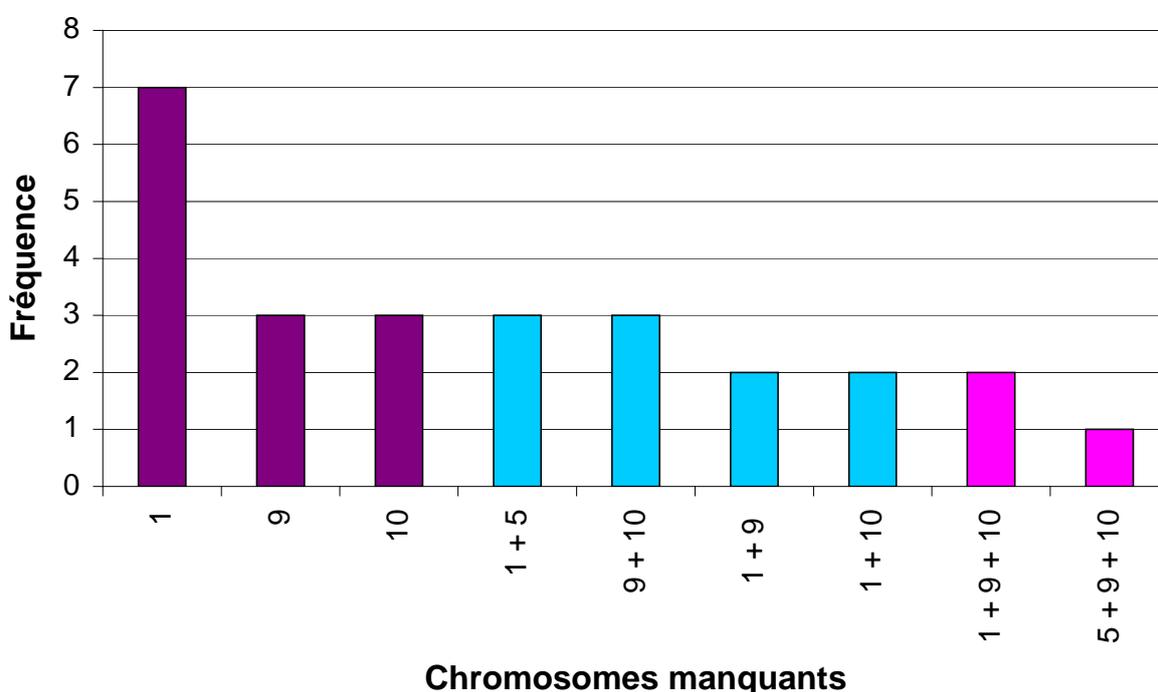


Figure 13 : Fréquence de chromosomes manquants dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III réalisés à partir de la descendance d'huîtres exposées à l'atrazine.

En parallèle, le même nombre de métaphases non marquées a été étudié afin de compléter cette étude. Ainsi, 26 caryotypes standards ont été réalisés en se basant uniquement sur la taille des chromosomes pour différencier les paires chromosomiques. Les pourcentages de perte de chromosomes étaient respectivement de 46, 4, 15 et 46% pour les paires 1, 5, 9 et 10 (Tableau). Cependant, l'identification de ces paires n'est pas aussi précise qu'avec le marquage, en particulier pour la paire 5, une paire de taille moyenne, et pour les paires 9 et 10 qui sont difficiles à différencier avec précision. Les résultats obtenus avec le marquage par

digestion enzymatique sont en accord avec ceux de Leitão *et al.* (2001c) qui ont observé, à partir de 95 caryotypes aneuploïdes marqués avec des bandes G, issus d’huîtres du milieu naturel, 56, 19, 33 et 43% de perte de chromosomes dans les paires 1, 5, 9 et 10 respectivement (Tableau). Un test de χ^2 a révélé qu’il n’existait pas de différences significatives entre la perte chromosomique induite chimiquement et la perte chromosomique naturelle. En effet, les valeurs calculées de χ^2 étaient de 0,28 ; 0,17 ; 0,84 et 0,01 pour les paires 1, 5, 9 et 10 respectivement. Ces valeurs sont toutes inférieures à la valeur critique (3,84) pour un risque d’erreur de 5%.

Tableau 5: Pourcentage de perte de chromosomes dans des cellules en métaphase de *Crassostrea gigas* pour chaque paire perdue avec trois méthodes d’analyse de caryotypes (Marquage avec enzyme de restriction *Hae* III, pas de marquage et marquage avec bandes G).

Technique	Nombre de métaphases	Nombre de chromosomes manquants	Pourcentage de perte de chromosomes dans la paire :			
			1	5	9	10
Marquage avec enzyme de restriction <i>Hae</i> III	26	42	61	15	42	42
Pas de marquage (Méthode standard)	26	29	46	4	15	46
Marquage avec bandes G (Leitão et al. 2001c)	95	143	56	19	33	43

Le marquage par digestion enzymatique a révélé des bandes claires et caractéristiques, permettant d’identifier individuellement chaque paire chromosomique. En ce qui concerne les caryotypes standards, l’identification des chromosomes homologues, réalisée seulement par mesure de la taille et de l’index centromérique, est moins évidente car cela dépend principalement du degré de condensation de la chromatine. Le modèle de marquage obtenu avec l’enzyme de restriction *Hae* III était uniforme entre les paires de chromosomes homologues, confirmant que cette technique est fiable pour des études de marquage chromosomique chez les huîtres comme démontré dans Leitão *et al.* (2004). Le pourcentage de perte de chromosome observé pour la paire 5 est significativement plus faible que ceux des paires 1, 9 et 10. Par conséquent, les paires 1, 9 et 10 peuvent être considérées comme celles affectées de manière prédominante dans les cas d’aneuploïdie induite par l’exposition à un polluant comme l’atrazine. Ce résultat est identique à celui observé par Leitão *et al.* (2001)

dans un cas d'aneuploïdie « naturelle » à partir de 95 caryotypes marqués avec des bandes G. Par conséquent, aucun effet spécifique de l'atrazine sur la perte chromosomique n'a été observé. Le marquage par digestion enzymatique est plus fiable que le marquage en bandes G car cette dernière technique de marquage classique présente quelques inconvénients tels que : répétitivité limitée, investissement lourd en terme de temps et perte de marquage parfois pendant la procédure d'hybridation par fluorescence *in situ* (Leitão *et al.*, 2004). De plus, le marquage par digestion enzymatique permet une meilleure préservation de la morphologie des chromosomes représentant un avantage supplémentaire pour l'identification des chromosomes chez les huîtres étant donné qu'il est toujours impossible de réaliser des cultures de tissus chez cette espèce. En effet, nos chromosomes sont préparés directement à partir des animaux, par conséquent, ils ont une morphologie assez pauvre par comparaison avec des chromosomes issus de cultures de tissus (Leitão *et al.*, 2004).

Un tel phénomène de perte préférentielle de chromosomes a déjà été observé chez d'autres espèces. Cieplinski *et al.* (1983) ont montré une dépendance statistiquement significative parmi les modèles de perte de chromosomes spécifiques au sein de cultures cellulaires de myélomes issus d'hybrides homme-souris, avec certains chromosomes préférentiellement retenus et d'autres perdus plus souvent que nous pourrions l'espérer sous l'hypothèse du hasard de la ségrégation. Bien que plusieurs études aient déjà montré que l'aneuploïdie pouvait être induite par des produits chimiques, en particulier chez l'homme et les rongeurs, très peu d'études existent sur l'identification des chromosomes perdus suite à une exposition à des produits chimiques. Chez les humains, les métabolites du benzène ont induit la perte d'une partie ou d'un chromosome entier des paires 5 et/ou 7 qui sont impliqués dans le développement de la leucémie myéloïde (Stillman *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998). Chez les invertébrés, aucune étude n'a encore été rapportée sur l'identification de chromosomes perdus suite à une pollution environnementale. De plus, très peu d'études ont porté sur l'identification de chromosomes dans des caryotypes aneuploïdes au sein de ce groupe d'animaux (Leitão *et al.*, 2001).

6 Publications/Colloques

K. Bouilly, **2004**. Thèse de doctorat soutenue le 10 décembre 2004: « Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron ».
Ce travail, encadré par Pierre Miramand (professeur à l'Université de La Rochelle) et Sylvie Lapègue (chercheur), a été réalisé au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER de La Tremblade. Financement du Conseil Général de la Charente-Maritime.

6.1 Publications 2004

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. **2004**. Effects of the herbicide atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Chromosome Research** 12(Suppl. 1): 140 (Abstract).

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão and S. Lapègue. **2004**. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology** 145(4): 699-705.

K. Bouilly, A. Leitão, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. **2005**. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. **Genome** 48(1): 177-180.

6.2 Communications orales et posters

Fonctionnement écologique des vasières littorales et sociétés humaines. 'Variations temporelles du taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur la vasière de Brouage et toxicité de l'atrazine et du cadmium en milieu contrôlé. K. Bouilly, M. Bonnard, A. Leitão, H. McCombie et S. Lapègue. **(La Rochelle, France) 3-4 novembre 2004.**

Second B Chromosome Conference. 'Impact of atrazine on somatic aneuploidy in cupped oysters, *Crassostrea gigas*'. K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. **(Bubión, Espagne) 26-29 juin 2004.**

15th International Chromosome Conference. 'Effects of the herbicide atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*'. K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry and S. Lapègue. **(London, Angleterre) 5-10 septembre 2004.**

7 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.
- Amiard, J. C., Métayer, C., Baud, J. P. & Ribeyre, F.**, 1994. Influence de facteurs écologiques et biologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques chez de jeunes huîtres (*Crassostrea gigas* Thunberg) au cours du prégrossissement en nourricerie. Wat. Res. 28 (1): 219-231.
- Bond, D. J. & Chandley, A. C.**, 1983. Aneuploidy. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Bouilly, K.**, 2003a. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron : aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport n°3 d'état d'avancement des travaux de thèse (juin 2003). 18 pages + annexes.
- Bouilly, K.**, 2003b. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron : aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport n°4 d'état d'avancement des travaux de thèse (novembre 2003). 24 pages + annexes.
- Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H. & Lapègue, S.**, 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology and Chemistry 22: 219-223.
- Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A. & Lapègue, S.**, 2004. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Marine Biology, published online on April 30th.
- Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Boudry P. & Lapègue, S.**, 2005. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. Genome, 48(1): 177-180.
- Cieplinski, W., Reardon, P. & Testa, M.A.**, 1983. Non-random human chromosome distribution in human-mouse myeloma somatic cell hybrids. Cytogenet. Cell Genet. 35: 93-99.

- Dixon, D. R.**, 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.* 3: 155-161.
- Gajardo, G., Parraguez, M. & Colihueque, N.**, 2002. Karyotype analysis and chromosome banding of the Chilean-Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* 21: 585-590.
- Hedgecock, D. & Davis, J. P.**, 2000. Improving Pacific oyster broodstock through crossbreeding. *Journal of Shellfish Research* 19 (1): 614-615.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193: 39-48.
- Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy level in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources* 14: 1-5.
- Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quévieux, C.**, 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genome* 44: 735-737.
- Leitão, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H. & Boudry, P.**, 2004. Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: Comparative karyological analysis within Ostreidae. *Genome*, 47 (5): 781-788.
- Li, X. X. & Havenhand, J. N.**, 1997. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Marine Biology* 127: 443-448.
- 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-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.
- Munaron, D., Scribe, P., Dubernet, J. F., Kantin, R., Vanhoutte, A., Fillon, A. & Bacher, C.**, 2003. Estimation of herbicide inputs in a sensitive area on the Atlantic coast:

- Marennes-Oleron Bay (France). Proceedings of the XII Symposium Pesticide Chemistry, 4-6 June 2003, pp 717-726.
- Stillman, W.S., Varella-Garcia, M., Gruntmeir, J.J. & Irons, R.D., 1997.** The benzene metabolite, hydroquinone, induces dose-dependent hypoploidy in a human cell line. *Leukemia* 11: 1540-1545.
- Thiriot-Quévieux, C., 1984.** Les caryotypes de quelques Ostreidae et Mytilidae. *Malacologia* 25 (2): 465-475.
- Thiriot-Quévieux, C., 1986.** Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231.
- Thiriot-Quévieux, C., Noël, T., Bougrier, S. & Dallot, S., 1988.** Relationships Between Aneuploidy and Growth Rate in Pair Matings of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75: 89-96.
- Thiriot-Quévieux, C., Pogson, G. H. & Zouros, E., 1992.** Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45.
- Vig, B. K. & Sandberg, A. A., 1987.** Aneuploidy: Part A. Incidence and Etiology. Alan R. Liss, New York.
- Zhang, L.P., Wang, Y.X., Shang, N. & Smith, M.T., 1998.** Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Res.* 22: 105-113.
- 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.