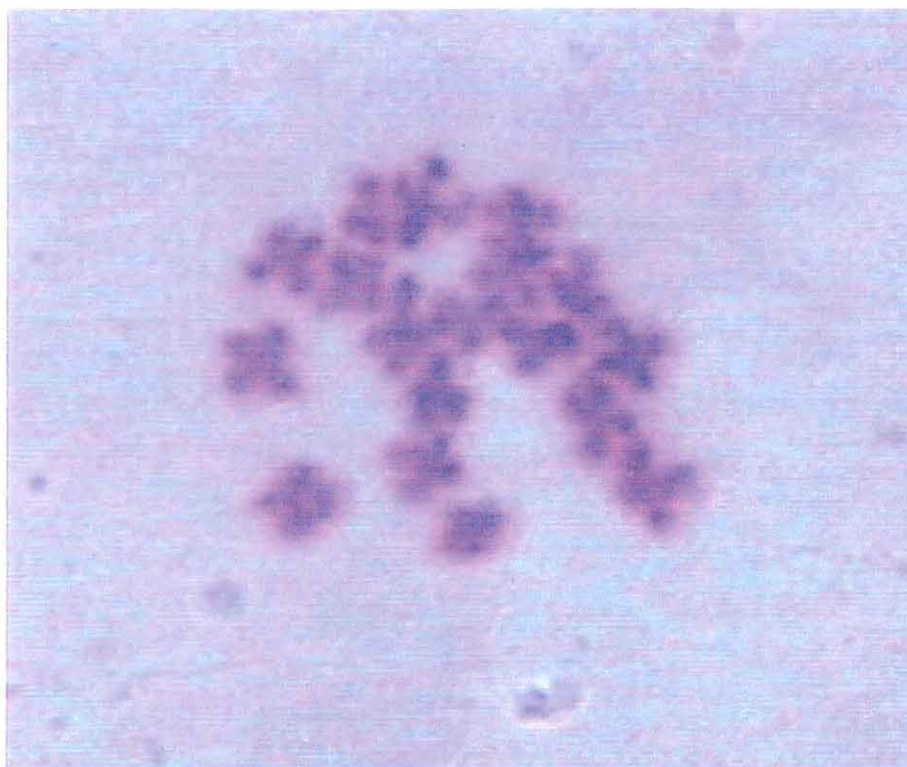




**Contrat Région Poitou-Charentes 1999
Convention 99 RPC-A-201 "Génétique"**

**Etude du niveau d'aneuploïdie dans les populations
des zones de captage du bassin de Marennes-Oléron**

**S. Lapègue¹, C. Thiriot², H. McCombie², S. Heurtebise¹, P.
Boudry¹, S. Robert³, P. Soletchnik³, P. Gouletquer³ et A. Gérard¹**



| | |
|---|---|
| (1) Laboratoire de Génétique et Pathologie | (3) Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes |
| BP 133, 17390 La Tremblade Tel. 05 46 36 98 36 Fax. 05 46 36 37 51 | |
| (2) CNRS, Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer, 06230 Villefranche sur Mer | |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| 1. CONTEXTE DE L'ÉTUDE | 3 |
| 2. ECHANTILLONNAGE DES POPULATIONS..... | 3 |
| 3. SÉLECTION DES INDIVIDUS À ANALYSER..... | 7 |
| 3.1. ANEUPLOÏDIE..... | 7 |
| 3.2. MÉTHODE D'ANALYSE DE LA COMPOSITION DE LA CHAIR D'HUÎTRE..... | 9 |
| 4. POURCENTAGE DE CELLULES ANEUPLOÏDES DANS LES POPULATIONS | 9 |
| 4.1. PROTOCOLES D'ÉTUDE | 9 |
| 4.2. RÉSULTATS ET ANALYSES..... | 12 |
| 4.2.1. Taux d'aneuploïdie | 12 |
| 4.2.2. Composition biochimique et taux d'aneuploïdie..... | 18 |
| PROTÉINES..... | 18 |
| 5. CONCLUSION | 20 |
| 6. ANNEXES | 21 |
| 6.1. ANNEXE 1 : FICHER DES POIDS INDIVIDUELS DE 200 BÊTES PAR SITE. | 22 |
| 6.2. ANNEXE 2 : PROTOCOLES | 27 |
| 6.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques | 27 |
| 6.2.2. Préparation des lames microscopiques | 31 |
| 6.3. ANNEXE 3: RÉSULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVÉS..... | 35 |

PREAMBULE

L'étude présentée ici a été réalisée en étroite collaboration avec le Laboratoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer et plus particulièrement Catherine Thiriot et Alexandre Leitao. Cette collaboration engagée depuis de nombreuses années maintenant a ainsi permis au laboratoire IFREMER Génétique et Pathologie de La Tremblade d'acquérir les compétences nécessaires dans l'étude de l'aneuploïdie.

1. Contexte de l'étude

Divers travaux, menés depuis 1984, montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ($2n = 19$, 18 ou même 17 au lieu de $2n = 20$). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial. Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les "lots de queue", c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre plus de 30 %. Récemment, une étude réalisée au sein du programme européen « GenephyS » a démontré que plus de 50 % de la variance pour la vitesse de croissance était liée au taux d'aneuploïdie. Le but de l'expérimentation menée en 1999 est de faire un état des lieux des populations du bassin de Marennes-Oléron concernant ce caractère pour savoir si certains sites peuvent être davantage touchés que d'autres.

2. Echantillonnage des populations

A la fin du printemps, du naissain de 1 an sur collecteur a été échantillonné dans différents sites de captage du bassin de Marennes-Oléron. Il s'agit des sites de Bonne-Anse, Seudre, Charente et Fouras (figure 1). Un cinquième site a également été échantillonné dans le bassin d'Arcachon, duquel nous a été fourni du naissain détroqué. Les collecteurs ou le naissain ont été fournis gracieusement par différents ostréiculteurs que nous tenons à remercier chaleureusement. Les caractéristiques liées aux différents échantillons sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons prélevés dans les différents sites.

| Site | Nature du matériel | Date de mise à l'eau des collecteurs | Date de prélèvement du matériel |
|------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Bonne-Anse | Collecteurs (10) | 3-4 août 1998 | 26 mai 1999 |
| | Collecteurs (3) | | 26 mai 1999 |
| Seudre | Collecteurs (2) | | 1er juin 1999 |
| Charente | Collecteurs (6) | 25-28 août 1998 | 1er juin 1999 |
| Fouras | Collecteurs (4) | | 1er juin 1999 |
| Arcachon | Naissain détroqué (450) | | 25 mai 1999 |

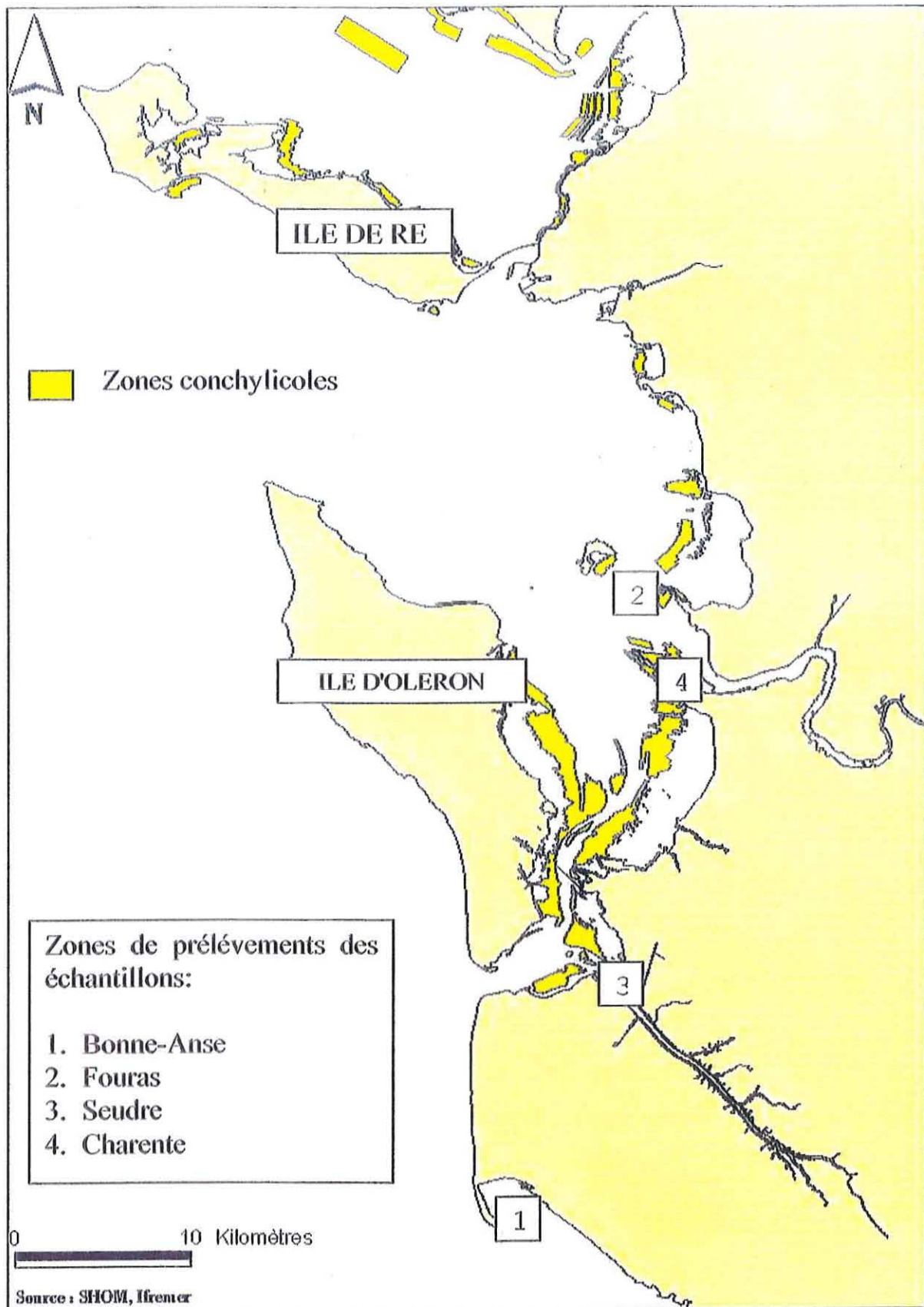
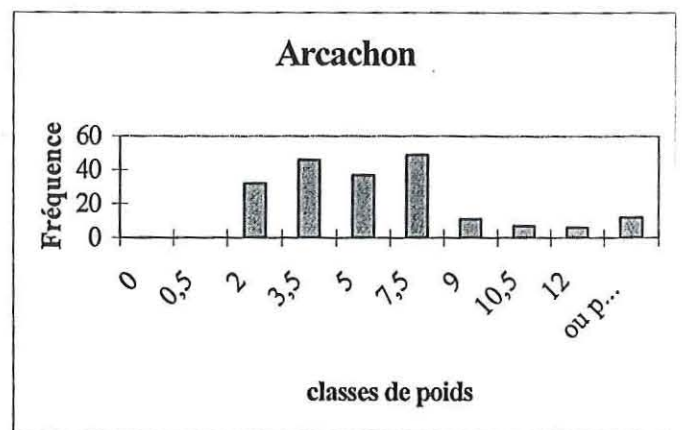
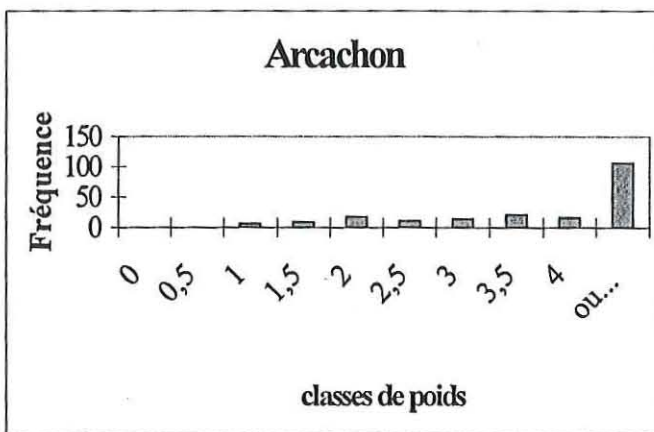
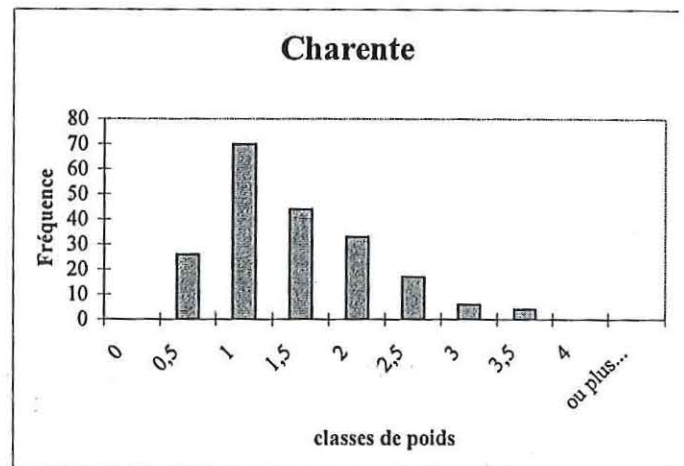
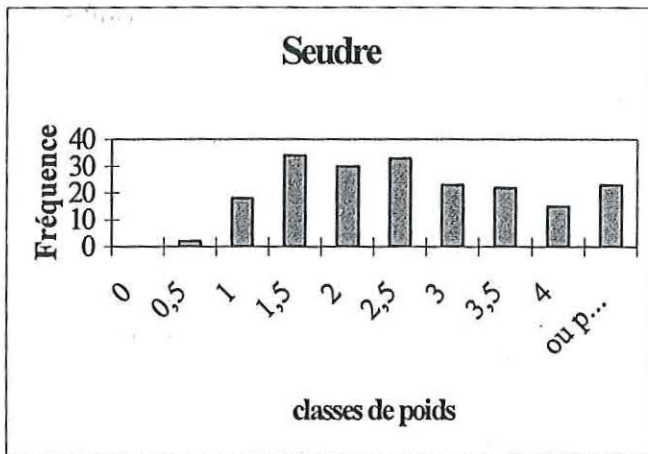
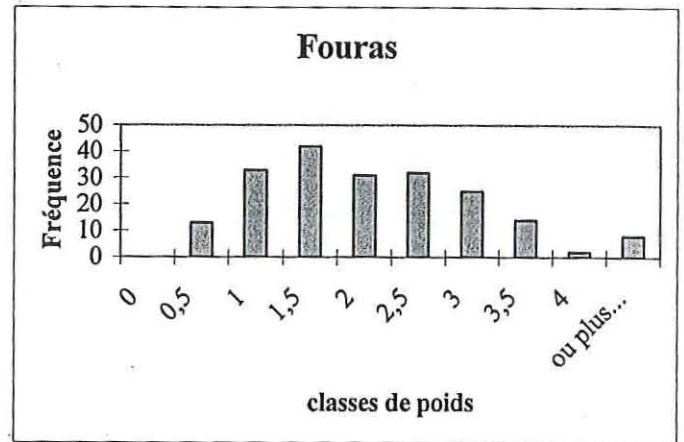
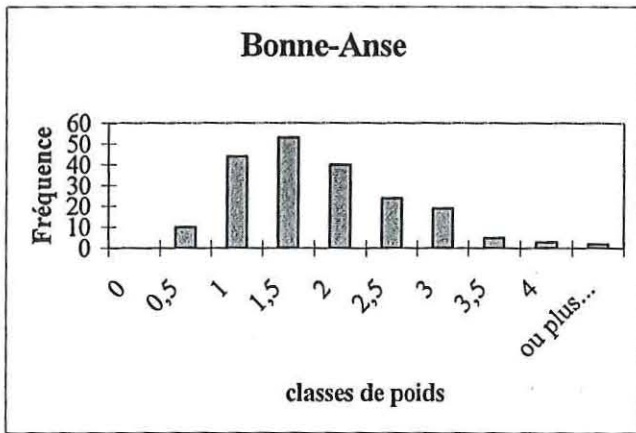


Figure 1 : Localisation des sites échantillonnés.

Les échantillons ont été placés en race-ways puis dans des bacs de 800 l dans les salles de l'écloserie de la station Ifremer de La Tremblade. Les bacs étaient alimentés en eau de mer à laquelle a été ajouté du phytoplancton sous la forme de *Skeletonema costatum*. La pousse des huîtres s'est alors poursuivie dans de bonnes conditions. Un détroquage manuel a été réalisé entre les 7 et 16 juin 1999. Les huîtres ont alors été placées dans des tamis de 2000 microns en micronurserie.

Deux cents bêtes par site, choisies aléatoirement sur les collecteurs, ont été pesées les 17 et 18 juin et mises en casiers individuels. Elles représentent la variabilité de poids du site considéré. Le fichier de pesées avec les moyennes par site est présenté dans l'annexe 1 et les histogrammes de distribution de poids sur la figure 2. Les histogrammes mettent en évidence des distributions à peu près normales des poids dans les différentes populations. La population d'Arcachon se caractérise par une taille moyenne globalement supérieure aux autres populations (d'où la double représentation de la population d'Arcachon avec différentes échelles de poids sur la figure 2) mais également plus homogène. Cette dernière caractéristique est certainement liée à l'opération de détroquage et de tri qui a été réalisée par l'ostréiculteur arcachonnais.

Figure 2 : Histogrammes de distribution des poids en grammes (17/06/1999).



3. Sélection des individus à analyser

3.1. Aneuploïdie

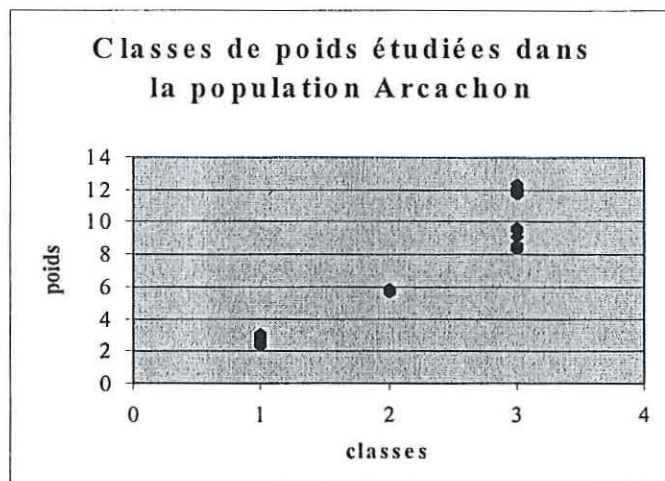
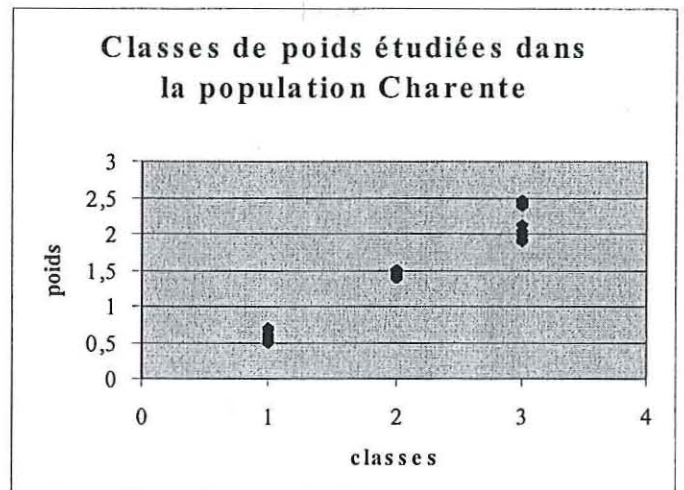
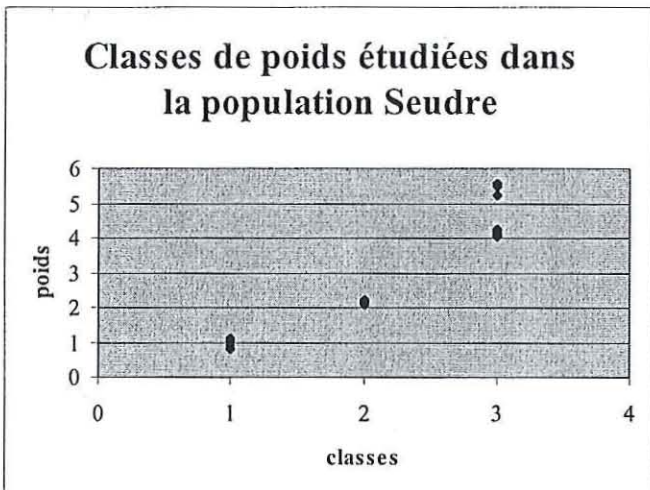
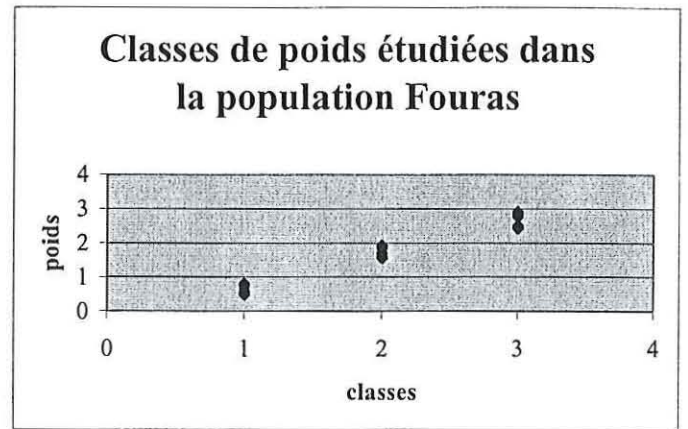
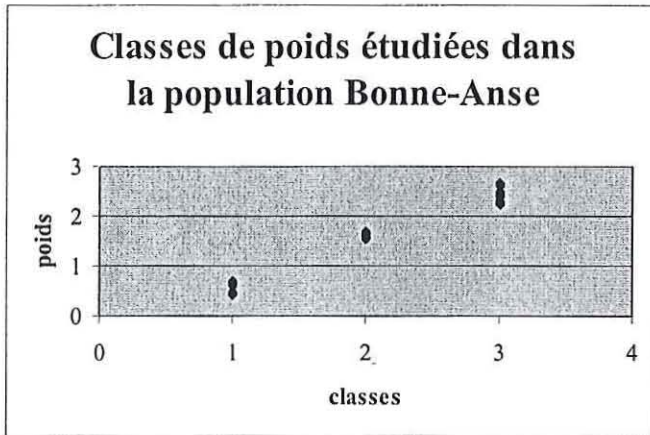
De fortes mortalités se sont produites principalement du 18 au 24 juin, aussi bien sur les individus détroqués dans les casiers individuels que sur les collecteurs non utilisés gardés dans une autre salle. Il est à noter qu'il y a eu très peu de mortes dans la population Bonne-Anse (4%), peu dans la population Seudre (9%) et beaucoup dans les populations Charente, Fouras et Arcachon (respectivement 25%, 28%, et 29%). Cet épisode de mortalité s'est arrêté au bout d'une semaine. Il est probable que le détroquage soit responsable d'une partie de ces mortalités. Cela n'expliquerait cependant pas la forte mortalité de la population Arcachon dont les animaux nous ont été fournis déjà détroqués. De plus, la présence du virus herpès a été détectée par PCR sur certains échantillons.

Etant donné le lien mis en évidence entre aneuploïdie et poids des animaux, nous avons voulu nous affranchir de ce paramètre afin de pouvoir estimer au mieux le taux d'aneuploïdie moyen d'une population. Pour cela, nous avons choisi d'étudier 30 animaux de chaque population : 10 représentant des animaux "petits", 10 des animaux "moyens", et 10 des animaux "grands". Chaque population a donc ainsi été divisée en trois classes (notées 1, 2, et 3 pour respectivement petits, moyens et grands) et des animaux représentants de chaque classe ont été choisis en se basant sur les moyennes de chaque classe. Les moyennes et écart-types des poids des animaux étudiés pour chaque classe et chaque population sont donnés dans le tableau 2. Les poids des animaux par population et par classe sont également représentés graphiquement sur la figure 3.

Tableau 2 : Moyennes et écart-types des poids (g) des animaux étudiés pour chaque classe et chaque population.

| Population | Classe | moyenne | écart-type |
|------------|--------|------------|------------|
| Bonne-Anse | 1 | 0,55763333 | 0,10608607 |
| | 2 | 1,60785455 | 0,05004007 |
| | 3 | 2,48872353 | 0,15168946 |
| Fouras | 1 | 0,63340769 | 0,14214466 |
| | 2 | 1,70695833 | 0,14926384 |
| | 3 | 2,67415385 | 0,20438619 |
| Seudre | 1 | 0,97913333 | 0,09887406 |
| | 2 | 2,16706364 | 0,04872335 |
| | 3 | 4,62790909 | 0,67339246 |
| Charente | 1 | 0,60224167 | 0,07875037 |
| | 2 | 1,455075 | 0,04501386 |
| | 3 | 2,14771818 | 0,22398217 |
| Arcachon | 1 | 2,65569091 | 0,29619881 |
| | 2 | 5,82139091 | 0,09870207 |
| | 3 | 10,0069 | 1,63028646 |

Figure 3 : Classes de poids des animaux étudiés.



3.2. Méthode d'analyse de la composition de la chair d'huître

Les analyses biochimiques de la chair ont été effectuées afin de voir si on observe des corrélations avec l'aneuploïdie. Pour ces analyses, les échantillons sont pris dans les mêmes populations et classes de taille que les échantillons pris pour l'étude sur l'aneuploïdie. Les deux parties de l'étude sont effectuées sur des animaux différents mais équivalents en taille, population, et nombre. Les analyses biochimiques de la chair sont effectuées sur des aliquotes provenant de pools effectués lors du broyage : les teneurs en protéines (prot), lipides (lip), carbohydrates (glu) et glycogène (gly) sont estimées selon les protocoles en vigueur présentés par Deslous-Paoli et Héral (1988) avec l'amélioration de la précision des teneurs en carbohydrates et en glycogène par l'analyse d'échantillons séparées (Razet et al., 1996).

4. Pourcentage de cellules aneuploïdes dans les populations

L'étude du pourcentage de cellules aneuploïdes consiste en la détermination du nombre de chromosomes dans un nombre défini de cellules et du pourcentage de cellules ayant un nombre de chromosomes inférieur à 20 (17, 18, ou 19) par rapport aux cellules ayant un nombre de chromosomes égal à 20 (20 correspondant au nombre normal de chromosomes observé chez les huîtres *Crassostrea gigas*). Afin de réaliser ces observations, différentes étapes de préparation du matériel sont nécessaires.

4.1. Protocoles d'étude

Deux grandes étapes peuvent être distinguées, l'une consistant en la préparation du matériel biologique et la seconde en la préparation des lames microscopiques sur lesquelles seront observés les chromosomes :

La préparation des huîtres pour la visualisation des métaphases somatiques correspond à la fixation de matériel biologique dans lequel se trouve des cellules permettant l'observation des chromosomes (Annexe 6.1.). Cette observation des chromosomes bien individualisés n'est possible que lors d'une étape de la mitose (division des cellules) qui est la métaphase. Les animaux sont donc placés dans une solution contenant de la colchicine, produit entraînant le blocage de la mitose en métaphase. Cette étape se déroule la nuit car le produit est photosensible et les divisions cellulaires ont été observées davantage la nuit que le jour. Ainsi, une partie des cellules (celles en division) correspond à l'échantillonnage d'observation. Après avoir réalisé plusieurs expériences pendant la nuit, nous avons mis au point un système de minuteur relié à une pompe péristaltique permettant le déroulement de l'opération sans la présence de personnel au laboratoire. Au matin, un morceau de branchie (organe en forte division) est prélevé et soumis à un choc hypotonique qui entraîne un gonflement des cellules par effet osmotique et facilite la dispersion des noyaux au moment de l'étalement sur les lames. Puis les fragments de branchies sont fixés par plusieurs bains successifs (alcool absolu - acide acétique). Ils peuvent ainsi être conservés plusieurs mois, à condition de changer régulièrement la solution fixatrice, et ce jusqu'à l'étape de préparation des lames microscopiques.

La préparation des lames microscopiques (Annexe 6.2.) consiste en l'étalement des cellules afin de réaliser la visualisation des chromosomes. Le fragment de branchie est sorti de la solution fixatrice, séché puis placé dans de l'eau acidifiée afin de provoquer un choc

osmotique facilitant la libération des noyaux du tissu branchial en cassant les membranes des lamelles branchiales et des cellules. La suspension est ensuite aspirée et projetée sur une lame microscopique préchauffée afin d'étaler le matériel, casser les membranes des noyaux, étaler les chromosomes en métaphase et ainsi faciliter la lecture. Cette étape est particulièrement délicate et demande donc une expérience assez importante. En effet, la qualité de l'étalement des noyaux et chromosomes conditionne le temps passé à la lecture des lames et au comptage des chromosomes. Après aspiration du liquide et séchage, les lames sont plongées dans une solution de Giemsa permettant la coloration de l'ADN, et séchées.

Le travail de comptage des chromosomes proprement dit peut alors commencer. Il se déroule sous microscope optique. Il s'agit tout d'abord de repérer les mitoses, ce qui constitue l'étape la plus fastidieuse. Cette étape dépend en grande partie de la qualité des étalements. Lorsqu'une mitose est repérée, la position sur la lame est notée (afin de ne pas compter plusieurs fois la même mitose) et elle est observée à plus fort grossissement ($1.25 \times 18 \times 40$). Une caméra reliée à un écran permet de mieux visualiser la mitose et de compter les chromosomes. Plusieurs difficultés peuvent être rencontrées lors du comptage des chromosomes :

- Un mauvais étalement sur toute ou une partie de la lame peut entraîner une impossibilité de lecture, malgré la présence de nombreuses métaphases (figure 4a). Ce problème d'étalement des chromosomes peut également se retrouver sur certaines mitoses et pas d'autres dans une lame par ailleurs de bonne qualité générale. La figure 4b met en évidence la différence entre une métaphase où les chromosomes peuvent être comptés (à gauche) et une où les chromosomes sont trop serrés pour être comptés (à droite).
- Plusieurs cellules en métaphase même bien étalées peuvent se retrouver par manque de chance trop proche pour que l'on puisse les distinguer l'une de l'autre (figure 4c).
- Il arrive que l'on rencontre des métaphases à moins de 17 chromosomes et des chromosomes isolés comme dans le cas de la figure 4d. Dans ce dernier cas, on peut supposer que les deux chromosomes plus à l'écart font un ensemble avec les 18 autres regroupés. Cependant, tous les cas ne sont pas aussi clairs, et dans le doute, ce genre de métaphase est éliminée du comptage.

De façon générale, les métaphases sont a priori choisies au hasard tout en privilégiant une dispersion la plus homogène des chromosomes et en éliminant les cas particuliers tels que ceux présentés précédemment.

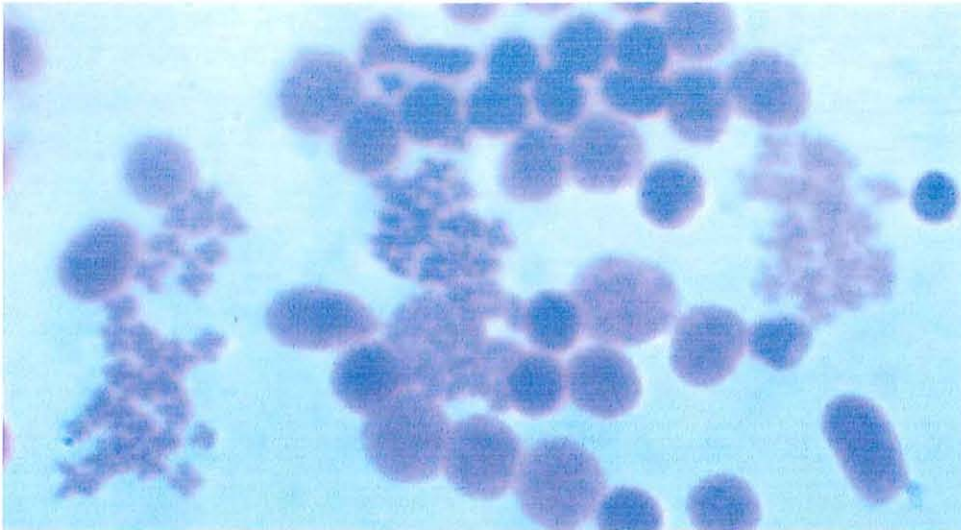


Figure 4a : Présence de nombreuses métaphases non comptables dans une zone globalement mal étalée.

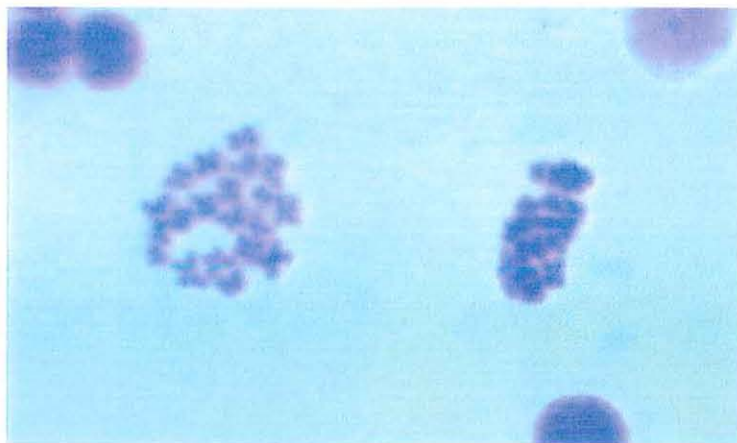
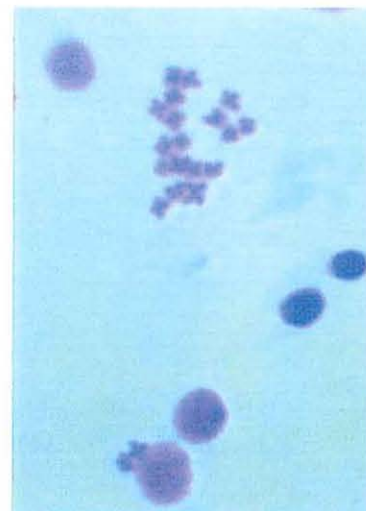


Figure 4b : Comparaison entre une métaphase bien étalée (à gauche), comptée $2n = 20$, et une trop serrée donc non comptable (à droite).



4c.



4d.

Figure 4c : Présence de deux métaphases trop proches pour être distinguées.

Figure 4d : Présence de 18 chromosomes groupés (en haut) et de deux chromosomes isolés (en bas) : métaphase écartée du comptage.

4.2. Résultats et analyses

4.2.1. Taux d'aneuploïdie

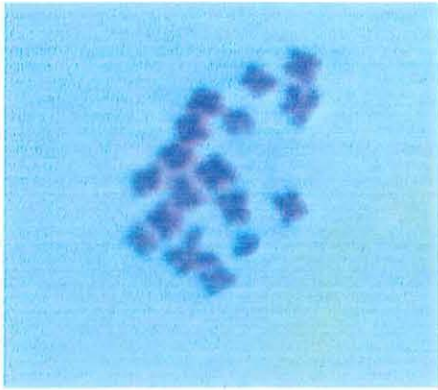
Les fixations des fragments de branchies traités à la colchicine se sont déroulées les 22 juin, 1 et 6 juillet. Les préparations de lames et les comptages de chromosomes se sont ensuite étalés de ces dates à la fin du mois d'octobre, occupant une personne à temps plein. Il s'agit en effet de la fixation de 30 échantillons par site sur 5 sites, soit 150 fixations. Une lame au minimum est nécessaire par échantillon. Si 30 mitoses n'ont pu être observées sur une première lame, une seconde voire une troisième est réalisée pour l'échantillon en question. Selon l'activité de division, le nombre de mitoses est en effet variable. Dans notre cas, une lame a été suffisante dans la plupart des cas. Cependant, deux lames ont été nécessaires pour 21 échantillons sur 150. Il est à noter que ce genre d'opération est lourd en terme de temps, nous obligeant à optimiser les protocoles d'échantillonnage. Repérer les métaphases sous le microscope est en effet la partie la plus longue, et le comptage reste ensuite délicat selon la qualité d'étalement des chromosomes donc la qualité de la préparation des lames microscopiques. Ainsi, il a été lu en général 3 lames par jour !!!

En ce qui concerne notre étude, 171 lames ont été lues, pour 150 échantillons et 30 mitoses par échantillon, soit 4500 mitoses. Afin d'éviter tout risque de biais inconscient lors du comptage des chromosomes (voir difficultés présentées précédemment), un comptage "en aveugle" a été mis en place. Il s'agit de donner un nom aux lames réalisées, puis de cacher cette identification, de réaliser les observations des métaphases, et enfin de dévoiler l'identification et dépouiller les résultats.

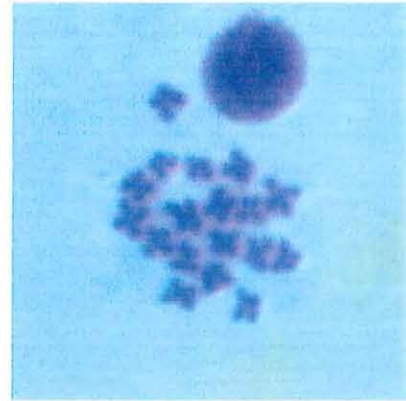
Pour chaque échantillon, 30 métaphases exploitables ont donc été étudiées et les métaphases comportant $2n = 20, 19, 18,$ ou 17 chromosomes ont été comptabilisées. Le détail des observations est donné en Annexe 6.3. La figure 5 donne un exemple des métaphases comptabilisées.

Des tests statistiques ont été utilisés afin de déterminer s'il existait une différence significative entre les taux d'aneuploïdie observés dans les sites échantillonnés d'une part et entre les classes de taille d'autre part. Il s'agit des tests d'analyse de variance et des statistiques G réalisés pour les premiers sur :

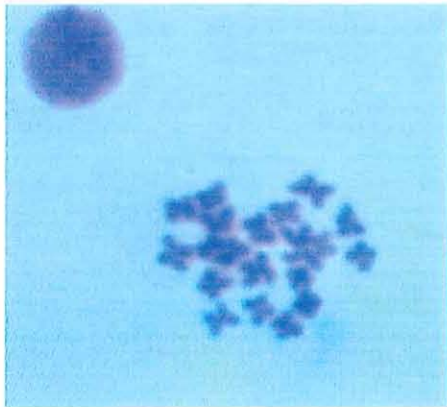
- le nombre ou le pourcentage de cellules aneuploïdes par animal entre les populations (effet population) et entre les classes de taille (effet classe de taille) ; les données ont été transformées par la fonction arcsinus afin de les normaliser,
- le nombre de chromosomes manquant (1, 2, ou 3) par animal aneuploïde, pour les secondes sur :
- la fréquence de cellules aneuploïdes par population et classe de taille,
- la fréquence de cellules aneuploïdes par combinaison entre population et classe de taille (interaction population/classe de taille).



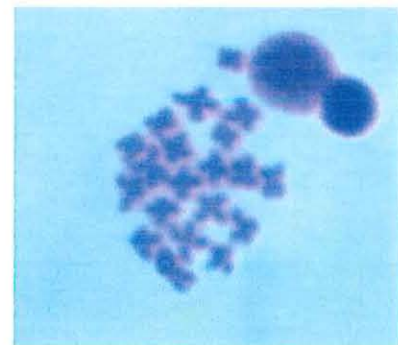
$2n = 17$



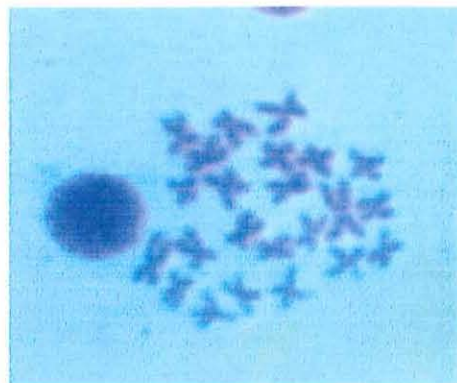
$2n = 18$



$2n = 19$



$2n = 20$



$2n = 23$

Figure 5 : Exemples d'observations réalisées au cours de l'étude : classiquement 20 chromosomes mais aussi 17, 18, ou 19 chromosomes peuvent être observés et même exceptionnellement il a été observé une métaphase à 23 chromosomes.

Le tableau 3 suivant donne les moyennes et écarts-types des taux d'aneuploïdie par population et classe de taille. Ils ont été calculés à partir des résultats de comptage présentés en Annexe 3. Ces résultats sont illustrés sur la figure 6.

Tableau 3. Résumé des moyennes et écarts-types du pourcentage d'aneuploïdie par population et classe de taille.

| Population | classe | Moyenne | écart-type |
|-------------------|---------------|----------------|-------------------|
| | 1 | 14,67 | 6,70 |
| Bonne-Anse | 2 | 9,00 | 6,68 |
| | 3 | 12,00 | 5,92 |
| | | 11,89 | 6,65 |
| | 1 | 10,33 | 9,22 |
| Fouras | 2 | 9,67 | 3,67 |
| | 3 | 17,33 | 11,95 |
| | | 12,44 | 9,34 |
| | 1 | 14,00 | 8,43 |
| Seudre | 2 | 7,67 | 5,46 |
| | 3 | 9,67 | 4,29 |
| | | 10,44 | 6,65 |
| | 1 | 13,00 | 6,18 |
| Charente | 2 | 7,33 | 7,34 |
| | 3 | 10,33 | 5,32 |
| | | 10,22 | 6,55 |
| | 1 | 14,00 | 7,66 |
| Arcachon | 2 | 8,33 | 4,23 |
| | 3 | 13,67 | 6,75 |
| | | 12,00 | 6,70 |
| Totale | | 11,40 | 7,22 |

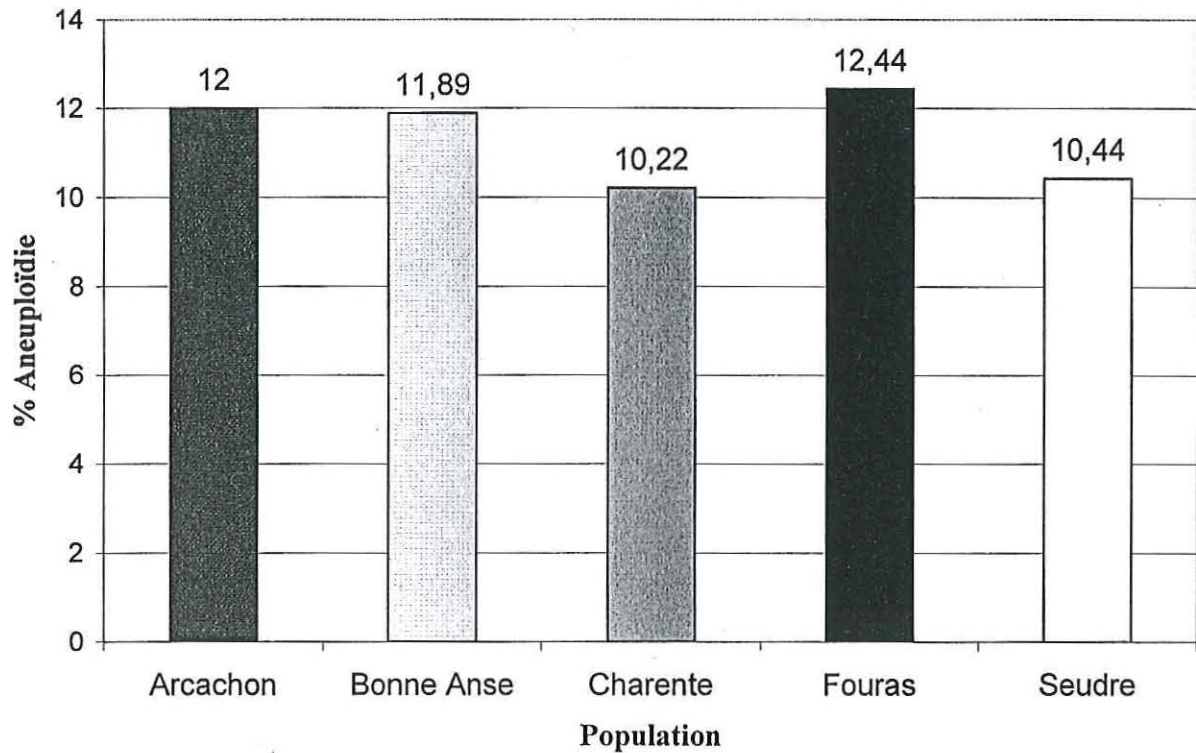


Figure 6: Taux moyen d'aneuploïdie par population

Ces résultats montrent que l'on observe de l'aneuploïdie dans chaque population et quasiment dans chaque individu : seulement 8 animaux sur 150 étudiés n'ont pas montré d'aneuploïdie lors de l'observation des 30 mitoses individuelles. Le taux moyen par population varie globalement entre 10 et 13% (voir figure 6). Des analyses statistiques réalisées par analyse de variance et tests G n'ont pas montré de différence significative entre les populations. L'analyse par le test de rang de Kruskal-Wallis (Statgraphics v 3.2) ne laisse apparaître aucune différence significative entre les différentes origines des huîtres ($p = 0,861$) (figure 7).

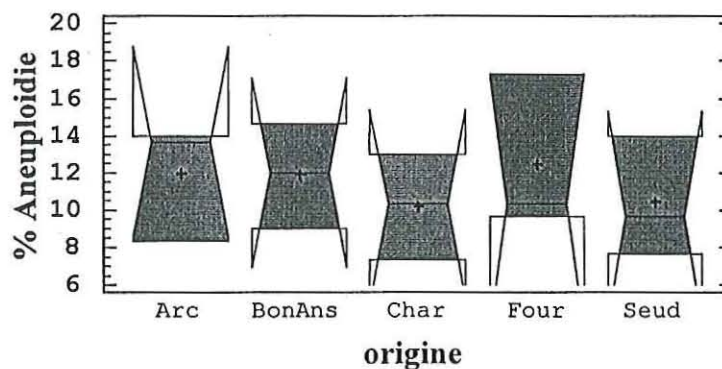


Figure 7 : Taux d'aneuploïdie par population présenté avec moyennes et quartiles

Etant donné la corrélation mise en évidence lors d'études précédentes entre le taux d'aneuploïdie et la croissance, nous avons également réalisé une comparaison entre les taux d'aneuploïdie de chaque classe de taille pour les cinq populations. Les comparaisons n'ont pas été faites individuellement mais sur l'appartenance d'un individu à une classe (petit, moyen, ou grand). Les résultats sont représentés sur les figures 8 et 9. On s'aperçoit que dans tous les cas les animaux appartenant à la classe des "moyens" sont globalement moins aneuploïdes que ceux classés "petits" ou "grands". Les tests statistiques ont montré que le nombre des cellules aneuploïdes par animal est différent entre les classes de taille. On n'observe cependant pas d'interaction entre classe de taille et population. Le nombre de chromosomes manquants n'a pas montré de différence significative entre populations ou classes de taille.

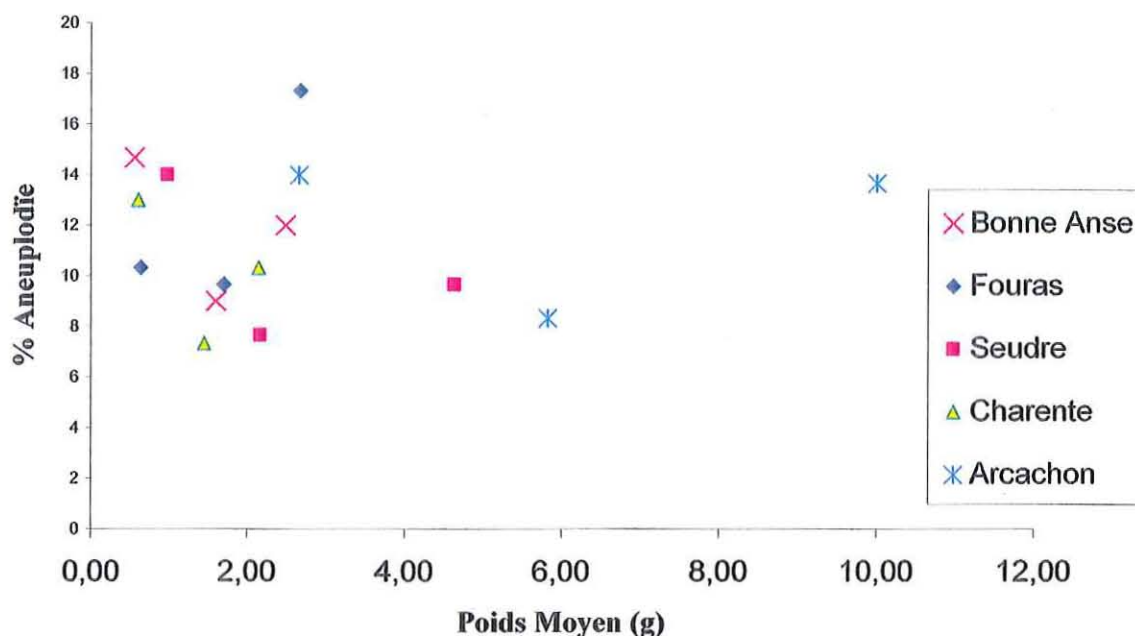


Figure 8 : Corrélation entre poids et aneuploïdie, basée sur les valeurs moyennes par population et classe de taille

Dans des études précédentes, le taux d'aneuploïdie était toujours plus faible chez les animaux à fort taux de croissance ou chez les animaux de grande taille. Dans l'étude actuelle, on observe une tendance différente : les animaux les plus petits et les plus gros ont un taux d'aneuploïdie moyen supérieur aux animaux moyens.

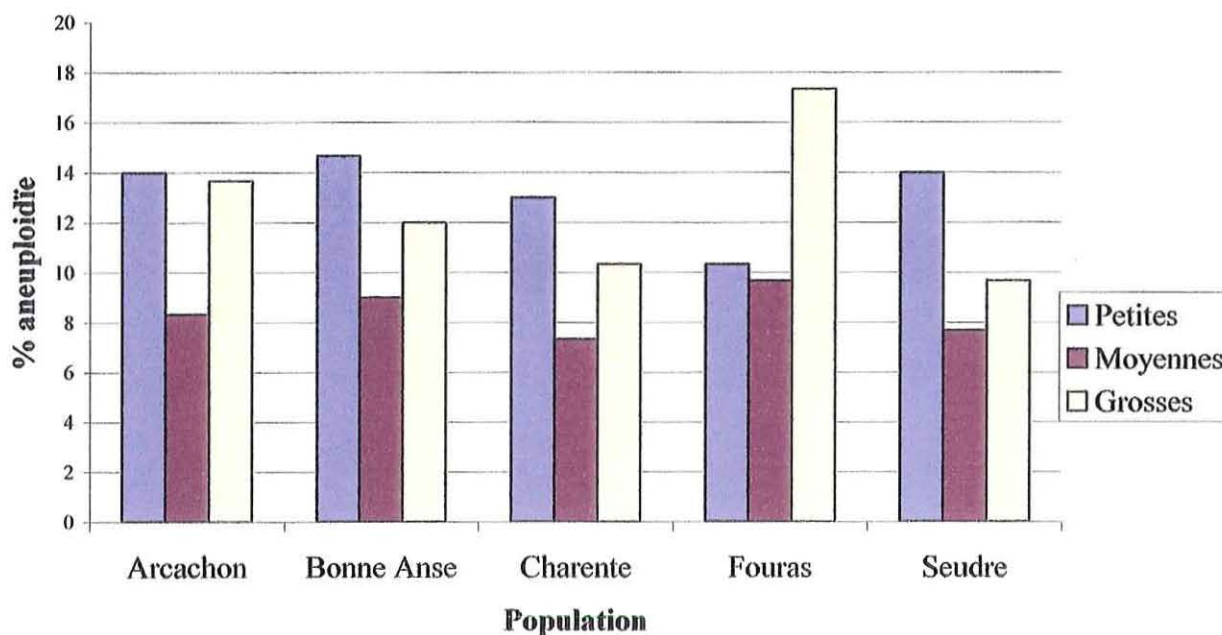


Figure 9. Taux moyen d'aneuploïdie par population et par classe de taille.

Ce résultat étonnant pourrait être dû à des mortalités différentielles chez les animaux des différentes classes. On pourrait en effet imaginer que si la mortalité touchait plus particulièrement la classe des « grands » animaux, cela pourrait s'accompagner d'un taux plus élevé d'aneuploïdie. Cependant, des mortalités importantes ont été observées seulement dans trois populations (Charente, Fouras, Arcachon) et pas de façon significativement différente selon les classes.

Les difficultés de comparaison entre classes sont certainement liées au fait qu'il s'agit de l'étude de populations naturelles. En effet, les collecteurs, placés à des dates inconnues pour la plupart, ont certainement recueillis différentes cohortes de pontes et donc des animaux d'âge différent. Les différentes classes correspondent donc probablement à des animaux d'âge et de cohortes différentes. C'est toute la difficulté d'étudier ce caractère sur des populations naturelles.

4.2.2. Composition biochimique et taux d'aneuploïdie

- Descripteurs quantitatifs ou pseudo quantitatif (e.g., le facteur "mois")

Après analyse de la matrice de corrélation des différents descripteurs quantitatifs, aucune relation ne semble exister entre le taux d'aneuploïdie et la qualité biochimique de la chair des huîtres, le mois de prélèvement (juin ou juillet) et la taille des huîtres (figure 10, tableau 4).

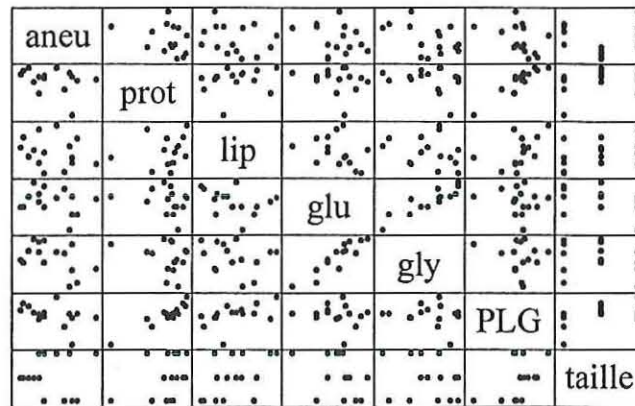


Figure 10 : Matrice de corrélation entre les différents descripteurs de l'étude.

Tableau 4 : Coefficient de corrélation entre le taux d'aneuploïdie, la composition biochimique de la chair et la taille des huîtres (n = 15).

| | R ² |
|---------------------------------|----------------|
| <i>Protéines</i> | 0,238 |
| Lipides | 0,400 |
| Glucides | 0,335 |
| Glycogène | 0,067 |
| PLG | 0,099 |
| Taille (petites, moy., grosses) | 0,760 |

- Aneuploïdie qualité de chair

Un test de rang de Kruskal-Wallis (Statgraphics v 3.2) est effectué sur le taux d'aneuploïdie, selon 2 classes de teneur en PLG de la chair des huîtres (tableau 5).

Tableau 5 : Classes de PLG.

| PLG (%) | Classe | effectif |
|---------|--------|----------|
| < 65 | 1 | 7 |
| > 65 | 2 | 8 |

La différence entre les classes n'est pas significative ($p = 0,147$) (figure 11). Les 3 tailles d'huîtres de Fourras (petites, moyennes et grosses), se retrouvent dans la première catégorie (PLG < 65 %). Les 3 tailles de Bonne Anse se retrouvent dans l'autre catégorie (PLG > 65 %)...

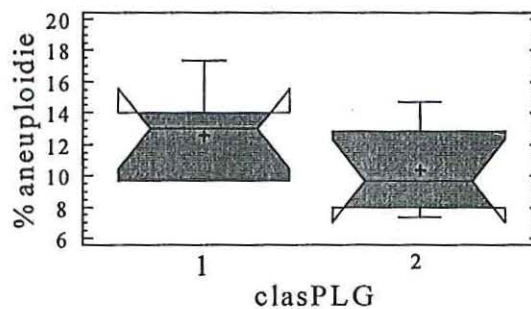


Figure 11 : Taux d'aneuploïdie et teneur en protéines, lipides, glucides de la chair de *Crassostrea gigas* sur les différents sites échantillonnés.

Un test de rang de Kruskal-Wallis (Statgraphics v 3.2) est effectué sur le taux d'aneuploïdie, selon 2 classes de teneur en glycogène de la chair des huîtres (tableau 6).

Tableau 6 : Classes de glycogène.

| Gly (%) | Classe | Effectif |
|---------|--------|----------|
| < 8 | 1 | 6 |
| > 8 | 2 | 9 |

La différence entre les classes n'est pas significative ($p = 0,098$) (figure 12).

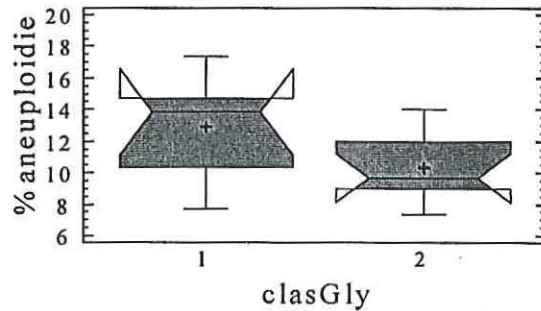


Figure 12 : Taux d'aneuploïdie et teneur en glycogène de la chair de *Crassostrea gigas* sur les différents sites échantillonnés.

5. Conclusion

Nos résultats indiquent principalement qu'il existe un taux d'aneuploïdie relativement bas dans les populations d'huîtres creuses récoltées dans les zones de captage de Marennes-Oléron (Bonne-Anse, Charente, Fouras, Seudre) et du bassin d'Arcachon. Il n'existe pas de différence significative pour ce caractère entre les cinq populations étudiées et les différences de classes de taille observées apparaissent difficiles à interpréter. A partir de nos résultats préliminaires, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre la composition biochimique des huîtres et leur taux d'aneuploïdie.

Etant donné les difficultés d'étude de ce caractère, des travaux d'ordre méthodologique doivent être réalisés afin d'optimiser l'étude de ce caractère et de pouvoir observer davantage d'individus ou de mitoses. De plus, différentes questions telles que la part génétique influençant la variabilité de ce caractère de même que la stabilité dans les différents tissus et dans le temps de ce caractère mériteront de nouvelles études dans les prochaines années.

6. Annexes

6.1. Fichier des poids individuels de 200 bêtes par site

6.2. Protocoles

6.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

6.2.2. Préparation des lames microscopiques

6.3. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

6.1. Annexe 1 : Fichier des poids individuels de 200 bêtes par site.

| Numéro individuel | Sites étudiés | | | | |
|-------------------|---------------|--------|---------|----------|----------|
| | Bonne-Anse | Fouras | Seudre | Arcachon | Charente |
| 1 | 3,5144 | 4,5466 | 10,3821 | 3,0958 | 0,2287 |
| 2 | 2,5981 | 0,9655 | 3,8635 | 3,7353 | 0,2562 |
| 3 | 1,9815 | 2,0163 | 3,1114 | 4,9834 | 1,5011 |
| 4 | 1,5132 | 2,1506 | 1,8853 | 5,8788 | 0,4451 |
| 5 | 2,9953 | 0,5001 | 2,6237 | 2,9631 | 1,5336 |
| 6 | 0,922 | 2,3741 | 1,1137 | 2,7771 | 2,0374 |
| 7 | 2,004 | 2,105 | 3,2977 | 2,3836 | 0,8297 |
| 8 | 2,4473 | 0,9908 | 1,4397 | 6,8145 | 1,3387 |
| 9 | 2,2982 | 2,6963 | 3,0615 | 3,4329 | 1,3988 |
| 10 | 0,6463 | 0,344 | 2,3547 | 7,149 | 3,1364 |
| 11 | 1,6656 | 1,9392 | 2,0878 | 5,871 | 1,3769 |
| 12 | 0,9099 | 2,3942 | 4,0459 | 3,4699 | 2,8105 |
| 13 | 2,8621 | 2,9116 | 0,7976 | 3,2211 | 1,4599 |
| 14 | 1,848 | 1,0008 | 0,5909 | 5,2039 | 0,3682 |
| 15 | 1,4551 | 1,64 | 2,2157 | 6,8836 | 0,639 |
| 16 | 1,9729 | 2,7883 | 2,3209 | 7,9297 | 0,5514 |
| 17 | 2,5732 | 1,3492 | 3,1899 | 5,186 | 0,2928 |
| 18 | 0,8842 | 2,4155 | 1,4252 | 5,6226 | 0,4286 |
| 19 | 1,0878 | 0,4957 | 2,0617 | 11,3296 | 1,9778 |
| 20 | 1,9862 | 2,8746 | 1,5118 | 10,1897 | 0,7384 |
| 21 | 1,912 | 2,469 | 1,0321 | 11,633 | 0,4636 |
| 22 | 2,6759 | 3,2466 | 6,0669 | 1,4298 | 0,8657 |
| 23 | 3,0143 | 2,8289 | 3,166 | 4,2309 | 0,7362 |
| 24 | 0,8785 | 2,8903 | 3,0071 | 4,6073 | 1,6255 |
| 25 | 2,8619 | 2,0021 | 5,2377 | 5,6679 | 3,1092 |
| 26 | 1,4952 | 1,2839 | 1,3511 | 5,8645 | 1,6214 |
| 27 | 1,6475 | 2,0653 | 1,7124 | 3,8823 | 1,0872 |
| 28 | 2,3542 | 2,4042 | 3,1763 | 5,0669 | 1,0289 |
| 29 | 1,5378 | 1,432 | 1,3197 | 2,4174 | 0,9038 |
| 30 | 3,0476 | 1,4748 | 4,5151 | 7,3508 | 0,8534 |
| 31 | 1,2146 | 0,7056 | 3,6361 | 5,3078 | 0,7416 |
| 32 | 1,4861 | 1,8292 | 2,2324 | 7,7338 | 1,0301 |
| 33 | 2,6757 | 0,5957 | 1,9734 | 17,9204 | 0,273 |
| 34 | 2,4173 | 2,5723 | 2,2356 | 5,6415 | 0,9974 |
| 35 | 1,1917 | 0,388 | 2,6438 | 3,1246 | 0,6792 |
| 36 | 4,1066 | 1,1716 | 2,2609 | 2,2769 | 0,7832 |
| 37 | 1,1936 | 2,3993 | 2,1409 | 4,7093 | 0,715 |

| | | | | | |
|----|--------|--------|--------|---------|--------|
| 38 | 1,3016 | 1,8701 | 0,7586 | 1,6792 | 0,4816 |
| 39 | 1,0933 | 1,4829 | 0,8644 | 6,3135 | 0,5851 |
| 40 | 2,9211 | 2,5736 | 1,0449 | 5,7765 | 1,43 |
| 41 | 1,235 | 2,0186 | 2,1273 | 1,9113 | 1,3519 |
| 42 | 1,3592 | 1,0575 | 1,5314 | 12,0341 | 0,7983 |
| 43 | 2,2504 | 1,7072 | 1,9058 | 6,472 | 1,6714 |
| 44 | 2,2337 | 1,627 | 1,8033 | 5,123 | 1,2096 |
| 45 | 2,5539 | 0,453 | 4,1086 | 10,2281 | 1,1832 |
| 46 | 1,5018 | 4,5413 | 1,0361 | 3,2656 | 1,3874 |
| 47 | 0,4468 | 0,809 | 4,0145 | 5,6407 | 0,3937 |
| 48 | 0,7897 | 1,6527 | 1,6138 | 6,319 | 2,143 |
| 49 | 1,0395 | 1,0781 | 2,0989 | 3,9286 | 1,9015 |
| 50 | 2,1453 | 2,0984 | 5,4859 | 3,4069 | 2,191 |
| 51 | 0,2996 | 0,498 | 2,5159 | 5,8963 | 1,7562 |
| 52 | 0,9833 | 1,0407 | 3,9805 | 5,1393 | 0,2104 |
| 53 | 1,5938 | 3,336 | 3,5318 | 5,3214 | 0,8645 |
| 54 | 3,756 | 0,7762 | 3,5347 | 4,424 | 0,7217 |
| 55 | 1,9458 | 1,6773 | 3,1072 | 4,7709 | 0,5425 |
| 56 | 0,9828 | 1,3957 | 5,737 | 5,4841 | 0,7083 |
| 57 | 2,669 | 1,9051 | 1,0372 | 6,4916 | 0,9786 |
| 58 | 1,5022 | 0,5261 | 2,7531 | 4,5879 | 3,1533 |
| 59 | 2,2465 | 0,4816 | 6,4542 | 9,4234 | 0,6982 |
| 60 | 2,8017 | 1,5638 | 2,5284 | 8,1708 | 2,1401 |
| 61 | 1,7861 | 0,6278 | 1,4518 | 3,5771 | 1,4841 |
| 62 | 2,6668 | 1,5118 | 3,4659 | 2,5664 | 0,672 |
| 63 | 1,9464 | 1,0226 | 2,2932 | 2,9204 | 1,0281 |
| 64 | 1,1337 | 0,8675 | 3,5984 | 3,1561 | 0,8339 |
| 65 | 0,9035 | 4,351 | 1,7687 | 1,3918 | 0,7257 |
| 66 | 0,83 | 2,2801 | 3,0035 | 11,6733 | 0,5977 |
| 67 | 1,5272 | 1,5632 | 1,2098 | 6,1663 | 0,176 |
| 68 | 2,4893 | 2,945 | 4,5844 | 3,6531 | 1,9798 |
| 69 | 2,1501 | 2,085 | 2,5137 | 3,4547 | 3,4189 |
| 70 | 1,6022 | 3,9354 | 3,5096 | 5,0161 | 1,1864 |
| 71 | 1,5499 | 2,0012 | 2,99 | 8,7939 | 1,3705 |
| 72 | 0,9691 | 1,5744 | 2,4263 | 5,142 | 0,7048 |
| 73 | 1,9279 | 2,6331 | 2,1001 | 5,191 | 0,5535 |
| 74 | 3,1421 | 2,1934 | 5,5625 | 3,7711 | 0,5986 |
| 75 | 1,2417 | 1,3244 | 3,1871 | 3,4137 | 0,6663 |
| 76 | 1,6305 | 1,2759 | 1,6109 | 0,7821 | 0,6474 |
| 77 | 1,0497 | 0,9452 | 4,2777 | 4,3089 | 1,4097 |
| 78 | 1,6334 | 0,8401 | 3,2139 | 1,7582 | 0,7689 |
| 79 | 2,4718 | 3,0128 | 0,9333 | 2,1989 | 0,3377 |
| 80 | 1,7495 | 0,4184 | 1,2139 | 3,3875 | 1,0854 |
| 81 | 1,4932 | 1,734 | 1,1542 | 1,5094 | 1,2283 |

| | | | | | |
|-----|--------|--------|--------|---------|--------|
| 82 | 0,7547 | 1,9273 | 1,5423 | 13,6677 | 1,9685 |
| 83 | 2,2067 | 1,3866 | 1,5638 | 8,5623 | 0,5316 |
| 84 | 0,7893 | 0,9335 | 2,3404 | 5,9361 | 0,7013 |
| 85 | 2,3177 | 0,3758 | 0,9855 | 8,2692 | 0,957 |
| 86 | 2,1636 | 2,0465 | 1,0903 | 0,9848 | 1,2212 |
| 87 | 3,5959 | 1,5772 | 1,4771 | 5,8643 | 0,7392 |
| 88 | 1,4088 | 1,9615 | 1,7733 | 5,2167 | 1,1674 |
| 89 | 0,6186 | 0,8275 | 1,5971 | 1,7478 | 2,367 |
| 90 | 2,4306 | 0,9431 | 2,219 | 5,7442 | 0,5582 |
| 91 | 1,1466 | 2,0929 | 4,1371 | 4,3199 | 1,4999 |
| 92 | 1,1684 | 4,7059 | 2,5525 | 2,4212 | 0,8159 |
| 93 | 1,6664 | 2,6223 | 3,2298 | 2,7918 | 1,7283 |
| 94 | 0,9472 | 1,6328 | 1,7624 | 4,7502 | 0,509 |
| 95 | 1,0875 | 1,3295 | 1,1543 | 6,8509 | 0,7311 |
| 96 | 1,3552 | 1,5255 | 3,4218 | 6,514 | 1,9077 |
| 97 | 1,3257 | 1,013 | 3,742 | 5,0444 | 0,9268 |
| 98 | 0,7401 | 1,0095 | 3,3684 | 3,9902 | 0,7786 |
| 99 | 0,3114 | 2,5033 | 2,8535 | 2,9652 | 1,0174 |
| 100 | 0,7693 | 0,494 | 2,0821 | 1,2569 | 1,862 |
| 101 | 1,1037 | 2,8012 | 2,2542 | 0,941 | 0,9265 |
| 102 | 6,9124 | 2,0868 | 1,0352 | 11,8593 | 1,2841 |
| 103 | 2,2712 | 3,0767 | 3,236 | 3,0021 | 1,1106 |
| 104 | 2,5974 | 1,9241 | 1,4258 | 5,0787 | 1,5652 |
| 105 | 1,4008 | 3,1943 | 3,5374 | 10,1486 | 2,3748 |
| 106 | 2,0106 | 0,4438 | 1,5989 | 11,7045 | 0,3248 |
| 107 | 1,91 | 1,301 | 3,0748 | 2,5676 | 1,5958 |
| 108 | 1,4015 | 4,0316 | 1,9677 | 13,3485 | 1,24 |
| 109 | 2,9563 | 1,2071 | 2,1188 | 7,296 | 0,6564 |
| 110 | 1,3793 | 3,3732 | 3,5303 | 1,2271 | 1,2318 |
| 111 | 1,4401 | 0,5462 | 1,4259 | 3,4575 | 2,7725 |
| 112 | 1,3796 | 0,7721 | 1,2709 | 12,3751 | 1,2619 |
| 113 | 2,536 | 1,3973 | 1 | 3,2258 | 1,8364 |
| 114 | 1,5108 | 2,8995 | 4,7914 | 7,4054 | 2,2669 |
| 115 | 0,8174 | 0,5791 | 2,3504 | 8,638 | 2,1217 |
| 116 | 1,6005 | 1,3063 | 2,8981 | 2,4677 | 1,6304 |
| 117 | 1,3996 | 1,6962 | 1,8393 | 3,7386 | 0,1549 |
| 118 | 1,0584 | 1,1542 | 1,3147 | 8,3992 | 0,5636 |
| 119 | 1,0838 | 2,7882 | 5,5785 | 7,6223 | 0,6657 |
| 120 | 0,8052 | 1,9143 | 2,7542 | 10,047 | 1,4855 |
| 121 | 2,0854 | 2,7456 | 0,8074 | 2,5492 | 0,5688 |
| 122 | 0,7579 | 2,2237 | 2,571 | 2,5681 | 0,2898 |
| 123 | 2,638 | 0,8175 | 2,9306 | 6,4987 | 0,7954 |
| 124 | 2,3889 | 2,1222 | 0,5796 | 11,4356 | 0,7764 |
| 125 | 1,8576 | 3,4267 | 0,4499 | 1,7916 | 0,9691 |

| | | | | | |
|-----|--------|--------|--------|---------|--------|
| 126 | 1,8941 | 0,4315 | 6,1672 | 3,516 | 1,6875 |
| 127 | 1,8242 | 1,2147 | 4,0641 | 14,8812 | 0,627 |
| 128 | 3,4269 | 1,1172 | 2,3379 | 4,9911 | 2,4361 |
| 129 | 0,8013 | 1,3041 | 2,8438 | 3,3638 | 1,9102 |
| 130 | 1,2693 | 0,6393 | 2,5053 | 18,474 | 1,7224 |
| 131 | 1,8741 | 1,0562 | 3,5504 | 1,054 | 1,5881 |
| 132 | 1,7007 | 2,0275 | 3,0748 | 4,1405 | 0,9657 |
| 133 | 2,2551 | 1,1793 | 1,5939 | 3,5108 | 0,285 |
| 134 | 1,2632 | 1,6508 | 1,4428 | 1,9988 | 0,8168 |
| 135 | 2,5223 | 1,2283 | 4,2424 | 9,1147 | 1,4486 |
| 136 | 1,0011 | 4,2423 | 2,6821 | 2,8392 | 1,3003 |
| 137 | 2,5148 | 0,8854 | 4,1752 | 5,5393 | 0,8752 |
| 138 | 1,3146 | 1,4824 | 3,8353 | 6,343 | 0,3691 |
| 139 | 0,9497 | 2,6665 | 2,5647 | 5,8942 | 0,3104 |
| 140 | 1,4019 | 1,0538 | 2,2009 | 2,7475 | 1,6515 |
| 141 | 2,1995 | 3,001 | 1,0507 | 3,5483 | 0,8403 |
| 142 | 1,2003 | 2,5974 | 1,2119 | 3,8403 | 1,6113 |
| 143 | 0,9807 | 3,1036 | 1,0022 | 1,8151 | 0,8892 |
| 144 | 0,7942 | 0,7855 | 0,9989 | 3,4215 | 1,4757 |
| 145 | 2,6936 | 2,1024 | 2,5736 | 2,348 | 2,0455 |
| 146 | 2,0311 | 1,9927 | 2,1728 | 1,7521 | 1,3345 |
| 147 | 1,8568 | 1,0224 | 1,6745 | 5,4418 | 1,4228 |
| 148 | 1,5928 | 2,7272 | 1,6789 | 5,3571 | 0,8414 |
| 149 | 1,2025 | 0,696 | 2,3961 | 1,6536 | 2,9794 |
| 150 | 1,0456 | 2,4775 | 2,2626 | 4,2005 | 2,0758 |
| 151 | 0,4176 | 3,2731 | 0,9131 | 1,6288 | 0,3649 |
| 152 | 1,6192 | 2,5285 | 2,1003 | 7,8431 | 1,2903 |
| 153 | 1,117 | 0,1243 | 3,3252 | 4,8154 | 0,6069 |
| 154 | 0,5419 | 1,5515 | 4,4525 | 3,8461 | 0,1917 |
| 155 | 0,4287 | 1,5308 | 2,7215 | 14,3014 | 0,5293 |
| 156 | 0,8936 | 0,6755 | 1,1391 | 2,9682 | 1,4192 |
| 157 | 0,6575 | 0,7695 | 0,5057 | 2,1418 | 2,1191 |
| 158 | 0,4306 | 2,9166 | 3,7135 | 2,7054 | 1,0031 |
| 159 | 1,0924 | 0,8328 | 1,7981 | 2,2169 | 1,1848 |
| 160 | 0,7153 | 2,4467 | 0,7692 | 9,6697 | 0,2369 |
| 161 | 0,6134 | 4,0484 | 1,7034 | 3,2281 | 1,2932 |
| 162 | 2,1235 | 0,9119 | 2,8211 | 4,8285 | 0,3115 |
| 163 | 0,7224 | 1,8662 | 2,1991 | 1,3618 | 1,1218 |
| 164 | 1,7217 | 1,645 | 2,3454 | 1,8179 | 2,4615 |
| 165 | 1,5622 | 3,1859 | 4,2691 | 2,3435 | 1,7282 |
| 166 | 0,9837 | 2,9095 | 0,9492 | 1,6014 | 1,9091 |
| 167 | 1,6279 | 0,6648 | 1,9723 | 4,1924 | 2,0933 |
| 168 | 0,5999 | 2,4155 | 1,3929 | 1,9317 | 1,1846 |
| 169 | 1,0435 | 0,8537 | 1,7408 | 7,0035 | 2,3757 |

| | | | | | |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 170 | 0,8499 | 0,8631 | 2,1068 | 1,1931 | 0,9589 |
| 171 | 0,99 | 1,3922 | 1,4699 | 7,1321 | 1,4761 |
| 172 | 0,5333 | 1,0385 | 2,7072 | 3,7994 | 0,366 |
| 173 | 0,8742 | 1,3563 | 1,9335 | 1,1422 | 0,7411 |
| 174 | 0,72 | 1,3704 | 1,3846 | 2,6601 | 0,6747 |
| 175 | 1,4807 | 3,4519 | 1,6326 | 3,8347 | 2,9762 |
| 176 | 1,1248 | 1,4786 | 1,324 | 4,1609 | 0,2831 |
| 177 | 0,4858 | 1,1789 | 3,989 | 3,2038 | 0,6444 |
| 178 | 1,5014 | 3,8077 | 2,3592 | 4,1245 | 1,743 |
| 179 | 1,1948 | 2,495 | 1,8561 | 1,2672 | 1,8706 |
| 180 | 0,7025 | 1,5545 | 0,7876 | 17,4012 | 0,6681 |
| 181 | 0,6369 | 3,0599 | 2,104 | 2,2781 | 1,6903 |
| 182 | 0,5756 | 0,6343 | 3,4749 | 4,8216 | 2,4494 |
| 183 | 0,6059 | 2,7588 | 3,2914 | 0,7246 | 2,7953 |
| 184 | 1,3551 | 2,164 | 5,033 | 0,9339 | 0,8779 |
| 185 | 1,0055 | 0,8119 | 1,1336 | 5,466 | 1,3836 |
| 186 | 1,4881 | 0,8113 | 2,7456 | 13,6493 | 0,8539 |
| 187 | 0,4186 | 3,0889 | 1,8086 | 12,5762 | 0,1947 |
| 188 | 3,2836 | 1,2857 | 3,5053 | 3,5902 | 1,5168 |
| 189 | 1,0704 | 1,3248 | 1,4735 | 3,3508 | 1,9826 |
| 190 | 0,3374 | 0,4515 | 0,7407 | 14,1044 | 2,1297 |
| 191 | 0,3833 | 2,2495 | 2,3817 | 0,9804 | 0,6305 |
| 192 | 0,9712 | 1,5801 | 1,5805 | 3,4999 | 2,5601 |
| 193 | 1,9204 | 1,4228 | 0,9034 | 1,6456 | 0,8147 |
| 194 | 0,7168 | 2,9249 | 2,2315 | 8,6199 | 1,2634 |
| 195 | 0,7275 | 1,5679 | 0,4709 | 4,7944 | 0,7962 |
| 196 | 1,2499 | 2,7145 | 0,9028 | 4,55 | 1,5674 |
| 197 | 1,4392 | 4,0533 | 3,1653 | 5,9574 | 1,567 |
| 198 | 1,1737 | 2,2988 | 1,2599 | 3,1001 | 0,9843 |
| 199 | 1,2581 | 2,2372 | 1,4984 | 1,7753 | 0,6505 |
| 200 | 1,5019 | 1,1572 | 2,5187 | 1,5459 | 1,7043 |
| MOYENNE | 1,57342965 | 1,813628 | 2,404477 | 5,155459 | 1,210135 |

6.2. Annexe 2 : Protocoles

6.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

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 H₂O **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 H₂O 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 H₂O 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.

100 ml solution « fille » (faite le soir juste avant de lancer le traitement)
= 5 ml solution « mère »
+ 95 ml H₂O de mer avec *Isochrisis*

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 H₂O 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 POWDRES.

b) Numérotter 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 H₂O 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, 6 000 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.

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),
- Epruvettes 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

ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

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 filtrée et *Isochrisis* (voir Fiche 1).

Ce mélange est fait dans un bêcher 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 leur laisser de l'espace pour s'ouvrir et filtrer. La solution est ajoutée et le bulleur mis en marche pour aérer l'eau.

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 suivante :

- 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 les 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.

6.2.2. Préparation des lames microscopiques

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

Les lames peuvent être préparées à partir de 24 heures après la fin de fixation (Penser à préparer des lames propres à l'avance (voir plus bas)!!!).

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 pasteur
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.

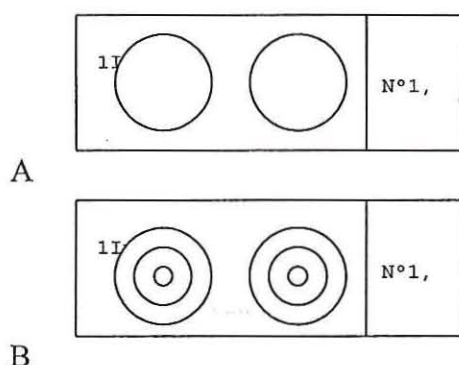
Remettre le reste des branchies dans le tube, remplir avec du fixateur frais et remettre le tube au réfrigérateur.

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 40cm. 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 gants pour éviter de salir les lames.

Nettoyage à l'acide chlorhydrique des lames avant utilisation pour l'étude de l'aneuploïdie

Les lames sont trempées du soir au matin dans un mélange (9/1) d'alcool 90/95 %/acide chlorhydrique (HCl). Pour mélanger les deux solutions, ajouter doucement l'acide à l'alcool. La solution va fumer donc faire cette étape sous la hotte. Utiliser comme stockage une boîte plastique qui ferme.

Retirer les lames du bain d'acide (le bain peut être gardé et réutilisé). Les mettre dans un porte-lames et les rincer sous le robinet légèrement ouvert pendant 24 heures. (En cas d'urgence 16-18 h suffisent).

Les lames sont ensuite stockées dans un bain d'alcool à 90 % jusqu'à leur utilisation.

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
- 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

ATTENTION : GIEMSA EST UN PRODUIT TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

Après avoir fixé les chromosomes, les lames sont mises dans le bain à lames. Pour 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. 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.

6.3. Annexe 3: Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

| Population | | | | Nombre de chromosomes | | | | Aneuploïdie | | | Moyennes | |
|------------|------|------------------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|----------|--------------|------------|---------|
| Nom | code | classe de taille | animal | 2n=20 | 2n=19 | 2n=18 | 2n=17 | total | Nb lames | %aneuploïdie | par classe | par pop |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 1 | 26 | 4 | | | 4 | 2 | 13,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 2 | 23 | 3 | 4 | | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 3 | 25 | 4 | 1 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 4 | 24 | 6 | | | 6 | 2 | 20 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 6 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 7 | 25 | 5 | | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 8 | 23 | 5 | 2 | | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 9 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 10 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 1 | 11 | 26 | 4 | | | 4 | 1 | 13,33 | 14,67 | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 1 | 29 | 1 | | | 1 | 2 | 3,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 2 | 23 | 6 | 1 | | 7 | 2 | 23,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 3 | 27 | 1 | 2 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 4 | 27 | 2 | | 1 | 3 | 2 | 10 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 5 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 6 | 29 | 1 | | | 1 | 2 | 3,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 7 | 25 | 2 | 2 | 1 | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 8 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 9 | 28 | 1 | | 1 | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 2 | 10 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 3,33 | 9,00 | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 1 | 25 | 2 | 2 | 1 | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 2 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 3 | 28 | | 2 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 4 | 26 | 1 | 2 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 5 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 6 | 26 | 2 | 0 | 2 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 7 | 24 | 5 | 1 | | 6 | 2 | 20 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 8 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 9 | 24 | 4 | 1 | 1 | 6 | 1 | 20 | | |
| Bonne Anse | 1 | 3 | 10 | 26 | 2 | 2 | | 4 | 1 | 13,33 | 12,00 | 11,89 |

| Population | | | | Nombre de chromosomes | | | | Aneuploidie | | | Moyennes | |
|------------|------|------------------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|----------|--------------|------------|---------|
| Nom | code | classe de taille | animal | 2n=20 | 2n=19 | 2n=18 | 2n=17 | total | Nb lames | %aneuploidie | par classe | par pop |
| Fouras | 2 | 1 | 1 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 2 | 23 | 4 | 2 | 1 | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 3 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 4 | 23 | 5 | 2 | | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 5 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 6 | 29 | | 1 | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 7 | 24 | 5 | 1 | | 6 | 2 | 20 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 8 | 30 | | | | 0 | 2 | 0 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 9 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | | |
| Fouras | 2 | 1 | 10 | 28 | 2 | | | 2 | 2 | 6,67 | 10,33 | |
| Fouras | 2 | 2 | 1 | 27 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 2 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 3 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 4 | 25 | 3 | 2 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 5 | 26 | 3 | 1 | | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 6 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 7 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 8 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 9 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 2 | 10 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | 9,67 | |
| Fouras | 2 | 3 | 1 | 22 | 5 | 2 | 1 | 8 | 1 | 26,67 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 2 | 25 | 3 | 2 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 3 | 24 | 3 | 2 | 1 | 6 | 2 | 20 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 4 | 20 | 8 | 2 | | 10 | 2 | 33,33 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 5 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 6 | 19 | 8 | 2 | 1 | 11 | 2 | 36,67 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 7 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 8 | 25 | 5 | | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 9 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Fouras | 2 | 3 | 10 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | 17,33 | 12,44 |

| Population | | | | Nombre de chromosomes | | | | Aneuploïdie | | | Moyennes | |
|------------|------|------------------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|----------|--------------|------------|---------|
| Nom | code | classe de taille | animal | 2n=20 | 2n=19 | 2n=18 | 2n=17 | total | Nb lames | %aneuploïdie | par classe | par pop |
| Seudre | 3 | 1 | 1 | 24 | 4 | 1 | 1 | 6 | 2 | 20 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 2 | 22 | 6 | 2 | | 8 | 1 | 26,67 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 3 | 23 | 7 | | | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 4 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 2 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 5 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 6 | 23 | 7 | | | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 7 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 8 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 9 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Seudre | 3 | 1 | 10 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | 14,00 | |
| Seudre | 3 | 2 | 1 | 24 | 5 | 1 | | 6 | 1 | 20 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 2 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 3 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 4 | 27 | 1 | 2 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 5 | 27 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 6 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 7 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 8 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 9 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Seudre | 3 | 2 | 10 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | 7,67 | |
| Seudre | 3 | 3 | 1 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 2 | 25 | 5 | | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 3 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 4 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 5 | 27 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 6 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 7 | 29 | | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 8 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 9 | 27 | 1 | 2 | | 3 | 2 | 10 | | |
| Seudre | 3 | 3 | 10 | 26 | 3 | 1 | | 4 | 1 | 13,33 | 9,67 | 10,44 |

| Population | | | | Nombre de chromosomes | | | | Aneuploïdie | | | Moyennes | |
|------------|------|------------------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|----------|--------------|------------|---------|
| Nom | code | classe de taille | animal | 2n=20 | 2n=19 | 2n=18 | 2n=17 | total | Nb lames | %aneuploidie | par classe | par pop |
| Charente | 4 | 1 | 1 | 24 | 1 | 5 | | 6 | 1 | 20 | | |
| Charente | 4 | 1 | 2 | 26 | 1 | 3 | | 4 | 2 | 13,33 | | |
| Charente | 4 | 1 | 3 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Charente | 4 | 1 | 4 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Charente | 4 | 1 | 6 | 25 | 3 | 1 | 1 | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Charente | 4 | 1 | 7 | 25 | 3 | 2 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Charente | 4 | 1 | 8 | 27 | 2 | | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Charente | 4 | 1 | 9 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Charente | 4 | 1 | 10 | 24 | 4 | 2 | | 6 | 1 | 20 | | |
| Charente | 4 | 1 | 11 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | 13,00 | |
| Charente | 4 | 2 | 1 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Charente | 4 | 2 | 2 | 23 | 5 | 1 | 1 | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Charente | 4 | 2 | 3 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Charente | 4 | 2 | 4 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Charente | 4 | 2 | 5 | 28 | 1 | | 1 | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Charente | 4 | 2 | 6 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | | |
| Charente | 4 | 2 | 7 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Charente | 4 | 2 | 8 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Charente | 4 | 2 | 9 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | | |
| Charente | 4 | 2 | 10 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | 7,33 | |
| Charente | 4 | 3 | 1 | 25 | 3 | 1 | 1 | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Charente | 4 | 3 | 2 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Charente | 4 | 3 | 3 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Charente | 4 | 3 | 4 | 25 | 4 | | 1 | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Charente | 4 | 3 | 5 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Charente | 4 | 3 | 6 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Charente | 4 | 3 | 7 | 26 | 2 | 2 | | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Charente | 4 | 3 | 8 | 25 | 4 | 1 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Charente | 4 | 3 | 9 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Charente | 4 | 3 | 10 | 27 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 10 | 10,33 | 10,22 |

| Population | | | | Nombre de chromosomes | | | | Aneuploïdie | | | Moyennes | |
|------------|------|------------------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|-------------|----------|--------------|------------|---------|
| Nom | code | classe de taille | animal | 2n=20 | 2n=19 | 2n=18 | 2n=17 | total | Nb lames | %aneuploidie | par classe | par pop |
| Arcachon | 5 | 1 | 1 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 2 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 3 | 30 | | | | 0 | 1 | 0 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 4 | 24 | 4 | 1 | 1 | 6 | 1 | 20 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 5 | 24 | 5 | 1 | | 6 | 2 | 20 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 6 | 24 | 5 | | 1 | 6 | 1 | 20 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 7 | 25 | 3 | 2 | | 5 | 1 | 16,67 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 8 | 23 | 4 | 2 | 1 | 7 | 1 | 23,33 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 9 | 28 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Arcachon | 5 | 1 | 10 | 25 | 2 | 2 | 1 | 5 | 1 | 16,67 | 14,00 | |
| Arcachon | 5 | 2 | 1 | 27 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 2 | 29 | 1 | | | 1 | 2 | 3,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 3 | 26 | 2 | 1 | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 4 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 5 | 26 | 3 | | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 6 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 7 | 26 | 3 | 1 | | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 8 | 29 | 1 | | | 1 | 1 | 3,33 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 9 | 28 | 2 | | | 2 | 2 | 6,67 | | |
| Arcachon | 5 | 2 | 10 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | 8,33 | |
| Arcachon | 5 | 3 | 1 | 27 | 2 | | 1 | 3 | 1 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 2 | 21 | 5 | 4 | | 9 | 1 | 30 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 3 | 26 | 3 | 1 | | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 4 | 27 | 3 | | | 3 | 2 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 5 | 24 | 4 | 1 | 1 | 6 | 1 | 20 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 6 | 28 | 2 | | | 2 | 1 | 6,67 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 7 | 26 | 3 | | 1 | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 8 | 27 | 3 | | | 3 | 1 | 10 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 9 | 27 | 3 | 1 | | 4 | 1 | 13,33 | | |
| Arcachon | 5 | 3 | 10 | 27 | 2 | 1 | | 3 | 1 | 10 | 13,67 | 12,00 |