

GROUHEL Stéphanie

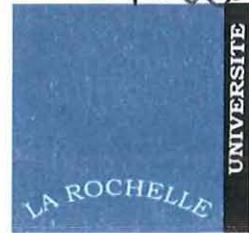
Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes.

Université de La Rochelle

Années 2002/2003

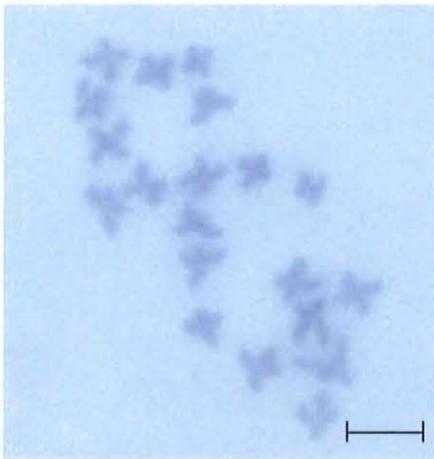
IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADÉ

64772.
E600.G10.I
042017.



**Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*
ayant subi une contamination pendant le stade larvaire**

Rapport N°2



Métaphase d'huître *Crassostrea gigas*
Echelle = 5 μ m



Naissain d'huître *Crassostrea gigas*
Echelle = 1,5 cm

**Encadrement:
Sylvie Lapègue et Karine Bouilly**

IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
Avenue de Mus de Loup
17390 La Tremblade

Ifremer

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02017

REMERCIEMENTS

Je remercie Philippe Gouletquer, du Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de la Tremblade, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie également Sylvie Lapègue et toute l'équipe dynamique de la station pour leurs conseils et leur sympathie.

Je remercie plus particulièrement Karine Bouilly pour m'avoir initiée aux différentes techniques de manipulation (Préparation de lames microscopiques, coloration, ...) et pour sa confiance, en effet, les résultats obtenus lors de ce stage rentrent dans le cadre de sa thèse.

Ce stage m'a beaucoup apporté et je ne remercierai jamais assez les personnes de cette station.

SOMMAIRE

<u>I. Introduction</u>	3
<u>II. Matériels et Méthodes</u>	5
1) Origine du naissain étudié	5
2) Protocole expérimental	6
3) Etude de l'aneuploïdie	7
a) Préparations chromosomiques	7
b) Analyse des données	8
<u>III. Résultats</u>	9
1) Action de l'atrazine sur le naissain de <i>Crassostrea gigas</i> contaminé au stade larvaire	9
2) Comparaison avec des données obtenues chez des adultes <i>Crassostrea gigas</i> contaminés en milieu contrôlé	11
<u>IV. Discussion</u>	12
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	15
<u>Annexe 1:</u> Résultats bruts du taux d'aneuploïdie chez du naissain de <i>Crassostrea gigas</i> contaminé au stade larvaire:	18

I. Introduction

Dans le bassin de Marennes-Oléron, l'espèce *Crassostrea gigas* est très importante d'un point de vue économique. Elle représente la majeure partie de la production hexagonale ostréicole. Cette espèce est particulièrement sensible aux facteurs d'agression tels que des polluants chimiques. En effet, c'est une espèce sessile, filtreuse et elle est capable de concentrer de grandes quantités de polluants dans ses tissus. Elle représente donc un très bon bioindicateur de l'état du milieu.

L'aneuploïdie est une anomalie cytogénétique. Une métaphase aneuploïde peut comporter un nombre de chromosomes supérieur ou inférieur à celui d'une métaphase diploïde normale. Cette aberration chromosomique, qui est produite essentiellement par une non-disjonction des chromosomes lors de la mitose ou de la méiose, est souvent létale chez les animaux supérieurs tels que les mammifères ou bien associée à un retard de croissance (Griffiths *et al.*, 2001).

Cette anomalie est connue pour être commune chez les bivalves (Thiriote-Quiévreux, 1986). Chez l'huître creuse, elle se traduit par des cellules ayant $2n=19$, 18 ou 17 chromosomes au lieu de $2n=20$ normalement (Ahmed et Sparks, 1967; Thiriote-Quiévreux et Ayraud, 1982).

Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *Crassostrea gigas* (Thiriote-Quiévreux *et al.*, 1988, 1992; Leitão *et al.*, 2001a) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros *et al.*, 1996). Une meilleure compréhension de ce phénomène est nécessaire. L'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère a été émise (Leitão *et al.*, 2001b).

Récemment, une étude a mis en cause pour la première fois un facteur environnemental comme facteur influençant l'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ainsi, un effet toxique direct de l'atrazine sur le génome d'une population d'huîtres creuses a été mis en évidence en milieu contrôlé (Bouilly *et al.*, 2003) et, plus inquiétant, une persistance de cet effet dans le temps (2 mois et demi) sur une même génération (Bouilly, 2002a) et chez des descendants d'animaux exposés a été observée (Bouilly, 2003).

L'atrazine est un herbicide couramment utilisé dans la région en grande culture, en particulier dans celle du maïs, dont la solubilité relativement importante et la dégradation plus lente que celle des autres pesticides de ce type soulève divers problèmes de toxicologie de l'environnement (Ramade, 2002). Plusieurs études ont montré son impact sur divers animaux ou végétaux. Ainsi, il a un effet significatif au début du développement testiculaire chez *Xenopus laevis* après 48 h d'exposition à 21 µg d'atrazine/l durant la différenciation des gonades (Tavera Mendoza *et al.*, 2002) et une autre étude sur *X. laevis* montre que *in vitro* l'atrazine féminise les mâles à faible taux (quelques parties par milliards) dans l'eau (Hayes *et al.*, 2002a) et le même constat a été observé, *in situ*, sur *Rana pipiens* dans différents états américains (Hayes *et al.*, 2002b). De plus, le déclin d'une espèce végétale macrophyte *Juncus roemerianus* dominant les estuaires peut arriver à une exposition chronique à l'atrazine à des concentrations de 250 µg/l (Lytle et Lytle, 1998).

En France, l'atrazine est aujourd'hui interdite à la vente et ce depuis le 30 septembre 2002 et son utilisation est stoppée depuis le 30 juin 2003 (<http://www.pan.africa.sn>). Cependant, comme c'est un produit rémanent, il peut se trouver encore longtemps dans le milieu.

Après la mise en évidence de tous les effets de l'atrazine sur *Crassostrea gigas* dans les précédentes études citées ci-dessus, il apparaît intéressant d'évaluer l'impact de l'atrazine après une exposition au stade précoce c'est à dire au stade larvaire. Cela permettra de savoir si une exposition à ce stade a une plus grande incidence sur le taux d'aneuploïdie.

Ainsi, le but de cette étude est de déterminer si une contamination à l'atrazine au stade larvaire peut se caractériser par des taux d'aneuploïdie différents sur du naissain.

II. Matériels et Méthodes

1) Origine du naissain étudié

Du naissain de *Crassostrea gigas* provient d'un croisement réalisé à l'IFREMER de La Tremblade le 25 juin 2002. Ce croisement a été obtenu à partir d'un pool de 6 mâles et 6 femelles choisis parmi les meilleurs reproducteurs sur les 20 individus à disposition prélevés dans la salle de maturation. On considère comme meilleurs reproducteurs, les mâles possédant des gamètes se déplaçant rapidement et les femelles ayant des gamètes bien ronds et une membrane non décollée de la paroi des ovocytes.

Les gamètes mâles et femelles ont été obtenus par scarification de la gonade des individus.

Je n'ai pas pu assister à ce croisement car le délai entre le croisement et l'étude de l'aneuploïdie au stade naissain est beaucoup trop long, en revanche, j'ai pu suivre un croisement le 26 mai 2003. Le but était d'obtenir des triploïdes ($3n=30$) à partir d'un croisement entre des tétraploïdes ($4n=40$) et diploïdes ($2n=20$).

Avant de faire un croisement, on s'assure que l'on a bien soit un mâle, soit une femelle. Pour cela on prélève un peu du contenu gonadique dilué dans de l'eau de mer (cette dernière permet une meilleure observation) que l'on dépose sur une lame et on effectue l'observation au microscope. Les gamètes mâles sont plus petits (environ $2,2 \mu\text{m}$) et se déplacent par rapport aux gamètes femelles qui sont plus gros (environ $52,8 \mu\text{m}$) et non mobiles.

De plus, il faut être sûr que l'on a bien la ploïdie désirée, c'est à dire, diploïdie ou tétraploïdie. Pour cela on dispose d'un cytomètre et du contenu gonadique sera couplé à un produit fluorescent. Ainsi, selon la ploïdie, on aura une plus ou moins grande fluorescence. Pour $4n$, on aura la plus grande fluorescence, mais les valeurs obtenues pour la fluorescence ne sont que relatives.

On compte en premier la concentration de sperme car les gamètes mâles sont plus longtemps fécondants par rapport aux gamètes femelles.

La concentration des gamètes mâles a été estimée sur cellules de Thoma avec une coloration à l'éosine couplée à un système d'analyse d'image (SAMBA/Comptage). Il en est de même pour les gamètes femelles mais comptés sur des cellules de Malassez (Collet, 1999) et sans coloration.

Pour ce croisement et celui de mon étude, il a été mis en présence 3 millions d'ovocytes pour 600 millions de spermatozoïdes dans 30 litres d'eau de mer filtrée.

2) Protocole expérimental

Les larves d'huîtres *Crassostrea gigas*, obtenues par le croisement ont été soumises, en milieu contrôlé, à différentes concentrations d'atrazine. Cinq concentrations d'atrazine ont été testées: 0,1 µg/l, 0,4 µg/l, 1 µg/l, 10 µg/l (valeur pic trouvée dans le milieu naturel) et 100 µg/l. Douze lots (six lots différents et leur répliqués) ont été établis : deux lots témoins (1 et 2), deux lots avec 0,1 µg d'atrazine/l (3 et 4), deux lots avec 0,4 µg d'atrazine/l (5 et 6), deux lots avec 1 µg d'atrazine/l (7 et 8), deux lots avec 10 µg d'atrazine/l (9 et 10) et deux lots avec 100 µg/l (11 et 12).

L'exposition des larves à l'atrazine s'est déroulée pendant tout leur développement, soit 24 jours. Le renouvellement d'eau et d'atrazine a eu lieu tous les 2 ou 3 jours. Leur nourriture était constituée de 3 espèces de microalgues : *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans*.

La phase larvaire se déroule en salle d'élevage larvaire. Dans le cycle de développement de l'espèce, il y a une étape importante qui est l'étape de fixation. Lorsque les larves sont pédivéligères, elles cherchent un support pour se fixer et sont donc transférées en micronurserie pour permettre leur fixation. Une fois que le naissain a atteint une taille suffisante, les différents lots ont ensuite été placés dans le marais expérimental de la station à Artouan pour leur grossissement. Le naissain a ensuite été replacé à l'écloserie dans la serre à température élevée pendant un mois afin de permettre l'acclimatation et ceci toujours avec la nourriture composée des 3 microalgues citées ci-dessus pendant 2 à 3 semaines.

Le stade naissain a été choisi car il est en pleine croissance et donc son activité mitotique est importante, ainsi, un plus grand nombre de mitoses peut être observé.

3) Etude de l'aneuploïdie

a) Préparations chromosomiques

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

Arrêt des cellules en métaphase

Afin d'étudier l'aneuploïdie, les animaux ont tout d'abord été incubés dans une solution de colchicine diluée dans de l'eau de mer à 0,005%. La colchicine est un alcaloïde qui détruit la tubuline inhibant ainsi la formation des fibres du fuseau achromatique auxquelles se fixent les centromères de chaque chromosome et empêche de cette façon l'ascension anaphasique. La colchicine permet donc le blocage en métaphase des mitoses. Le temps d'action de la colchicine a varié de 7 à 8 heures. Cette expérience s'est déroulée la nuit car le produit est photosensible et les divisions cellulaires ont été observées comme étant plus abondantes la nuit que le jour et donc une plus grande filtration et absorption de colchicine. Le naissain a ensuite été disséqué afin de récupérer les branchies.

Choc hypotonique

Les branchies ont ensuite été soumises à un choc hypotonique entraînant une turgescence des cellules permettant ainsi une bonne dispersion des chromosomes. Le choc hypotonique a été réalisé avec du citrate de sodium à 0,9% pendant 40 minutes.

Fixation

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

Exécution des préparations chromosomiques

De l'eau acidifiée a été ajoutée à une branchie, ou à un morceau de branchie selon la taille, afin de faciliter la libération des noyaux. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été étalée en laissant tomber une goutte d'une hauteur de 40 cm environ sur une lame microscopique préchauffée à 44°C. La suspension cellulaire a été aspirée puis les lames obtenues ont été séchées à l'air.

Coloration

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

b) Analyse des données

Le pourcentage d'aneuploïdie a été estimé en comptant les chromosomes de 30 métaphases (au microscope optique Olympus BX 41 à l'objectif 40) choisies au hasard par individu. Les cellules présentant $2n=19$, 18 ou 17 chromosomes ont été considérées comme aneuploïdes. Pour chaque lot, 10 individus ont été étudiés sauf pour le lot 2 où seulement 9 individus ont pu être étudiés. Dans la majorité des lots, il a été fixé 14 individus mais pas dans ce lot (11 individus fixés seulement) et les individus supplémentaires de ce lot ne possédaient pas les 30 métaphases qui représentent le nombre statistique minimal habituellement accepté dans les études de cytogénétique (Stallard *et al.*, 1981 ; Wenger *et al.*, 1984). Dans cette étude, la probabilité que les cellules aneuploïdes soient le résultat d'artefacts de la méthode de suspension cellulaire est réduite par le nombre élevé de métaphases. Comme le nombre de métaphases par individu est le même pour tout le matériel étudié, excepté le lot 2, il est possible de tester les effets des lots en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (lots d'atrazine et réplicats) sur SYSTAT 9.0. (Wilkinson, 1990).

III. Résultats

1) Action de l'atrazine sur le naissain de *Crassostrea gigas* contaminé au stade larvaire

Bien que l'huître *Crassostrea gigas* ait un nombre diploïde normal de 20 chromosomes (figure 1) (Ahmed et Sparks, 1967), des cellules hypodiploïdes de $2n=19$ (figure 2), 18 (figure 3) ou 17 (figure 4) chromosomes ont été observées dans tous les lots étudiés (Annexe 1). Donc 1, 2 ou 3 chromosomes ont été perdus parmi les 10 paires de chromosomes métacentriques qui constituent le caryotype de cette espèce (Thiriot-Quévieux, 2002) (figure 5). L'étude de Leitão *et al.*, (2001c) montre que seules 4 paires de chromosomes étaient touchées par l'aneuploïdie.

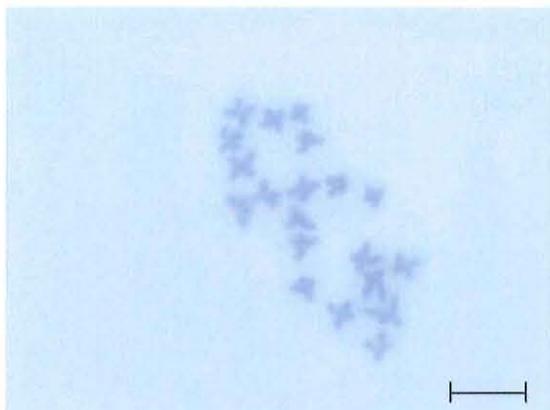


Figure 1: Métaphase avec $2n=20$

Echelle = 2,5 μm .

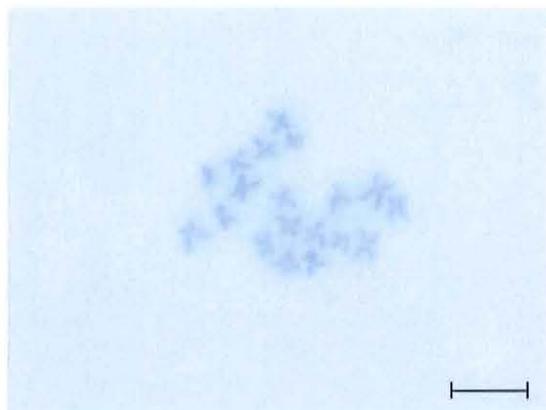


Figure 2: Métaphase avec $2n=19$

Echelle = 2,5 μm .

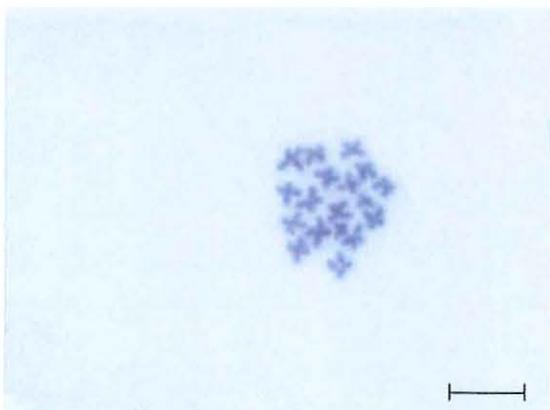


Figure 3: Métaphase avec $2n=18$

Echelle = 2,5 μm .

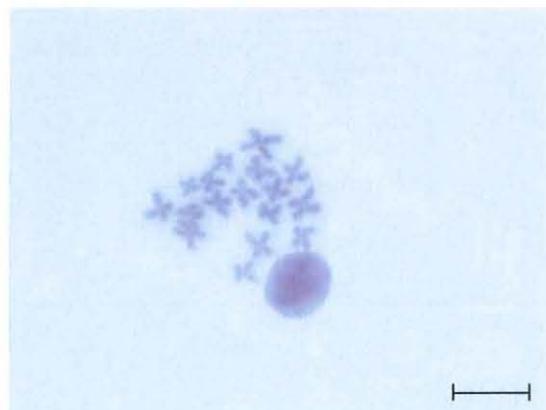


Figure 4: Métaphase avec $2n=17$

Echelle = 2,5 μm .

Le caryotype qui suit est approximatif, en effet, les chromosomes de la métaphase utilisée n'étaient pas assez allongés pour distinguer parfaitement les paires de chromosomes. Ce caryotype n'est basé que sur la taille des chromosomes mais il existe d'autres techniques plus fiables pour identifier les chromosomes: Les bandes G et les enzymes de restriction mettent en évidence des régions bien spécifiques des chromosomes.

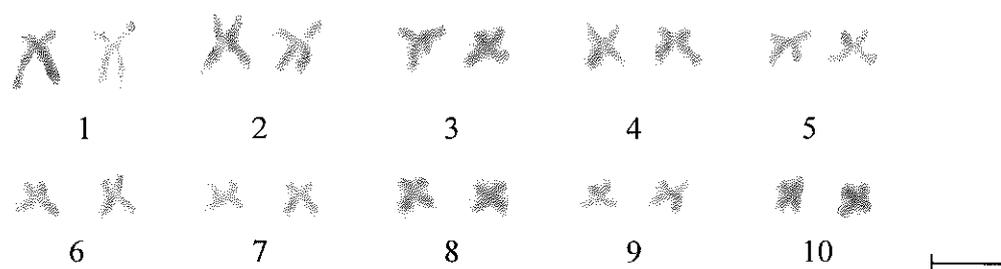


Figure 5: Caryotype de *Crassostrea gigas* ($2n=20$) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. Echelle = 3,5 μm .

Seuls les lots 9 et 10 (10 μg d'atrazine /l) semblent montrer un taux d'aneuploïdie différent de celui des témoins. En effet, les taux d'aneuploïdie dans les lots témoins 1 et 2, lots 3 et 4 (0,1 μg d'atrazine/l), lots 5 et 6 (0,4 μg d'atrazine/l), lots 7 et 8 (1 μg d'atrazine /l), lots 9 et 10 (10 μg d'atrazine/l) et 11 et 12 (100 μg d'atrazine/l) varient de 15 à 17,4%, 14,66 à 18,33%, 15 à 15,67%, 15,33 à 18,33%, 21,67% à 25,33 et 15,92% à 19% respectivement (figure 6). Des analyses statistiques ont révélé, en prenant un risque d'erreur de 5%, que le pourcentage d'aneuploïdie n'était pas différent entre les réplicats ($F=0,015$; $P=0,903$) mais qu'il était significativement différent selon les traitements ($F=2,736$; $P=0,023$). De plus, on a pu aussi mettre en évidence que le pourcentage d'aneuploïdie pour les témoins n'était pas différent de celui des lots 3 et 4 ($F=0,012$; $P=0,914$), des lots 5 et 6 ($F=0,087$; $P=0,770$), des lots 7 et 8 ($F=0,045$; $P=0,834$) et des lots de plus forte concentration ($F=0,351$; $P=0,558$). En revanche, il y a une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les lots 9 et 10 et tous les autres lots, c'est à dire avec les témoins ($F=6,554$; $P=0,015$), avec les lots 3 et 4 ($F=10,06$; $P=0,003$), avec les lots 5 et 6 ($F=10,83$; $P=0,002$), avec les lots 7 et 8 ($F=6,997$; $P=0,012$) et avec les lots 11 et 12 ($F=4,261$; $P=0,019$). Les lots de la plus forte concentration ne montrent pas de différence des taux d'aneuploïdie avec les lots témoins (voir ci-dessus), avec les lots 3 et 4 ($F=0,409$; $P=0,527$), avec les lots 5 et 6 ($F=1,108$; $P=0,299$), avec les lots 7 et 8 ($F=0,171$; $P=0,681$).

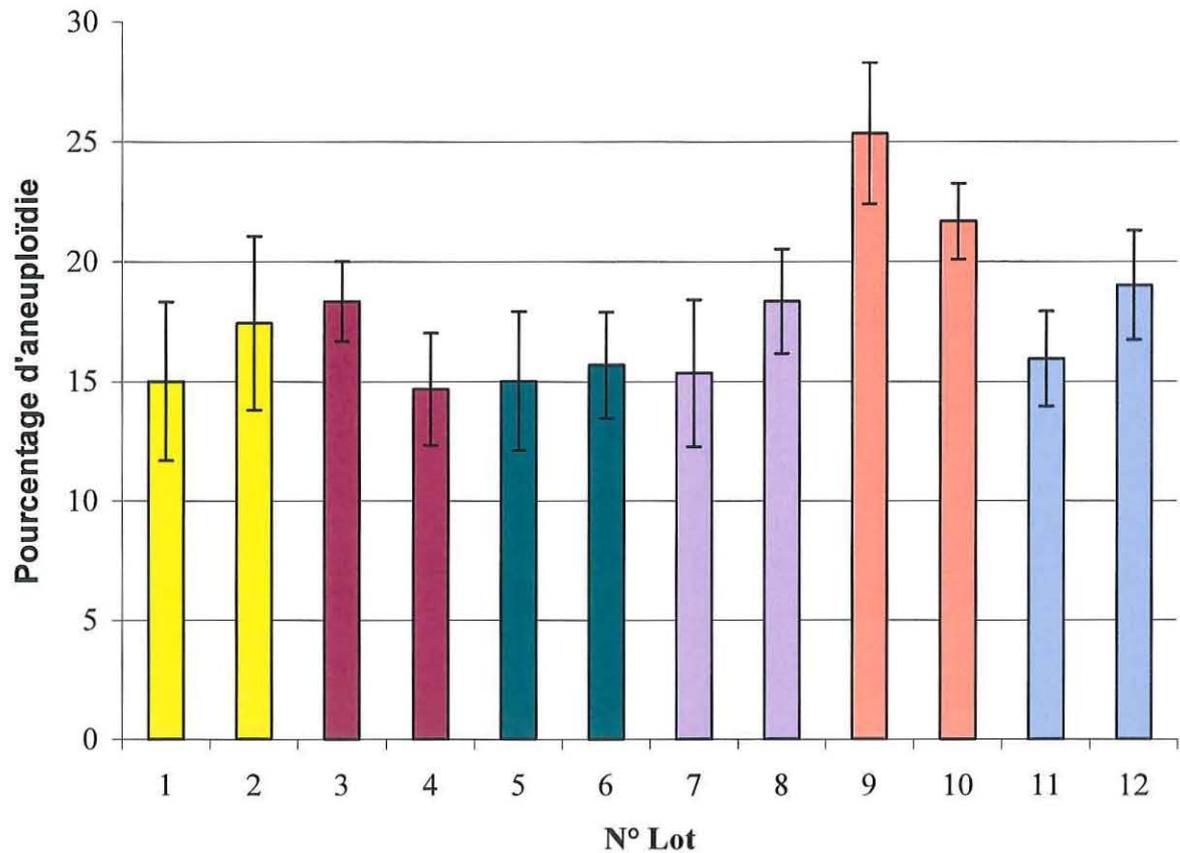


Figure 6: Pourcentage d'aneuploïdie des naissains de *Crassostrea gigas* en fonction du lot: Lots 1 et 2 (0 µg/l), lots 3 et 4 (0,1 µg/l), lots 5 et 6 (0,4 µg/l), lots 7 et 8 (1µg/l), lots 9 et 10 (10 µg/l) et lots 11 et 12 (100 µg/l)

2) Comparaison avec des données obtenues chez des adultes *Crassostrea gigas* contaminés en milieu contrôlé

Les résultats des expériences sur les huîtres adultes et du naissain d'huîtres font apparaître des pourcentages de cellules aneuploïdes différents (figure 7). L'analyse de variance à 3 facteurs (adultes-naissain, concentrations et réplicats) confirme cette différence entre les adultes de l'expérience de Bouilly *et al.* (2003) et le naissain de la présente étude (F=7,282; P=0,008) et il y a aussi mise en évidence d'une différence significative entre les différentes concentrations d'atrazine (F=9,392; P=0,000).

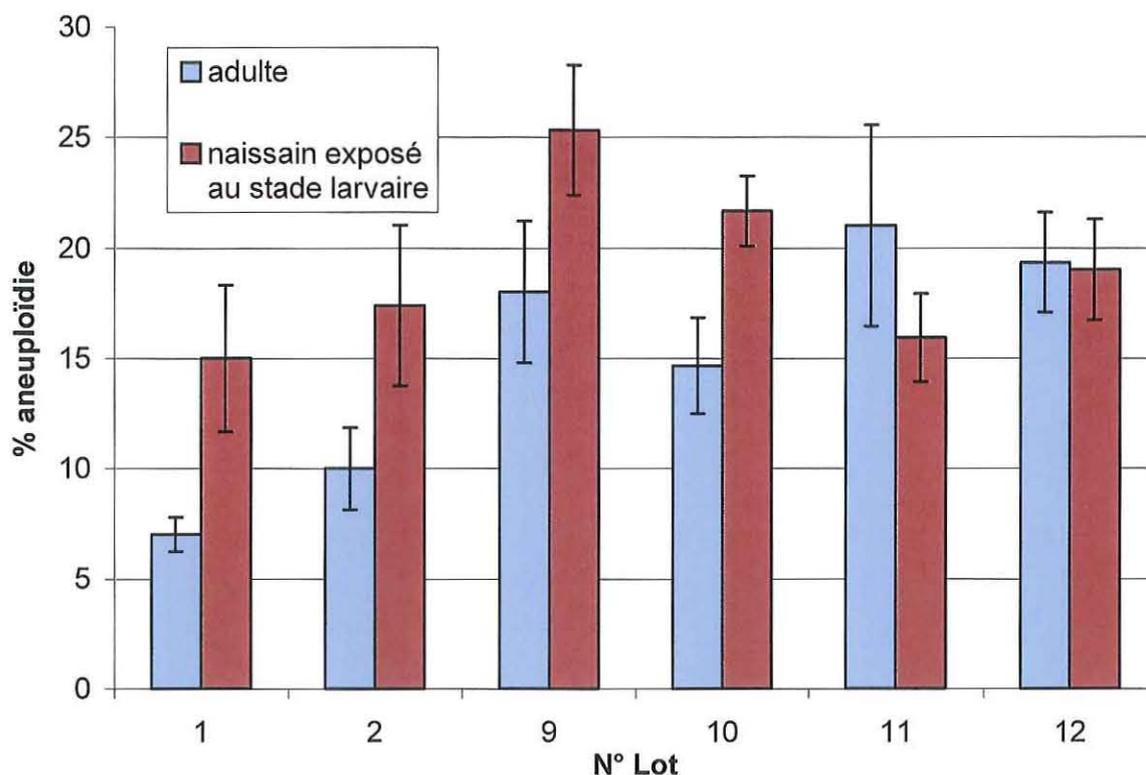


figure 7: Pourcentage de cellules aneuploïdes chez *Crassostrea gigas* aux stades adulte et naissain en fonction de la concentration d'atrazine: 0 mg/l (lot 1 et 2), 0,01 mg/l (lot 9 et 10), et 0,1 mg/l (lot 11 et 12).

IV. Discussion

Dans cette étude, on a voulu mettre en évidence si un effet de l'atrazine sur l'aneuploïdie pouvait apparaître au stade naissain, après une contamination larvaire.

Les résultats obtenus sont assez différents de ceux obtenus auparavant par Bouilly *et al.*, 2003 sur des adultes contaminés à l'atrazine pendant 51 jours. En effet, aucune corrélation positive entre l'aneuploïdie et la concentration d'atrazine n'a été observée dans la présente étude.

Il y a bien une différence significative entre les traitements mais pas entre la plus forte concentration et les témoins.

De plus, le taux d'aneuploïdie chez les témoins est plus élevé par rapport aux témoins de l'étude menée par Bouilly *et al.* (2003), il est possible que les conditions du milieu où étaient conservés les adultes destinés au croisement ou celui où était placé le naissain étaient plus polluées.

Une autre hypothèse peut être émise, sachant qu'une corrélation négative existe entre aneuploïdie et croissance (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988, 1992 ; Leitão *et al.*, 2001a), il est possible que les individus destinés au croisement faisaient partie d'une « Queue de lot », c'est à dire que leur croissance était lente et que leur taux d'aneuploïdie était plus élevé que des individus ayant une meilleure croissance. Il est donc envisageable que les descendants aient « hérités » de ce taux d'aneuploïdie, mais cela reste à prouver. En effet, il a été mis en évidence l'existence d'une base génétique (Leitão *et al.*, 2001b) et une persistance sur des descendants d'animaux exposés a été observée (Bouilly *et al.*, 2003).

L'étude de Bouilly (2002) qui consistait en la contamination du naissain pendant 3 mois et demi et replacés dans des conditions non polluées pendant 2 mois et demi, a mis en évidence une corrélation positive entre taux d'aneuploïdie et la concentration d'atrazine et une persistance de celle-ci dans le temps. Notre étude avait comme protocole la contamination au stade larvaire pendant 3 semaines suivie d'une remise en milieu non pollué pendant 6 mois, il est possible que l'atrazine, dans notre étude, n'ait pas eu le temps d'agir totalement.

Il y a une étude en cours sur les adultes exposés à l'atrazine pendant deux mois puis replacés dans des conditions non polluées pendant 18 mois afin de voir s'il existe des mécanismes de réparation. Cette dernière pourra peut être fournir une explication aux résultats de mon étude si des mécanismes de réparation sont mis en évidence.

Une autre hypothèse serait que, parmi les larves exposées à la plus forte concentration, les plus aneuploïdes aient subi une plus forte mortalité, ceci en supposant que les aneuploïdes soient plus sensibles. La question intéressante ici serait: Existe-t-il une mortalité au delà d'un seuil d'aneuploïdie? Ceci ne peut être vérifié puisque l'on travaille sur des animaux vivants.

En ce qui concerne le lot 2, seuls 9 individus ont pu être étudiés à cause d'une plus forte mortalité dans ce lot. Seulement 11 individus ont pu être fixés alors que 14 individus ont pu l'être dans les autres lots. Ainsi, certains individus pouvaient être mal en point et n'étaient peut être plus en croissance ce qui se traduit par un faible index mitotique.

Les concentrations de 0,1, 0,4 et 1 µg/l n'ont pas montré d'augmentation du taux d'aneuploïdie et il est possible de dire que, dans cette étude, la dose seuil à partir de laquelle le taux d'aneuploïdie est significativement différent de celui du témoin est la concentration représentée par les lots 9 et 10 soit 10 µg d'atrazine /l. Cependant, le problème des lots 11 et

12 montrant un taux d'aneuploïdie non différent des témoins persiste toujours et empêche l'affirmation d'une dose seuil.

En conclusion, il serait intéressant de connaître le mode d'action de l'atrazine et les mécanismes de détoxification utilisés par l'huître afin d'expliquer ces résultats mais à l'heure actuelle il n'y a pas assez de connaissance sur ces deux paramètres.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, M., & Sparks, A. K., 1967. A preliminary study of chromosomes of tow species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J. Fish. Res. Bd. Canada 24: 2155-2159.

Bouilly, K., 2001. Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude expérimentale sur une population en milieu contrôlé. DEA Exploitation Durable des Ecosystèmes Littoraux. 42 pp + annexes.

Bouilly, K., 2002a. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron : aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport de thèse N°1. 16 pp. + annexes.

Bouilly, K., 2003. Impact de polluants sur l'intégrité du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron : aneuploïdie et influence sur la croissance. Rapport de thèse N°3. 33 pp. + annexes.

Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H. & Lapègue, S., 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 22, No. 1: 219-223.

Collet, M., 1988. Evaluation des transferts existants ou potentiels de produits phytosanitaires utilisés en agriculture vers le milieu marin. Rapport IFREMER, DERO-88-04-EL, 30 pages + annexes.

Griffiths, A., Gelbart, W., Miller & J., Lewontin, R., 2001. Analyse génétique moderne, 1^{ère} édition. DeBoeck Université.

Hayes T.B, Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A. & Vonk A., 2002a. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. PNAS, Vol. 99, No 8: 5476-5480.

Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C. & Vonk A., 2002b. Feminization of males frogs in the wild. *Nature* 419: 895-896.

<http://www.pan.africa.sn>

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

Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A. & Thiriot-Quiévreux, C., 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources*.

Leitão, A., Boudry, P. & Thiriot-Quiévreux, C., 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome* 44: 735-737.

Lytle J.S & Lytle T.F., 1998. Atrazine effects on estuarine macrophytes *Spartina alterniflora* and *Juncus roemerianus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (10): 1972-1978.

Ramade, F., 2002. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, 2^{ème} édition. Dunod.

Stallard, R., Haney, N. R., Franck, P. A., Styron, P. & Juberg, R. C., 1981. Leukocyte chromosomes from parents of cytogenetically abnormal offspring: preliminary observations. *Cytogenet. Cell Genet.* 30: 50-53.

Tavera Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M. Cyr, D. & Marcogliesse, D., 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (3): 527-531.

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

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

Thiriot-Quiévreux, C., 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.

Thiriot-Quiévreux, C., 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cah. Biol. Mar.* 43: 17-26.

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

Wenger, S. L., Golden, W. L., Dennis, S. P. & Steele, M. W., 1984. Are the occasional aneuploid cells in peripheral blood cultures significant? *Am. J. Med. Genet.* 19: 715-719.

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

Zouros, E., Thiriot-Quiévreux, C. & Kotoula, G., 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genet. Res., Camb.* 68: 109-116.

Annexe 1: Résultats bruts du taux d'aneuploïdie chez du naissain de *Crassostrea gigas* contaminé au stade larvaire:

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Moyenne
N° Lot	N° animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% d'aneuploïdie	
1	1	28	2	0	0	2	6,67	15
1	2	20	5	4	1	10	33,33	
1	3	22	4	2	2	8	26,67	
1	4	25	1	1	3	5	16,67	
1	5	28	1	0	1	2	6,67	
1	6	26	2	1	1	4	13,33	
1	7	29	1	0	0	1	3,33	
1	8	24	1	4	1	6	20	
1	9	27	3	0	0	3	10	
1	10	26	2	2	0	4	13,33	
2	1	25	3	1	1	5	16,67	17,41
2	2	22	2	2	4	8	26,67	
2	5	29	1	0	0	1	3,33	
2	6	24	1	3	2	6	20	
2	7	22	5	3	0	8	26,67	
2	8	20	4	1	5	10	33,33	
2	9	28	1	0	1	2	6,67	
2	10	24	2	1	3	6	20	
2	11	29	0	1	0	1	3,33	
3	1	24	2	3	1	6	20	
3	3	25	2	2	1	5	16,67	
3	4	23	1	5	1	7	23,33	
3	5	25	3	1	1	5	16,67	
3	6	23	2	3	2	7	23,33	
3	7	24	1	4	1	6	20	
3	8	27	3	0	0	3	10	
3	9	26	3	1	0	4	13,33	
3	10	26	3	1	0	4	13,33	
3	11	22	4	1	3	8	26,67	
4	1	27	1	1	1	3	10	14,67
4	3	26	3	1	0	4	13,33	
4	4	20	3	4	3	10	33,33	
4	5	25	3	1	1	5	16,67	
4	7	26	2	0	2	4	13,33	
4	9	27	0	1	2	3	10	
4	10	27	2	0	1	3	10	
4	11	25	0	2	3	5	16,67	
4	12	28	2	0	0	2	6,67	
4	13	25	3	1	1	5	16,67	

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Moyenne
N° Lot	N° animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% d'aneuploïdie	
5	1	26	1	3	0	4	13,33	15
5	2	25	3	1	1	5	16,67	
5	4	28	0	1	1	2	6,67	
5	5	22	3	3	2	8	26,67	
5	7	24	2	3	1	6	20	
5	8	24	3	3	0	6	20	
5	9	30	0	0	0	0	0	
5	11	29	0	1	0	1	3,33	
5	13	25	5	0	0	5	16,67	
5	12	22	3	4	1	8	26,67	
6	1	26	2	2	0	4	13,33	15,67
6	3	27	2	1	0	3	10	
6	4	25	3	1	1	5	16,67	
6	5	29	0	0	1	1	3,33	
6	6	24	4	1	1	6	20	
6	7	26	2	1	1	4	13,33	
6	8	24	2	1	3	6	20	
6	10	27	1	1	1	3	10	
6	12	23	3	1	3	7	23,33	
6	13	22	3	5	0	8	26,67	
7	1	28	1	1	0	2	6,67	15,33
7	2	28	1	1	0	2	6,67	
7	3	26	2	1	1	4	13,33	
7	4	25	3	2	0	5	16,67	
7	5	27	0	1	2	3	10	
7	6	26	2	1	1	4	13,33	
7	7	22	5	2	1	8	26,67	
7	9	28	2	0	0	2	6,67	
7	10	25	1	0	4	5	16,67	
7	12	19	4	2	5	11	36,67	
8	1	27	1	1	1	3	10	18,33
8	2	21	4	4	1	9	30	
8	4	26	2	1	1	4	13,33	
8	5	25	2	1	2	5	16,67	
8	6	26	2	1	1	4	13,33	
8	8	23	3	3	1	7	23,33	
8	10	23	1	1	5	7	23,33	
8	11	22	5	3	0	8	26,67	
8	12	26	4	0	0	4	13,33	
8	13	26	0	2	2	4	13,33	

Population		Nombre de chromosomes				Aneuploïdie		Moyenne
N° Lot	N° animal	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	Total	% d'aneuploïdie	
9	2	20	5	3	2	10	33,33	25,33
9	3	21	4	2	3	9	30	
9	4	19	7	3	1	11	36,67	
9	5	19	6	3	2	11	36,67	
9	6	25	1	1	3	5	16,67	
9	7	27	2	0	1	3	10	
9	8	23	2	3	2	7	23,33	
9	9	24	4	1	1	6	20	
9	10	21	3	2	4	9	30	
9	11	25	1	1	3	5	16,67	
10	1	22	4	3	1	8	26,67	21,67
10	2	22	3	4	1	8	26,67	
10	3	23	2	3	2	7	23,33	
10	4	25	3	0	2	5	16,67	
10	6	24	4	2	0	6	20	
10	7	25	2	2	1	5	16,67	
10	8	25	1	2	2	5	16,67	
10	9	25	1	3	1	5	16,67	
10	10	21	2	5	2	9	30	
10	11	23	2	3	2	7	23,33	
11	1	25	2	3	0	5	16,67	16,67
11	2	21	5	1	3	9	30	
11	3	26	3	1	0	4	13,33	
11	4	26	2	1	1	4	13,33	
11	5	27	1	0	2	3	10	
11	7	26	3	1	0	4	13,33	
11	8	27	0	3	0	3	10	
11	9	24	4	2	0	6	20	
11	12	25	4	1	0	5	16,67	
11	13	23	4	3	0	7	23,33	
12	1	26	1	3	0	4	13,33	19
12	3	24	3	2	1	6	20	
12	4	23	3	3	1	7	23,33	
12	6	26	3	1	0	4	13,33	
12	7	22	3	4	1	8	26,67	
12	8	27	1	2	0	3	10	
12	9	24	1	3	2	6	20	
12	10	26	3	0	1	4	13,33	
12	12	25	2	0	3	5	16,67	
12	13	20	4	2	4	10	33,33	