



HAL
open science

Stress toxique et variations de forme chez "Chironomus riparius" (insecte, diptère)

Hélène Arambourou

► **To cite this version:**

Hélène Arambourou. Stress toxique et variations de forme chez "Chironomus riparius" (insecte, diptère). Biologie animale. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT: 2013LORR0104. tel-01750091

HAL Id: tel-01750091

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750091>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Laboratoire des Interactions Écotoxicologie,
Biodiversité, Écosystèmes (LIEBE)
UMR CNRS 7146
Metz

École doctorale Sciences et Ingénierie
Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
ED N°410
Nancy

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : ÉCOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITÉ, ÉCOSYSTÈMES

Délivrée par :

Université de Lorraine (UFR Sciences Fondamentales et Appliquées)

Soutenue par :

Hélène ARAMBOUROU

Stress toxique et variations de forme chez Chironomus riparius (Insecte, Diptère)

Le 15 février 2013 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse	Jean-Nicolas BEISEL	<i>MCF-HDR (Université de Lorraine)</i>
Rapporteurs	Paul ALIBERT	<i>MCF-HDR (Université de Bourgogne)</i>
	María José SERVIA	<i>Senior lecturer (Université de Corogne, Espagne)</i>
Examineurs	Vincent DEBAT	<i>MCF (MNHN)</i>
	Jeanne GARRIC	<i>Directeur de recherche (IRSTEA)</i>
	Catherine GOURLAY-FRANCÉ	<i>Chef de l'unité de coordination Biocides (ANSES)</i>
	Armand MAUL	<i>Professeur (Université de Lorraine)</i>
	Philippe USSEGLIO-POLATERA	<i>Professeur (Université de Lorraine)</i>
Membre invité	Philippe BRANCHU	<i>Chef de l'unité QES (CETE IDF)</i>

« Pour étudier avec quelque fruit les facultés psychiques de la bête, il ne suffit pas de savoir profiter des circonstances qu'un heureux hasard présente à l'observation ; il faut savoir en faire naître d'autres, les varier autant que possible, et les soumettre à un contrôle mutuel ; il faut enfin expérimenter pour donner à la science une base solide de faits. »

J.H Fabre, Souvenirs entomologiques. Tome I, Chapitre XXI : Expériences.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Jean-Nicolas Beisel, pour sa disponibilité et ses conseils avisés. Je remercie également Philippe Branchu, pour sa patience et ses encouragements. Je remercie Vincent Debat pour le temps qu'il a accordé à mes interrogations portant sur la morphométrie géométrique. Je remercie Eric Gismondi pour son aide précieuse sur les marqueurs biochimiques. Je remercie Alexandre Bergé pour la réalisation des essais croisés sur le nonylphénol. Je remercie Jeanne Garric d'avoir accepté de faire partie du comité de pilotage de ce travail doctoral. Je remercie David Ramier pour les cours de LaTeX.

Je remercie, en outre, María Servia et Paul Alibert d'avoir accepté la charge de rapporter ce travail. Merci également à Catherine Gourlay-Francé, Armand Maul et Philippe Usseglio-Polatera d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie les techniciens du CETE IDF, en particulier : Laurent Meffray, qui a largement contribué au développement analytique du dosage du nonylphénol et Guillaume Coulboux qui a réalisé les dosages des polluants métalliques. Je remercie les techniciens d'hydrobiologie : Claudine Lacroix et Magali Plasson, pour l'entretien de l'élevage de *Chironomus riparius* et pour le suivi physico-chimique des essais écotoxicologiques. Je remercie Samuel Sorhais pour la mesure de la physico-chimie des sédiments. Je remercie également tous les stagiaires qui sont passés au CETE IDF et qui ont contribué à ce travail.

Je remercie mes financeurs : la Direction de la Recherche et de l'Innovation du MEDDE, l'IFF-STAR et l'AESN. Je remercie enfin VNF de m'avoir permis d'assister à un chantier de dragage en Seine.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	7
1 Effets sub-létaux d'un stress toxique chez les macro-invertébrés	11
1.1 Les marqueurs moléculaires, cellulaires et physiologiques	11
1.1.1 La génotoxicité	11
1.1.2 Les protéines de stress	12
1.1.3 La neurotoxicité	13
1.1.4 Le métabolisme du stress oxydatif	14
1.1.5 Le métabolisme de défense	16
1.1.6 Les réserves énergétiques	17
1.1.7 Les marqueurs physiologiques	19
1.2 La forme, un marqueur ontogénique : définitions	20
1.2.1 L'homéostasie de développement	20
1.2.2 La stabilité de développement	21
1.2.3 Les asymétries	21
1.2.4 La canalisation	23
1.2.5 Les phénodéviations	23
1.2.6 La plasticité phénotypique	24
1.3 Les variations de forme dans les milieux pollués	25
1.3.1 Les phénodéviations	25
1.3.2 Les asymétries fluctuantes	30
1.4 Les variations de forme en laboratoire	34
1.4.1 Les phénodéviations	34
1.4.2 Les asymétries fluctuantes	39
1.4.3 La variation de la forme moyenne	41
2 Organisme et toxiques étudiés	44
2.1 L'organisme modèle retenu : <i>Chironomus riparius</i>	44
2.1.1 Classification	44
2.1.2 Cycle de vie	44
2.1.3 Anatomie	45
2.2 Les toxiques étudiés	46
2.2.1 Le plomb dans l'environnement	46
2.2.2 Toxicité du plomb sur le chironome	47
2.2.3 Le 4-nonylphénol dans l'environnement	49
2.2.4 Toxicité du 4-nonylphénol sur le chironome	51

3	Matériel et méthode	54
3.1	Caractéristiques des sédiments d'essai	54
3.1.1	Fabrication du sédiment artificiel	54
3.1.2	Dopage du sédiment artificiel	56
3.1.3	Prélèvement du sédiment dans la station d'Orcemont	57
3.1.4	Prélèvement du sédiment dans la station d'Andrésy	57
3.1.5	Caractérisation physico-chimique des sédiments	58
3.2	Organisme modèle et conception expérimentale	59
3.2.1	Élevage de <i>Chironomus riparius</i>	59
3.2.2	Conception expérimentale	60
3.2.3	Expérience sur une population de <i>Chironomus</i> provenant de la station d'Orcemont	61
3.3	Mesure des réserves énergétiques, du malondialdéhyde et des métallothionéines .	62
3.3.1	Préparation des échantillons	62
3.3.2	Dosage des lipides et du glycogène	63
3.3.3	Dosage du contenu total en protéines	63
3.3.4	Dosage des métallothionéines	63
3.3.5	Dosage du malondialdéhyde	64
3.4	Quantification des toxiques dans l'eau interstitielle	64
3.4.1	Les sondes DGT pour la mesure des métaux labiles	64
3.4.2	Les membranes SPMD pour la mesure des polluants organiques	64
3.5	Analyses des toxiques dans les différents compartiments	66
3.5.1	Dosage des métaux lourds	66
3.5.2	Dosage des substances organiques	66
3.6	Montage des appendices étudiés	68
3.6.1	Le mentum	68
3.6.2	Les ailes	68
3.7	Etude des variations de forme	68
3.7.1	Les phénodéviations	68
3.7.2	Les asymétries fluctuantes	69
3.8	Analyse des données	70
3.8.1	Données biochimiques	70
3.8.2	Cycle de vie	70
3.8.3	Fréquence de phénodéviants	71
3.8.4	L'asymétrie fluctuante de longueur	71
3.8.5	L'asymétrie fluctuante en morphométrie géométrique	72
3.8.6	L'analyse canonique de la variance entre groupe	73
3.8.7	Relation entre phénomène de canalisation et instabilités de développement	73
4	Résultats et discussions	74
4.1	Accumulation, élimination et effets biochimiques du plomb	74
4.1.1	Résultats	74
4.1.1.1	Accumulation	74
4.1.1.2	Cycle de vie	75
4.1.1.3	Concentration en malondialdéhyde	76
4.1.1.4	Concentration en métallothionéines	76
4.1.1.5	Concentration en métaux essentiels	77
4.1.1.6	Réserves énergétiques	77
4.1.1.7	Métamorphose et élimination du plomb	79
4.1.2	Discussion	79

4.2	L'exposition à un toxique a t-elle un effet sur la forme du mentum ?	85
4.2.1	Résultats	85
4.2.1.1	Suivi des paramètres physico-chimiques	85
4.2.1.2	Concentrations d'exposition et bioaccumulation	85
4.2.1.3	Taux de phénodéviations du mentum	87
4.2.1.4	Niveaux d'AF de longueur du mentum	88
4.2.1.5	Niveaux d'AF de forme du mentum	90
4.2.1.6	Forme moyenne du mentum	91
4.2.2	Discussion	93
4.3	La forme du mentum est-elle davantage sensible à une poly-exposition ?	97
4.3.1	Résultats	97
4.3.1.1	Suivi des paramètres physico-chimiques	97
4.3.1.2	Caractérisation physico-chimique des sédiments	97
4.3.1.3	Concentrations d'exposition	98
4.3.1.4	Bioaccumulation	102
4.3.1.5	Émergence	103
4.3.1.6	Taux de phénodéviations du mentum	104
4.3.1.7	Niveaux d'AF de forme du mentum	106
4.3.1.8	Forme moyenne du mentum	107
4.3.2	Discussion	108
4.4	La métamorphose amplifie t-elle les variations de forme ?	113
4.4.1	Résultats	113
4.4.1.1	Taille centroïde des ailes	113
4.4.1.2	Niveaux d'AF de forme des ailes	113
4.4.1.3	Niveaux d'AF de taille centroïde des ailes	114
4.4.1.4	Forme moyenne des ailes	116
4.4.2	Discussion	117
4.5	Les variations de forme sont-elles transmises ?	121
4.5.1	Résultats	121
4.5.1.1	Suivi des paramètres physico-chimiques	121
4.5.1.2	Bioaccumulation	121
4.5.1.3	Taux de phénodéviations du mentum	124
4.5.1.4	Niveaux d'AF de forme du mentum	125
4.5.1.5	Forme moyenne du mentum	127
4.5.2	Discussion	129
4.6	Qu'observe t-on dans le milieu naturel ?	132
4.6.1	Résultats	132
4.6.1.1	Suivi des paramètres physico-chimiques	132
4.6.1.2	Cycle de vie	132
4.6.1.3	Taux de phénodéviations du mentum	133
4.6.1.4	Niveaux d'AF de forme du mentum	134
4.6.1.5	Forme moyenne du mentum	135
4.6.2	Discussion	137
	Synthèse et perspectives	141
	Bibliographie	148
	Annexes	172

Liste des abréviations

AA : anti-asymétrie
ACP : analyse en composantes principales
AD : asymétrie directionnelle
ADN : acide désoxyribonucléique
AESN : agence de l'eau Seine Normandie
ARNm : acide ribonucléique messenger
ASE : extraction accélérée par solvant
AF : asymétrie fluctuante
ANOVA : analyse de la variance
AP : alkylphénol
CAT : catalase
CETE IDF : centre d'études techniques de l'équipement d'Ile de France
CL₅₀ : concentration létale conduisant à la mort de 50 % des individus
CO : carbone organique
CV : coefficient de variation
DDE : dichlorodiphenyldichloroéthane
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP : di(2-éthylhexyl)phtalate
DGT : gradient diffusif en film fin
F1 : génération 1
FID : détecteur à ionisation de flamme
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EH : équivalent habitant
FBC : facteur de bioaccumulation
GCL : γ -glutamylcystéine ligase
GC : chromatographie gazeuse
GC-MS : chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
GC-FID : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GSH : glutathion
GSH-Px : glutathion peroxidase
GSH-Rd : glutathion reductase
GSH-St : glutathion-S-transferase
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
Hct : hydrocarbures aliphatiques totaux
HPLC : chromatographie liquide à haute performance
HSP : protéine de choc thermique
IFSTTAR : institut français des sciences et technologies des transports, de l'aménagement et des réseaux
IRSTEA : institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
IST : indice de score toxique
ISTM : indice de score toxique modifié
Koc : coefficient de partage carbone organique eau
Kow : coefficient de partage octanol eau
KOH : hydroxyde de potassium
LOEC : concentration d'effet observable la plus faible
LCPP : laboratoire central de la préfecture de police

LEESU : laboratoire eau environnement et systèmes urbains
LPTC : laboratoire de physico-toxico-chimie des systèmes naturels
m/v : masse-volume
MANOVA : analyse de variance multivariée
MDA : malondialdéhyde
MO : matière organique
MS : matière sèche
MT : métallothionéine
NK : azote Kjeldahl
NOEC : concentration la plus élevée sans effet décelable
NP : nonylphénol
OP : octylphénol
PBDE : polybromodiphényléther
PCB : polychlorobiphényle
PE-HD : polyéthylène haute densité
PMSF : phenylmethylysulphonylfluoride
Px : peroxidase
PTFE : polytetrafluoroéthylène
SOD : superoxyde dismutase
SPE : extraction en phase solide
SPMD : membrane semi-perméable
TC : taille centroïde
v/v : volume-volume
VNF : voies navigables de France

Introduction

Contexte

Les cours d'eau et les écosystèmes qui leurs sont associés sont soumis à des pressions physiques et chimiques, naturelles ou anthropiques. Les pressions d'origine anthropique sont, d'une part, liées aux aménagements physiques, qui conduisent à des variations des vitesses d'écoulement qui influencent largement les cycles d'érosion et de sédimentation. D'autre part, les rejets ponctuels ou diffus participent à des variations du régime hydraulique, aux variations de température ainsi qu'à la contamination chimique du milieu.

Ces pressions exercent sur le milieu un stress, défini par Brett (1958) comme « un facteur environnemental qui amplifie la réponse adaptative d'un organisme ou bien qui perturbe son fonctionnement normal à tel point que ses chances de survie sont significativement réduites ». Ce stress agit sur les organismes vivants à différents niveaux, de la molécule à la physiologie en passant par la cellule. Il peut être neutralisé par des mécanismes physiologiques homéostatiques. C'est lorsque la compensation est incomplète ou impossible que des effets visibles apparaissent, pouvant conduire à la mort de l'organisme (Koehn et Bayne, 1989).

Afin d'évaluer l'état biologique d'un milieu, trois niveaux d'approche qui correspondent à des niveaux d'intégration différents, peuvent être envisagés : l'approche au niveau de la communauté, de la population ou bien encore de l'individu. L'approche communautaire est la plus représentative du fonctionnement écologique d'un écosystème. Cette échelle de travail est aujourd'hui celle qui a fourni le plus d'outils opérationnels. En particulier, le bon état écologique visé dans la directive cadre européenne sur l'eau de 2000 (DCE-2000/60/CE) repose sur des indicateurs communautaires tels que, l'indice diatomées (NF T90-354/2007), l'indice macro-invertébrés benthiques (NF T90-350/2004), l'indice macrophytes (NF T90-395/2003) ou bien encore l'indice poissons (NF T90-344/2004). Cette approche communautaire, qui consiste à analyser la présence ou l'absence de taxons, ne renseigne pas sur les effets sub-létaux de la dégradation d'un milieu. Ces informations sont pourtant indispensables si l'on souhaite intervenir rapidement au cours d'un processus de dégradation et ainsi éviter la disparition d'une espèce.

Raisonné à l'échelle de l'individu ou bien de la population, permet, *a contrario*, d'obtenir des informations précoces, et ce dès la perception par l'organisme d'un stress donné. Ainsi, la mesure de marqueurs moléculaires, cellulaires, physiologiques (Moore *et al.*, 1987) ou bien encore ontogéniques (Zakharov *et al.*, 2001) a été proposée comme méthode de détection d'un stress sub-létal.

La mesure des variations de forme affectant certains appendices d'un être vivant constitue l'une de ces méthodes. Le développement d'un organisme est sous le contrôle de nombreux gènes. Aussi, une perturbation, même mineure, au cours de cette phase de croissance et de développement, peut se traduire par l'apparition de variations morphologiques importantes (Emlen et Nijhout, 2000). C'est ainsi que la mesure des phénotypiques (Warwick, 1985), c'est à dire des déviations sévères par rapport au phénotype moyen de l'espèce, ou bien encore des asymétries fluctuantes (Palmer et Strobeck, 1986), c'est à dire des déviations mineures et non directionnelles d'un caractère par rapport à la symétrie de l'organisme, a été utilisée afin d'évaluer une exposition à un toxique. En outre, plus récemment, Hoffmann *et al.* (2002) ont montré que

l'étude de la variation de la forme moyenne de certains appendices pouvait permettre de mettre en évidence un stress toxique qu'une étude des asymétries fluctuantes n'avait pas révélé.

Dans le milieu aquatique, la mesure de marqueurs sub-létaux a aujourd'hui largement porté sur les macro-invertébrés benthiques (Admiraal *et al.*, 2000), et ce en raison de leur rôle prépondérant au sein des chaînes trophiques ainsi que de leur abondance dans le milieu naturel. Le modèle animal retenu dans ce travail, *Chironomus riparius*, appartient à la famille des diptères. Il possède un cycle larvaire aquatique et un cycle adulte aérien. Du fait de sa facilité d'élevage, cet organisme a suscité un vif intérêt pour les travaux de laboratoire (Choi *et al.*, 2000 ; Michailova *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2009). Il possède, également, des qualités non négligeables pour une utilisation comme bio-indicateur environnemental. D'une part, on le trouve aussi bien dans des environnements préservés que dans des milieux contaminés. La densité d'organismes est, en outre, importante (Wene, 1940), ce qui permet un traitement statistique fiable. D'autre part, le genre *Chironomus* est particulièrement sujet, dans des environnements pollués, aux variations phénotypiques (Hare et Carter, 1976 ; Wiederholm, 1984). Néanmoins, si cet organisme est ubiquiste, c'est également parce qu'il est relativement tolérant à la pollution. Il s'avère ainsi souvent moins sensible que d'autres taxons (Von der Ohe et Liess, 2004 ; Grosell *et al.*, 2006). Le choix de cet organisme modèle représente, par conséquent, un compromis entre tolérance et sensibilité (Carignan et Villard, 2002).

Des variations phénotypiques ont été observées chez des organismes appartenant au genre *Chironomus* et provenant d'environnements contaminés par des métaux lourds (Groenendijk *et al.*, 1998 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b ; Al-Shami *et al.*, 2011b) et/ou des substances organiques (Clarke, 1993a ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1996). Néanmoins, les conclusions issues d'expériences menées en laboratoire pour tenter d'expliquer les causes de ces variations phénotypiques demeurent ambiguës. En effet, si certains travaux établissent une relation entre présence d'un polluant et phénotypiques (Martinez *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2009), d'autres montrent qu'il n'existe aucun lien (Bird *et al.*, 1995 ; Bleeker *et al.*, 1999).

Les toxiques étudiés dans ce travail sont le plomb, un métal non essentiel au développement du chironome, et le nonylphénol, une substance organique identifiée comme perturbateur endocrinien (Renner, 1997). Ces deux contaminants font partie des 33 substances prioritaires de la directive cadre européenne sur l'eau. Ils sont, en outre, largement détectés dans l'environnement. Bien que le plomb ait fait l'objet de nombreux travaux de recherche en écotoxicologie, peu d'études ont porté sur ses effets sub-létaux (Borgmann et Norwood, 1999). De plus, des concentrations sédimentaires en plomb relativement importantes continuent à être mesurées dans le milieu naturel (analyse non publiée de la base de données 2008 de l'Agence de l'eau Seine Normandie). Par ailleurs, il existe à ce jour peu de connaissances quant aux effets toxiques du nonylphénol sur l'écosystème aquatique.

Problématique

L'analyse des variations phénotypiques affectant *Chironomus riparius* (Insecte, Diptère) peut-elle permettre de mettre en évidence un stress toxique ? Afin de répondre à cette question, nous avons évalué les variations de forme de deux appendices, le mentum et les ailes, en réponse à une exposition à un polluant, ainsi qu'à un mélange de polluants ; l'intention à terme étant de développer un indicateur précoce d'un stress toxique dans le milieu naturel.

Pour ce faire, six hypothèses ont été discutées.

Démarche scientifique

La première hypothèse testée est celle d'une consommation d'énergie accrue et de dommages cellulaires importants chez le chironome en présence de plomb dans la phase sédimentaire. En effet, les mécanismes de lutte mis en place par l'organisme pourraient entraîner une augmentation de la consommation énergétique (Choi *et al.*, 2001). En outre, ces mécanismes pourraient se révéler insuffisants pour contenir les effets délétères du toxique (Park *et al.*, 2009).

Pour valider cette hypothèse, nous avons fait croître des larves de *Chironomus riparius* du premier au dernier stade, dans un sédiment présentant des concentrations croissantes en plomb (de 3 à 500 mg/kg), un métal non essentiel. Afin d'évaluer l'exposition, d'une part nous avons mesuré les concentrations labiles en plomb *via* des membranes passives, d'autre part nous avons quantifié les concentrations accumulées dans le corps des organismes. Par ailleurs, nous avons mesuré trois marqueurs biochimiques d'un stress toxique : le niveau de malondialdéhyde (MDA), un produit de peroxydation lipidique associé à des dommages des membranes cellulaires (Suwalsky *et al.*, 2001), la quantité de métallothionéines (MT), des protéines impliquées dans les processus de piégeage des métaux lourds (Amiard *et al.*, 2006), et enfin le contenu tissulaire en réserves énergétiques (lipides, protéines et glycogène). Ces résultats sont présentés dans la première partie du chapitre 4.

La deuxième hypothèse est celle de l'existence de variations de forme affectant le mentum, une pièce buccale du chironome, en présence de plomb ou bien de nonylphénol. En effet, certains travaux ont mis en évidence l'existence de ce type de variations chez le genre *Chironomus*, provenant de milieux pollués en métaux lourds (Groenendijk *et al.*, 1998 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b) et/ou en substances organiques (Lenat, 1993 ; Hudson et Ciborowski, 1996). Toutefois, à l'heure actuelle, il n'existe pas de réel consensus quant aux molécules responsables de ces anomalies morphologiques. Des essais en laboratoire sont, par conséquent, nécessaires afin non seulement de discriminer les substances responsables mais également de déterminer l'effet de la concentration appliquée sur la fréquence et/ou la sévérité de ces variations phénotypiques (Bird, 1994).

Afin de tester cette hypothèse, nous avons exposé des larves du premier au dernier stade, en conditions contrôlées, à des concentrations toxiques sédimentaires sub-létales croissantes en plomb (de 3 à 500 mg/kg de MS), d'une part, et en nonylphénol (de 0 à 200 mg/kg de MS), d'autre part. Nous avons ensuite évalué quatre types de variations de forme affectant le mentum : (1) le taux de phénodéviation, (2) le niveau d'asymétrie fluctuante, évalué en terme de longueur et (3) en terme de forme. Enfin (4), la variation de la forme moyenne entre les groupes témoins et les groupes stressés. Ces résultats font l'objet de la deuxième partie du chapitre 4.

La troisième hypothèse est celle de l'amplification des variations de forme en présence d'une exposition à plusieurs toxiques. En effet, les résultats obtenus par Campero *et al.* (2008) et Langer-Jaesrich *et al.* (2010) suggèrent que les variations de forme seraient davantage le produit d'une combinaison de stress que d'une exposition unique.

Afin de tester cette hypothèse, des larves de chironomes provenant de notre élevage ont été exposées à du sédiment pollué (pollution minérale et organique) provenant du milieu naturel. Deux types de sédiment ont été étudiés : l'un caractérisé par une faible pollution de type urbain et l'autre par une forte pollution de type urbain et industriel. Les résultats sont présentés dans la troisième partie du chapitre 4.

La quatrième hypothèse est celle d'une amplification des variations de forme après la métamorphose. En effet, cette étape représente pour l'organisme un coût énergétique considérable (Heyland et Moroz, 2006). Elle pourrait, par conséquent, se traduire par une diminution de l'énergie allouée aux mécanismes de régulation de la variabilité phénotypique.

Afin de tester cette hypothèse, le niveau d'asymétrie fluctuante et la variation de la forme moyenne des ailes des adultes provenant de larves ayant crû dans deux sédiments prélevés dans des milieux anthropisés (cf. deuxième hypothèse) ont été quantifiés. Ceci a permis de déterminer le stade le plus adéquat à la mise en évidence d'un stress toxique. Les résultats sont développés dans la quatrième partie du chapitre 4.

La cinquième hypothèse est celle de la non transmission d'une partie des variations de forme observées à la génération suivante. En effet, un bio-indicateur environnemental se doit d'être peu transmis si l'objectif est bien de représenter les conditions stressantes subies par une population au cours de son cycle de vie. En outre, la non transmission de ces variations morphologiques confirmerait que ces dernières ne possèdent pas une origine génétique mais bien environnementale.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié les variations de forme affectant la génération F1 issue de chironomes ayant été exposés à deux sédiments provenant de milieux anthropisés (cf. deuxième hypothèse). Les résultats font l'objet de la cinquième partie du chapitre 4.

Pour conclure, nous avons discuté **l'hypothèse selon laquelle les résultats des essais en laboratoire constituent une représentation, certes simplifiée, mais conforme aux observations faites dans le milieu naturel.**

Pour ce faire, nous avons prélevé des organismes colonisant l'une des stations du milieu naturel étudiée. Sur les individus appartenant au genre *Chironomus*, nous avons évalué les variations morphologiques affectant le mentum. Nous avons, en outre, laissé croître des individus de cette population en laboratoire sur un sédiment témoin, afin d'évaluer les variations de forme affectant cette population en l'absence de stress. Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus avec ceux portant sur la souche de *Chironomus riparius* de laboratoire élevée sur du sédiment provenant de cette même station (cf. troisième hypothèse). Les résultats sont exposés dans la sixième et dernière partie du chapitre 4.

Chapitre 1

Effets sub-létaux d'un stress toxique chez les macro-invertébrés

Chez un organisme vivant, un stress toxique agit à différents niveaux : de la molécule à la physiologie en passant par la cellule (Moore *et al.*, 1987). Ainsi, afin de mettre en évidence ce stress chez les macro-invertébrés aquatiques, différents biomarqueurs, correspondant à des échelles de travail différentes, ont été proposés.

1.1 Les marqueurs moléculaires, cellulaires et physiologiques

Tous les organismes aérobies possèdent un **système de défense anti-oxydant** dans lequel intervient non seulement des **enzymes anti-oxydantes** (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (Px), glutathion peroxidase (GSH-Px), glutathion reductase (GSH-Rd), glutathion-S-transferase (GSH-St) et γ -glutamylcystéine ligase (GCL)) mais également des **piégeurs de radicaux libres** (vitamines C et E, caroténoïdes et glutathion (GSH)) (Doyotte *et al.*, 1997). Ce système assure la protection d'un organisme contre un stress oxydatif et participe au maintien de **l'équilibre homéostatique cellulaire**¹. L'exposition à un toxique peut inhiber ou activer les activités des enzymes impliquées dans ce système et entraîner une augmentation des niveaux cellulaires de molécules oxygénées fortement réactives. Lorsque les mécanismes de défense sont insuffisants, des **dommages à l'ADN** ou bien encore des **péroxydations lipidiques**² des membranes cellulaires peuvent alors apparaître. De nombreux travaux ont montré que l'étude de la réponse anti-oxydante et des altérations moléculaires et cellulaires pouvaient permettre de révéler un stress toxique (Di Giulio *et al.*, 1989 ; Doyotte *et al.*, 1997 ; Choi *et al.*, 2000).

Afin d'assurer le maintien des fonctions biochimiques impliquées dans les mécanismes de défense, un organisme **dépense de l'énergie**. Ainsi, la mesure des réserves énergétiques, présentes sous forme de glycogène, de lipides ou bien encore de protéines, a également été proposée comme biomarqueur d'une exposition toxique (Choi *et al.*, 2001).

1.1.1 La génotoxicité

L'étude des dommages à l'ADN permet d'évaluer la génotoxicité d'un composé. Des **dommages à l'ADN** ont été associés, chez *Chironomus riparius*, à la présence d'un perturbateur endocrinien (tableau 1.1), le nonylphénol, à partir de concentrations d'exposition de 10 $\mu\text{g/l}$ (Lee

1. Capacité de la cellule à conserver son équilibre interne en dépit des variations extérieures.

2. Dégradation oxydative des lipides avec formation de radicaux libres.

et Choi, 2006). Chez *Chironomus kiiensis*, Al-Shami *et al.* (2012) observent des dommages à l'ADN en présence d'un métal non essentiel, le cadmium, ainsi qu'en présence de deux métaux essentiels, le cuivre ou le zinc. Dans cette étude, le métal présentant le potentiel génotoxique le plus élevé est le cadmium, suivi du cuivre et du zinc. Par ailleurs, Michailova *et al.* (2006) notent chez *Chironomus riparius* une relation dose-réponse entre aberrations chromosomiques et exposition au cuivre pour des concentrations d'exposition variant entre 0 et 0,05 mg/l. Connors et Black (2004) relèvent des dommages à l'ADN chez *Utterbackia imbecillis* exposées à du cuivre ou à de l'atrazine ou bien encore à du diazinon. En revanche, aucun effet n'est observé ni après une exposition à du glyphosate ni après une exposition à du carbaryl.

TABLEAU 1.1 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur les dommages à l'ADN

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Al-Shami <i>et al.</i> (2012)	<i>Chironomus kiiensis</i> (Diptera, Chironomidae)	Cd ou Cu ou Zn	0-10 ou 0-20 ou 0-50 mg/l	+
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	+
Connors et Black (2004)	<i>Utterbackia imbecillis</i> (Bivalvia, Unionidae)	Cu ou atrazine ou diazinon	0-6,3 µg/l ou 0-22,55 mg/l ou 0-0,55 mg/l	+
Connors et Black (2004)	<i>Utterbackia imbecillis</i> (Bivalvia, Unionidae)	glyphosate ou carbaryl	0-5 ou 0-1,75 mg/l	0

0 : pas d'effet significatif.

+: augmentation significative des dommages à l'ADN.

1.1.2 Les protéines de stress

Les protéines de choc thermique (HSP) sont des protéines chaperonnes impliquées dans les processus de maintien homéostasique qui assurent le repliement tridimensionnel adéquat d'autres protéines. Elles doivent leur nom au fait qu'elles ont été initialement mises en évidence dans les années 1960 chez la drosophile soumise à un stress thermique (Ritossa, 1996). Plus récemment, plusieurs travaux ont rapporté **une amplification de leur expression après une exposition à un stress toxique** (Lindquist, 1986 ; Clayton *et al.*, 2000 ; Morales *et al.*, 2011).

C'est ainsi que Morales *et al.* (2011) mettent en évidence une augmentation des niveaux d'ARNm de l'HSP 70 chez *Chironomus riparius* après une courte exposition à différents perturbateurs endocriniens métallique (cadmium) ou organiques (nonylphénol, bisphénol A, ethinyles-tradiol, diethylhexyl phtalate et butyl benzyl phtalate). De même, après une courte exposition à 1 µg/l de nonylphénol (Lee et Choi, 2006) ou à 0,25 mg/l de cuivre (Karouna-Renier et Zehr, 2003) ou bien encore à 10 mM de chlorure de cadmium (Planelló *et al.*, 2010), l'expression de l'HSP 70 est activée chez *Chironomus* sp. (tableau 1.2). Clayton *et al.* (2000) constatent également ce phénomène chez *Dreissena polymorpha*, à partir d'un certain seuil de concentration en cuivre ou en tributylétain (un biocide). Au contraire, Morales *et al.* (2011) ne remarquent aucun effet sur l'expression du gène de l'HSP70 chez *Chironomus riparius* exposé à du tributylétain. Par ailleurs, chez *Gammarus fossarum*, Schill *et al.* (2003) observent une activation de l'HSP 70 pour de faibles concentrations d'exposition en cadmium. En revanche, pour de fortes concentrations, l'activité de cette protéine diminue. Ils expliquent ce résultat par l'exis-

tence, pour des concentrations d'exposition élevées, d'altérations importantes des processus de synthèse protéique.

TABLEAU 1.2 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur l'expression de la protéine HSP 70

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Planelló <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	CdCl ₂	0-10 mM	+
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	+
Karouna-Renier et Zehr (2003)	<i>Chironomus tentans</i> (Diptera, Chironomidae)	Cu	0-2 mg/l	+
Schill <i>et al.</i> (2003)	<i>Gammarus fossarum</i> (Amphipoda, Gammaridae)	Cd	0-7000 µg/l	+ puis -
Clayton <i>et al.</i> (2000)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Bivalvia, Dreissenidae)	Cu ou tributylétain	0-500 ou 0-75 µg/l	+

+ : augmentation significative de l'activité de l'HSP 70.

- : diminution significative de l'activité de l'HSP 70.

1.1.3 La neurotoxicité

De nombreux insecticides agissent par **inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChe)**, une enzyme responsable de la désactivation de l'acétylcholine dans le système nerveux. Aussi, la mesure de l'activité de l'AChe a-t-elle été proposée comme marqueur d'un stress toxique, et en particulier d'une exposition à un insecticide.

TABLEAU 1.3 – Effet d'un stress toxique chez *Chironomus riparius* sur l'activité de l'AChe

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	0
Ibrahim <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	primiphosmethyl ou carbofuran	0-512 µg/l	-
Ibrahim <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	lindane ou permethrin	0-512 µg/l	0
Ibrahim <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	zinc	0-1280 mg/l	0

0 : pas d'effet significatif.

- : inhibition significative de l'activité de l'AChe.

L'activité de l'AChe n'est pas affectée (tableau 1.3) par la présence de nonylphénol (Lee et Choi, 2006), de zinc ou bien d'insecticides tels que de lindane ou de permethrin chez *Chironomus riparius* (Ibrahim *et al.*, 1998). En revanche, cette activité diminue chez cette espèce en présence des insecticides primiphosmethyl ou carbofuran (Ibrahim *et al.*, 1998). De même, Crane *et al.* (1995) observent une inhibition de l'AChe chez une population de *Gammarus pulex* engagée à l'aval d'une zone de culture de cresson traitée au malathion 60, un insecticide

organophosphoré. Au contraire, Parker et Callagan (1997) constatent chez une population de *Simulium equinum* provenant du milieu naturel et exposée en laboratoire à du malathion 60 une activité des estérases supérieure à celle d'une population provenant d'un milieu témoin. Ils expliquent ce résultat par la sélection, dans les milieux contaminés par des insecticides, des individus possédant des enzymes de détoxification ayant de fortes activités.

1.1.4 Le métabolisme du stress oxydatif

Les réponses des enzymes impliquées dans le système de défense anti-oxydant varient largement en fonction du toxique considéré et des concentrations d'exposition (tableau 1.4).

Peu de variations de **l'activité d'enzymes marqueurs d'un stress oxydatif** ont été associées à une exposition au nonylphénol chez *Chironomus riparius* (Lee et Choi, 2006). Aucune variation de l'activité de la GSH-St n'a été observée chez *Chironomus riparius* en présence d'un insecticide, le lindane (Hirthe *et al.*, 2001). De même, Zheng *et al.* (2011) ne relèvent pas d'effet significatif du cadmium sur cette enzyme chez *Prosilocerus akamusi*. En revanche, la présence de dichromate de potassium ou de fenitrothion, un insecticide, entraîne l'activation de la CAT, de la GST-Px et de la SOD chez *Chironomus riparius* (Choi *et al.*, 2000). De plus, Lee et Choi (2009) observent chez *Chironomus tentans* exposé à de l'octachlorostyrène, un polluant industriel, une activation de la CAT et de la Px. Chez *Unio tumidus* exposé à du cuivre et/ou à du thiram, Doyotte *et al.* (1997) ne notent aucun effet sur l'activité de la SOD ; ils observent, en revanche, une inhibition de la GSH-Px et de la CAT. Par ailleurs, chez *Gammarus roeseli* exposé à du cadmium, le niveau de piègeurs de radicaux libres (GSH et caroténoïdes) est affecté (Gismondi *et al.*, 2012a).

Le système de défense anti-oxydant peut parfois se révéler insuffisant pour contenir les effets délétères des substances toxiques. Les membranes cellulaires peuvent alors être endommagées. C'est ainsi que de nombreux travaux ont révélé chez les animaux une **augmentation du malondialdéhyde (MDA), un produit de dégradation des membranes lipidiques** (péroxydation lipidique), **en présence de toxiques**, en particulier de plomb, de cadmium, de mercure ou bien encore d'arsenic (Ercal *et al.*, 2001). La mesure du MDA est aujourd'hui largement utilisée comme biomarqueur de dommages cellulaires, en particulier chez les organismes aquatiques (Valavanidis *et al.*, 2006).

Dans la littérature (tableau 1.5), une augmentation du MDA a été observée chez *Dikerogammarus villosus*, chez *Gammarus roeseli* et chez *Prosilocerus akamusi* exposés à du cadmium (Sornom *et al.*, 2012 ; Zheng *et al.*, 2011 ; Gismondi *et al.*, 2012a). Chez *Unio tumidus*, la concentration en MDA augmente après une exposition à un mélange cuivre et thiram (un fongicide) ou bien après une exposition à un effluent industriel (cokerie) (Doyotte *et al.*, 1997). Une exposition au Cl₂ entraîne une augmentation du MDA chez *Tubifex tubifex* (Nie *et al.*, 2010). De même, chez *Chironomus riparius* une augmentation du MDA a été observée en réponse à une exposition au nonylphénol (Park et Choi, 2009). En revanche, aucun effet sur cette espèce n'a été noté ni en présence d'octachlorostyrène ni en présence de bisphénol A (Park et Choi, 2009 ; Lee et Choi, 2009).

TABLEAU 1.4 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur les activités des enzymes impliquées dans le système de défense anti-oxydant

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Zheng <i>et al.</i> (2011)	<i>Prosilocerus akamusi</i> (Diptera, Chironomidae)	Cd	0-50 mmol/l	SOD=0, GSH-Px=+, GSH-Rd=-, GSH-St=0
Lee et Choi (2009)	<i>Chironomus tentans</i> Diptera, Chironomidae)	octachlorostyrène	0-5 mg/l	CAT=+, Px=+
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	CAT=+, Px=0, GSH-Px=0, GSH-St=+ puis -
Hirthe <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	lindane	0-1 ppm	GSH-St=0
Choi <i>et al.</i> (2000)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	dichromate de potassium ou fenitrothion	0-5 mg/l ou 0-20 µg/l	GSH-Px=-, CAT=+, SOD=+ caroténoïdes=-, GSH=+, GCL=+
Gismondi <i>et al.</i> (2012a)	<i>Gammarus roesei</i> (Amphipoda, Gammaridae)	Cd	0-8 µg/l	GSH-Rd=+, CAT=+
Nie <i>et al.</i> (2010)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaeta, Tubificidae)	Cl ₂	0-12 mg/l	CAT=-, SOD=0, GSH-Px=-
Doyotte <i>et al.</i> (1997)	<i>Unio tumidus</i> (Bivalvia, Unionidae)	cuivre et/ou thiram	0-30 et/ou 0-100 µg/l	

+ : augmentation significative de l'activité enzymatique.

0 : pas d'effet significatif.

- : inhibition significative de l'activité enzymatique.

TABLEAU 1.5 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur la concentration en MDA

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Zheng <i>et al.</i> (2011)	<i>Prosilocerus akamusi</i> (Diptera, Chironomidae)	Cd	0-50 mmol/l	+
Lee et Choi (2009)	<i>Chironomus tentans</i> (Diptera, Chironomidae)	octachlorostyrène	0-5 mg/l	0
Park et Choi (2009)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	1-100 µg/l	+
Park et Choi (2009)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	bisphénol A	5-500 µg/l	0
Gismondi <i>et al.</i> (2012a)	<i>Gammarus roeseli</i> (Amphipoda, Gammaridae)	Cd	0-8 µg/l	+
Nie <i>et al.</i> (2010)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaeta, Tubificidae)	Cl ₂	0-12 mg/l	+
Doyotte <i>et al.</i> (1997)	<i>Unio tumidus</i> (Bivalvia, Unionidae)	Cu + thiram	30 + 100 µg/l	+

+ : augmentation significative du niveau de MDA.

0 : pas d'effet significatif.

1.1.5 Le métabolisme de défense

Les **métallothionéines (MT)** sont des protéines présentes chez de nombreux organismes vivants (Petering et Fowler, 1986 ; Fowler, 1987). Elles interviennent dans la régulation métallique, la détoxification métallique ainsi que dans le piégeage des radicaux libres (Bonneton, 1994). Ces protéines sont riches en cystéines contenant elles mêmes des groupements thiols qui assurent le piégeage des métaux et des radicaux libres. Elles participent ainsi également à la protection des tissus contre un stress oxydatif.

Plusieurs travaux ont mis en évidence leur **augmentation chez les macro-invertébrés en présence de métaux** essentiels, tels que le cuivre et le zinc, et non essentiels, tels que le cadmium, l'argent et le mercure (voir Amiard *et al.* (2006) pour une revue de la littérature). En particulier, dans la littérature, une augmentation de la concentration de MT a été largement associée à la présence de cadmium, un métal non essentiel, (tableau 1.6) chez *Chironomus riparius* (Fabrick *et al.*, 2008 ; Gillis *et al.*, 2002), *Tubifex tubifex* (Gillis *et al.*, 2002), *Gammarus roeseli* (Gismondi *et al.*, 2012a), *Corbicula fluminea* (Baudrimont *et al.*, 1997) et *Dreissena polymorpha* (Marie *et al.*, 2006). De même, la présence de zinc, un métal essentiel, contribue à une augmentation de la concentration en MT chez les bivalves *Dreissena polymorpha* et *Corbicula fluminea* (Marie *et al.*, 2006).

TABLEAU 1.6 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur la concentration en MT

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Fabrick <i>et al.</i> (2008)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	Cd	0-50 mg/kg de MS	+
Gillis <i>et al.</i> (2002)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	Cd	0-2,68 $\mu\text{mol/g}$ de MS	+
Gillis <i>et al.</i> (2002)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaeta, Tubificidae)	Cd	0-2,68 $\mu\text{mol/g}$ de MS	+
Gismondi <i>et al.</i> (2012a)	<i>Gammarus roeseli</i> (Amphipoda, Gammaridae)	Cd	0-8 $\mu\text{g/l}$	+
Marie <i>et al.</i> (2006)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Bivalvia, Dreissenidae)	Zn et Cd	0-15,3 μM et 0-0,133 μM	+
Marie <i>et al.</i> (2006)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Bivalvia, Dreissenidae)	Cd	0-0,133 μM	+
Marie <i>et al.</i> (2006)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Bivalvia, Dreissenidae)	Zn	0-15,3 μM	0
Marie <i>et al.</i> (2006)	<i>Corbicula fluminea</i> (Bivalvia, Corbiculidae)	Zn et/ou Cd	0-15,3 μM et/ou 0-0,133 μM	+
Baudrimont <i>et al.</i> (1997)	<i>Corbicula fluminea</i> (Bivalvia, Corbiculidae)	Hg	0-5 $\mu\text{g/l}$	0
Baudrimont <i>et al.</i> (1997)	<i>Corbicula fluminea</i> (Bivalvia, Corbiculidae)	Cd	0-35 $\mu\text{g/l}$	+

+ : augmentation de la MT.

0 : pas d'effet.

1.1.6 Les réserves énergétiques

Les protéines, les lipides (triglycérides) et les glucides (glycogène) constituent les ressources énergétiques des insectes (Wigglesworth, 1942 ; Locke et Collins, 1968). La majeure partie de ces réserves énergétiques se trouve sous forme de lipides (Arrese et Soulagés, 2010). 90 % de ces lipides consistent en des triglycérides qui possèdent un pouvoir calorique par unité de poids supérieur à celui du glycogène (Gnaiger, 1983). Chez les insectes holométaboles, les réserves en lipides sont stables au cours de la vie larvaire (Arrese et Soulagés, 2010). En revanche, les réserves en glycogènes sont mobilisées au cours des cycles de mues et de la métamorphose (Hamburger *et al.*, 1996).

De nombreux travaux suggèrent qu'un **stress toxique**, en favorisant l'activation de certaines voies métaboliques, se traduit par **une réduction des réserves énergétiques** d'un organisme (Koehn et Bayne, 1989 ; Calow et Sibly, 1990).

Une augmentation de l'activité d'une enzyme associée au système de transport d'électrons dans le processus de respiration ainsi qu'une diminution significative des lipides et du glycogène (tableau 1.7) ont ainsi été relevées chez *Chironomus riparius* en présence de fenitrothion, un insecticide (Choi *et al.*, 2001). En revanche, aucune variation du contenu tissulaire en protéines, n'est observée. Par conséquent, Choi *et al.* (2001) concluent que les deux sources principales du métabolisme énergétique chez le chironome sont les lipides et le glycogène. Ils observent, en outre, qu'après 48 heures d'exposition, le contenu en réserves énergétiques du chironome retrouve son niveau d'origine.

Chez *Chironomus riparius* exposé pendant sept jours à du cuivre (tableau 1.7), Servia *et al.* (2006) ne notent que peu ou pas de variations du niveau de glycogène ; ils observent néanmoins une légère diminution des lipides, en particulier chez les femelles. Les lipides seraient, par conséquent, la principale source d'énergie mobilisée en réponse à une exposition métallique . En outre, Servia *et al.* (2006) remarquent que les réserves énergétiques des femelles sont davantage affectées que celles des mâles.

TABLEAU 1.7 – Effet d'un stress toxique chez quelques invertébrés aquatiques sur les réserves énergétiques

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Ha et Choi (2008b)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	protéine=0
Ha et Choi (2008b)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	Pb	0-500 mg/l	protéine=0
Jin-Clark <i>et al.</i> (2008)	<i>Chironomus tentans</i> (Diptera, Chironomidae)	alachlore	0-1 µg/l	protéine=0
Jin-Clark <i>et al.</i> (2008)	<i>Chironomus tentans</i> (Diptera, Chironomidae)	métolachlore	0-1 µg/l	protéine=-
Servia <i>et al.</i> (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	Cu	0-50 mg/kg de MS	lipide=- (femelles), glycogène=0
Choi <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	dichromate de potassium ou fenitrothion	0-5 mg/l ou 0-20 µg/l	lipide=-, glycogène=-, protéine=0
Tripathi et Singh (2002)	<i>Lymnea acuminata</i> (Gastropoda, Lymacidae)	dimethoate ou carbaryl	0-12 mg/l	glycogène=-
Gismondi <i>et al.</i> (2012a)	<i>Gammarus roeseli</i> (Amphipoda, Gammaridae)	Cd	0-8 µg/l	lipide=-, glycogène=-
Graney et Giesy (1968)	<i>Gammarus pseudolimnaeus</i> (Amphipoda, Gammaridae)	pentachlorophénol	0-0,77 mg/l	lipide=-, glycogène=-, protéine=-

0 : pas d'effet significatif.

- : diminution significative.

Chez *Lymnea acuminata*, Tripathi et Singh (2002) observent une diminution du glycogène dans les tissus après une exposition à des insecticides (dimethoate ou carbaryl) ce qui suggère une utilisation directe d'énergie pour faire face au stress toxique (tableau 1.7). Gismondi *et al.* (2012a) notent également une diminution des lipides et, dans une moindre mesure, du glycogène chez *Gammarus roeseli* exposé à une solution contenant du cadmium.

Il a été noté chez *Gammarus pseudolimnaeus* et chez *Chironomus tentans* une diminution des réserves en protéines en présence de pentachlorophénol (un fongicide) et de métolachlore (un herbicide), respectivement (Graney et Giesy, 1968 ; Jin-Clark *et al.*, 2008). En revanche, aucune variation n'a été constatée ni en présence d'alachlore (un herbicide) chez *Chironomus tentans* (Jin-Clark *et al.*, 2008) ni en présence de fenitrothion (un insecticide) chez *Chironomus riparius* (Choi *et al.*, 2001). Chez *Daphnia magna*, les premières réserves énergétiques mobilisées au cours d'un stress toxique sont les réserves lipidiques (De Coen et Janssen, 1997). Selon De Coen

et Janssen (1997), les réserves sous forme de protéines et de glycogène ne seraient affectées que pour des concentrations d'exposition élevées.

1.1.7 Les marqueurs physiologiques

Les **xénobiotiques** exercent un stress non seulement sur l'**équilibre homéostatique** cellulaire mais également sur les **réserves énergétiques** des organismes. La consommation d'énergie accrue en présence d'un toxique peut se faire au détriment de celle nécessaire à la croissance et à la fonction de reproduction. Des **effets sur la physiologie** peuvent alors apparaître (tableau 1.8).

TABLEAU 1.8 – Effet d'un stress toxique chez *Chironomus riparius* sur les marqueurs physiologiques

	espèce	toxique	gamme de concentrations	réponse
Agra et Soares (2009)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	cypermethrin	0-0,1 µg/l	mâle/femelle=0, croissance larve=0
Agra et Soares (2009)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	chlorpyrifos	0-0,1 µg/l	mâle/femelle=+, croissance larve=0 temps
Hirthe <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	lindane	0-1 ppm	développement=+, taille adulte=- , fécondité=- croissance larve=0, temps
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	nonylphénol	0-100 µg/l	développement=0 temps
Hwang <i>et al.</i> (2004)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	DDE	2-11 mg/kg (nourriture)	développement=+, fécondité=-
Karouna-Renier et Zehr (2003)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	Cu	0-2 mg/l	masse larvaire=-

0 : pas d'effet.

+ : augmentation.

- : diminution.

C'est ainsi qu'une exposition au lindane a été associée chez *Chironomus riparius* à une **réduction de la taille** du corps des adultes, de la **fécondité** et à un allongement du temps d'émergence (Hirthe *et al.*, 2001). La présence de cuivre, un métal essentiel, en concentrations supérieures à 0,5 mg/l peut, en outre, entraîner une diminution de la masse des larves de *Chironomus riparius* (Karouna-Renier et Zehr, 2003). Hwang *et al.* (2004) montrent que le DDE affecte la fécondité de *Chironomus riparius*. Ils observent également une augmentation du temps de développement en présence de DDE ou de PCB. De plus, Agra et Soares (2009) remarquent une augmentation du nombre de mâles, par rapport au nombre de femelles, en présence de 0,1 µg/l de chlorpyrifos, un insecticide.

En outre, la consommation d'énergie accrue, d'une part, ainsi que l'altération des mécanismes assurant la régulation du développement, d'autre part, pourraient contribuer à l'apparition

de **variations phénotypiques**. C'est ainsi que des phénodéviances (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1996 ; Servia *et al.*, 2004) ou bien des asymétries fluctuantes (Bonada *et al.*, 2005 ; Al-Shami *et al.*, 2011b), ont été largement associées, chez les macro-invertébrés aquatiques, à une exposition toxique dans le milieu naturel. Par conséquent, la mesure de ces marqueurs ontogéniques a également été proposée comme indicateur d'un stress toxique sub-létal (Warwick, 1985 ; Clarke, 1993a). Dans la partie suivante, nous nous attacherons à définir les termes nécessaires à la compréhension de ces variations phénotypiques.

1.2 La forme, un marqueur ontogénique : définitions

Une revue de la littérature portant sur la forme en biologie fait apparaître des définitions variées des termes stabilité de développement, instabilité de développement, bruit de développement, canalisation et homéostasie (Palmer et Strobeck, 1986 ; Clarke, 1992 ; Graham *et al.*, 1993a ; Zakharov, 1994 ; Møller et Swaddle, 1997 ; van Dongen, 2006). Aussi choisissons-nous d'utiliser les définitions les plus récentes données par Debat (2000), Palmer et Strobeck (2003) et van Dongen (2006).

Trois mécanismes de régulation participent à la production d'un phénotypique : **la stabilité de développement, la canalisation et la plasticité phénotypique**. La figure 1.1 schématise les concepts définis par la suite.

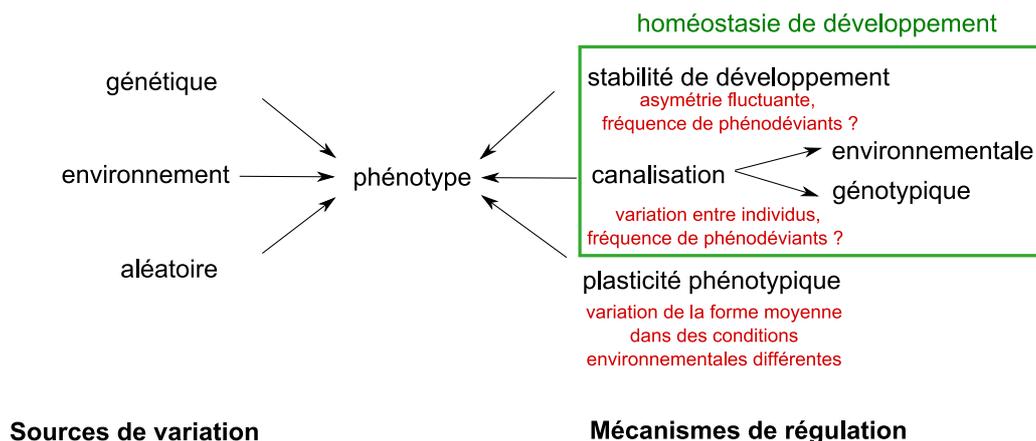


FIGURE 1.1 – Schéma des sources de variation et de régulation du phénotype D'après les travaux de Debat (2000), Zakharov *et al.* (2001) et Palmer et Strobeck (2003). En rouge, les marqueurs utilisés actuellement pour évaluer les différents mécanismes de régulation.

1.2.1 L'homéostasie de développement

L'**homéostasie** de développement représente l'ensemble des mécanismes internes de régulation permettant la production d'un phénotype cible. Elle est assurée par deux mécanismes : **la stabilité de développement** et **la canalisation**. La stabilité de développement assure une régulation au sein d'un même environnement tandis que la canalisation assure la production de phénotypes constants dans des environnements différents.

Les protéines de choc thermique HSP pourraient être impliquées dans ces **mécanismes de régulation phénotypique**. En effet, chez la drosophile, plusieurs travaux ont montré qu'une altération de ces protéines pouvaient se traduire par l'apparition de variations morphologiques inter et/ou intra-individuelles (Rutherford et Lindquist, 1998 ; Roberts et Feder, 1999

; Meiklejohn et Hartl, 2002 ; Debat *et al.*, 2006 ; Milton *et al.*, 2006). Récemment, Debat *et al.* (2011) ont, en outre, montré que la sur-expression de la Cycline G³ affectait la stabilité de développement de la drosophile.

1.2.2 La stabilité de développement

Les perturbations aléatoires se produisant au cours du développement d'un organisme sont appelées **bruit de développement**. Elles correspondent à l'aléas intrinsèque lié à tout système biologique. En réponse à ces perturbations, un système de développement peut produire des variations morphologiques appelées **instabilités de développement**. Les termes bruit de développement et instabilités de développement définissent ainsi un même et unique phénomène. Par ailleurs, les systèmes biologiques mettent en place des mécanismes **homéostasiques de développement** permettant de tamponner ces perturbations et par conséquent d'exprimer un phénotype cible. En particulier, la **stabilité de développement** constitue l'un d'eux (figure 1.2). Elle est aujourd'hui largement évaluée, dans une population, grâce à la mesure de l'**asymétrie fluctuante**.

1.2.3 Les asymétries

Les **asymétries**, concept apparu en 1932 avec les travaux de Ludwig, sont, pour les organismes à symétrie bilatérale, des déviations mineures d'un caractère par rapport à la ligne de symétrie. Les deux côtés d'un animal à symétrie bilatérale sont identiques car produits par le même génome, soumis aux mêmes processus de différenciation cytoplasmique et produits dans des conditions environnementales identiques (Mather, 1953). Par conséquent, une déviation indique une perturbation qui peut être d'origine génétique, environnementale ou bien le produit de l'interaction génotype-environnement (Markow, 1995).

Ces asymétries se présentent sous la forme d'**asymétrie fluctuante** (AF), d'**anti-asymétrie** (AA) et d'**asymétrie directionnelle** (AD) (van Valen, 1962) (figure 1.2). L'AD consiste en une variation de la symétrie bilatérale avec une différence statistiquement significative entre les deux côtés. Dans une population, le côté le plus touché de chaque individu est généralement le même. L'AA est également définie comme une variation de la symétrie bilatérale avec une différence statistiquement significative entre les deux côtés. Le côté le plus touché est, à la différence de l'AD, aléatoire. L'AF est une déviation non directionnelle et aléatoire par rapport à la symétrie bilatérale. La distribution des AF dans une population est normale et présente une moyenne égale à 0.

Les **AF** représentent la balance entre deux phénomènes : la **stabilité de développement** et le **bruit de développement**. Ce type d'asymétrie serait peu héritable (Fuller et Houle, 2003). A la différence de Graham *et al.* (1993a), Palmer et Strobeck (1992) soulignent qu'AD et AA ne peuvent pas être utilisées pour évaluer le niveau d'instabilité de développement. En effet, ce type d'asymétries posséderait, selon eux, une composante génétique méconnue. Les AF constitueraient, en revanche, une mesure des **instabilités de développement**.

Deux phénomènes génétiques pourraient favoriser l'apparition des AF : le faible niveau **d'hétérozygotie**⁴ et la rupture de **co-adaptation génomique**⁵ (Graham et Felley, 1985 ; Alibert

3. Les cyclines sont une famille de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

4. L'hétérozygotie pour un gène correspond au fait de posséder deux allèles différents de ce gène sur un même locus pour chacun des chromosomes homologues.

5. La co-adaptation génomique désigne le processus selon lequel la sélection aurait favorisé des systèmes de

et al., 1994).

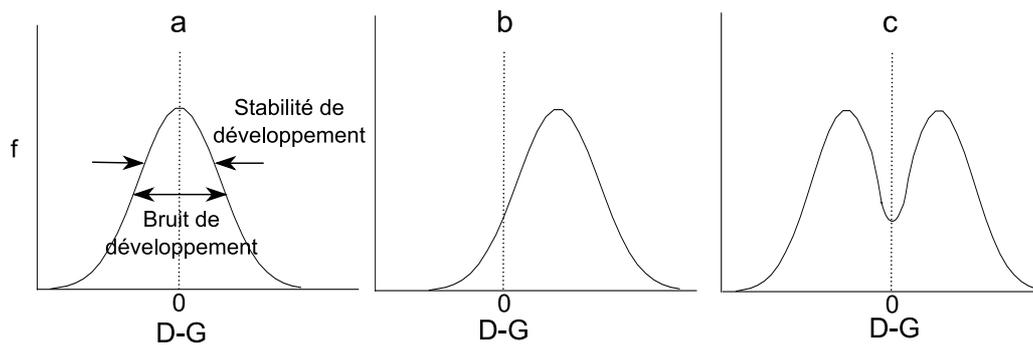


FIGURE 1.2 – Trois distributions de la différence droite gauche (D-G)
a) AF, b) AD, c) AA, d’après Palmer (1994)

En effet, certains travaux suggèrent que l’**hétérozygotie** augmente les capacités tampons au cours du développement (Mather, 1953 ; Koehn et Bayne, 1989 ; Clarke, 1998). La **consanguinité**, la **sélection** et tous les processus qui réduisent la **variabilité génétique** favoriseraient, au contraire, les AF. Toutefois, d’autres travaux n’ont pas permis d’établir une relation entre niveau d’hétérozygotie et degré d’AF (Thoday, 1958 ; Beardmore, 1960 ; Fewler et Whitlock, 1994). En outre, les différences de niveau d’AF observées entre des populations provenant du milieu naturel pourraient être expliquées par d’autres phénomènes que l’hétérozygotie. En particulier, l’histoire de la population pourrait jouer un rôle essentiel (Clarke, 1993b).

Il existe une différence de sensibilité aux AF entre populations naturelles et populations maintenues en laboratoire. Selon Beardmore (1960), les populations naturelles possèdent des gènes permettant de tamponner les variations environnementales. Ceci est le résultat d’une sélection naturelle et semble disparaître chez des populations maintenues dans des conditions constantes de laboratoire. Ainsi, il observe que si des populations hybrides de drosophiles issues de croisement en laboratoire et possédant un fort degré d’hétérozygotie présentent moins d’asymétries à température constante, elles développent plus d’asymétries dès que l’on fait varier ce paramètre. Pour Thoday (1958), les hybrides développeraient plus d’asymétries en raison du phénomène de **rupture de co-adaptation de leur génome**. Aussi, la **co-adaptation génomique** jouerait un rôle plus important dans le maintien de la symétrie que l’hétérozygotie (Thoday, 1958 ; Clarke *et al.*, 1992).

Pour l’analyse des AF, on distingue généralement deux types de traits : les **traits métriques** et les **traits méristiques**. Pour évaluer les AF affectant un trait métrique, on a tout d’abord eu recours à la **morphométrie**⁶ **traditionnelle** (Palmer et Strobeck, 1986). La variation observée consiste dans ce cas à mesurer la différence entre la longueur du côté gauche et celle du côté droit. Ce qui correspond pour une population à :

$$AF = \frac{\sum_{i=1}^n |G_i - D_i|}{n_{tot}} \quad (1.1)$$

avec n_{tot} : le nombre d’individus, G_i la longueur du côté gauche et D_i la longueur du côté droit de l’individu i .

gènes fonctionnant harmonieusement les uns avec les autres.

6. Mesure et analyse de la forme (Daly, 1985)

Cet indice a par la suite été amélioré, de façon à prendre en compte non seulement la taille du trait étudié mais également l'erreur liée à la mesure (Palmer et Strobeck, 2003). Puis, la **morphométrie géométrique** (Rohlf et Marcus, 1993) a fait son entrée dans le domaine des instabilités de développement (Klingenberg et McIntyre, 1998) permettant ainsi de fournir des informations sur l'asymétrie de taille et de forme de structures plus compliquées.

En ce qui concerne les traits méristiques, c'est à dire ceux comportant des éléments dénombrables, tels que les dents ou bien les soies, l'évaluation des AF repose sur la formule suivante (Clarke, 1993a):

$$AF = \frac{\sum_{i=1}^n (G_i - D_i)^2}{n_{tot}} \quad (1.2)$$

avec n_{tot} : le nombre d'individus, G_i le nombre d'éléments à gauche et D_i le nombre d'éléments à droite de l'individu i .

L'évaluation des asymétries d'un trait méristique revient à réaliser, dans le cas d'ajout ou de suppression d'éléments de façon non symétrique, une analyse des **phénodéviation**s. Aussi la différence entre phénodéviation et asymétrie fluctuante n'est-elle pas toujours évidente.

1.2.4 La canalisation

Si les instabilités de développement consistent en une mesure de la variation intra-individuelle, le phénomène de **canalisation** renvoie, quant à lui, à une **variation entre individus**. La canalisation est un phénomène assurant la production d'un phénotype constant en présence de conditions fluctuantes. Aujourd'hui, on distingue une **canalisation génétique**, c'est à dire liée à une pression génotypique (mutation, hybridation, consanguinité), d'une **canalisation environnementale** inhérente à un stress exogène (variation de température, présence de toxiques, diminution de nourriture, parasitisme) (Wagner *et al.*, 1997 ; Milton *et al.*, 2006).

Certains travaux rapportent une corrélation entre la stabilité de développement, évaluée en terme d'AF, et la canalisation, **évaluée en terme de variation entre individus** (Klingenberg et McIntyre, 1998 ; Debat *et al.*, 2006). Aussi, Klingenberg et McIntyre (1998) émettent l'hypothèse d'une origine commune entre ces deux mécanismes. Toutefois, d'autres travaux mettent en évidence de faibles liens entre l'AF et la variation entre individus (Woods *et al.*, 1999 ; Debat *et al.*, 2000 ; Kristensen *et al.*, 2003). De plus, chez la drosophile alors que la canalisation est affectée lorsque le fonctionnement de la protéine chaperonne HSP 90 est perturbé, le niveau d'AF, au contraire, ne varie pas (Milton *et al.*, 2003). De même, Takahashi *et al.* (2011) observent qu'une perturbation d'un gène codant pour la protéine chaperonne HSP 70 entraîne une augmentation de la variation inter-individus, mais pas du niveau d'AF. Ces résultats suggèrent que deux mécanismes différents contrôlent la canalisation et la stabilité de développement. Néanmoins, à l'heure actuelle, le débat portant sur cette question n'est pas clos.

1.2.5 Les phénodéviation

Les **phénodéviation**s consistent en une **expression anormale** et relativement rare d'un trait (Rasmuson, 1960 ; Zakharov *et al.*, 2001). Certains travaux suggèrent que la mesure de la phénodéviation peut constituer une mesure de la stabilité de développement (Lerner, 1954 ; Rasmuson, 1960 ; Graham *et al.*, 1993b ; Møller et Swaddle, 1997 ; Muzlanov, 2002 ; Polak et Tomkins, 2012). Néanmoins, plusieurs travaux rapportent l'absence de corrélation entre le

niveau d'asymétrie fluctuante (le descripteur de la stabilité de développement le plus fréquemment utilisé) et la fréquence de phénodéviants (Clarke, 1993c ; Zakharov *et al.*, 2001 ; Stige *et al.*, 2004). Aussi, Zakharov *et al.* (2001) concluent que la mesure de la phénodéviations ne saurait constituer une mesure pertinente de la stabilité de développement. L'évaluation des anomalies morphologiques pourrait représenter une mesure de la stabilité de développement dans la cas d'une absence de variations génétique et environnementale entre les individus. Or, ces conditions sont rarement réunies au cours des expériences de laboratoire (Kristensen *et al.*, 2003).

L'apparition de phénodéviations pourrait être liée à l'**altération de la protéine chaperonne HSP 90**. En effet, Rutherford et Lindquist (1998) ont mis en évidence des anomalies morphologiques importantes chez la drosophile lorsque cette protéine était endommagée (par mutation du gène codant la protéine ou bien par inhibition toxique). Selon elles, l'HSP 90 contribuerait à tamponner les accidents survenant au cours du développement ; en son absence des anomalies morphologiques, jusque là non exprimées, pourraient apparaître. De même, Roberts et Feder (1999) ont montré qu'en présence d'un stress thermique, l'augmentation des copies du gène de l'HSP 70 permettait de tamponner les anomalies morphologiques affectant les ailes et l'abdomen de la drosophile.

Dans le milieu aquatique, les phénodéviations ont été observées chez les diatomées (Smith et Manoylov, 2007), les hydres (Pachura-Bouchet *et al.*, 2006), les moules (Strayer, 2008), les daphnies (LeBlanc *et al.*, 2000), les trichoptères (Tessier *et al.*, 2000) ainsi que chez les moustiques (Awad et Mulla, 1984) exposés à des pollutions métalliques ou organiques. Toutefois, **l'essentiel de la littérature traitant de la relation entre une pollution aquatique et la fréquence de phénodéviants porte sur la capsule céphalique de la larve du chironome** (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1996 ; Vermeulen *et al.*, 1998).

La plus simple façon d'évaluer les phénodéviations dans une population consiste à effectuer le **rapport du nombre de phénodéviants sur le nombre total d'organismes observés**. Néanmoins, certains auteurs ont proposé d'affiner cette estimation en pondérant les phénodéviations observées. Ainsi, afin de calculer le taux de phénodéviations affectant les antennes (Warwick, 1985), ou bien le mentum, une pièce buccale, de la larve du chironome appartenant au genre *Chironomus*, des indices pondérés ont été développés (Lenat, 1993 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b ; Vermeulen *et al.*, 1998 ; Al-Shami *et al.*, 2011a). Leur calcul est donné en annexe 1. Toutefois, Hämäläinen (1999) a montré que ces indices n'apportaient aucune information supplémentaire. En outre, il insiste sur le fait qu'ils font largement recourt à des notions vagues et subjectives (difformité sévère, importante, faible...), ce qui rend leur intérêt limité.

1.2.6 La plasticité phénotypique

La **plasticité phénotypique** correspond à la capacité d'un organisme à produire un **phénotype adapté aux conditions environnementales** qui règnent au cours du développement. La phase de développement est sous le contrôle de nombreux gènes. Pour un même génotype, une modification des caractéristiques environnementales au cours du développement peut entraîner une modification de l'expression de certains de ces gènes (Schlichting et Smith, 2002) et se traduire, alors par des changements morphologiques (Emlen et Nijhout, 2000), physiologiques et/ou comportementaux (West-Eberhard, 1989). La plasticité phénotypique est spécifique à un trait ou bien à un ensemble de traits (Scheiner, 1993). En laboratoire, elle a, par exemple, été observée chez la daphnie en présence d'un prédateur (Stearns, 1989) ou de composés toxiques (Pijanowska *et al.*, 2007).

La plasticité phénotypique peut être évaluée grâce à l'analyse de la **variation de la forme moyenne** entre groupes soumis à des conditions environnementales différentes (Hoffmann et Woods, 2001).

1.3 Les variations de forme dans les milieux pollués

Nous discuterons dans cette partie des variations phénotypiques observées chez des organismes provenant de milieux pollués.

1.3.1 Les phénodéviations

Les travaux sur la phénodéviations chez les macro-invertébrés benthiques soumis à un stress toxique portent **essentiellement sur la larve du chironome**. Dès 1971, Hamilton et Sæther observent la présence de larves de chironomes possédant des menta difformes dans des environnements pollués. Au cours de l'année 1985, Warwick présente un article sur les phénodéviations des antennes et propose alors une méthode d'évaluation de ces phénodéviations. Ce n'est toutefois qu'à partir des années 1990 (figure 1.3), que plusieurs publications font état d'augmentations significatives du taux de phénodéviations chez des organismes prélevés dans des environnements soumis à des pollutions d'origine industrielle (Dickman *et al.*, 1992 ; van Urk *et al.*, 1992 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b), urbaine (van Urk *et al.*, 1992 ; Hudson et Ciborowski, 1996) et agricole (Bird, 1994). L'utilisation de ces anomalies comme indicateur d'un stress toxique dans l'environnement a alors été proposée (Lenat, 1993 ; Vermeulen, 1995).

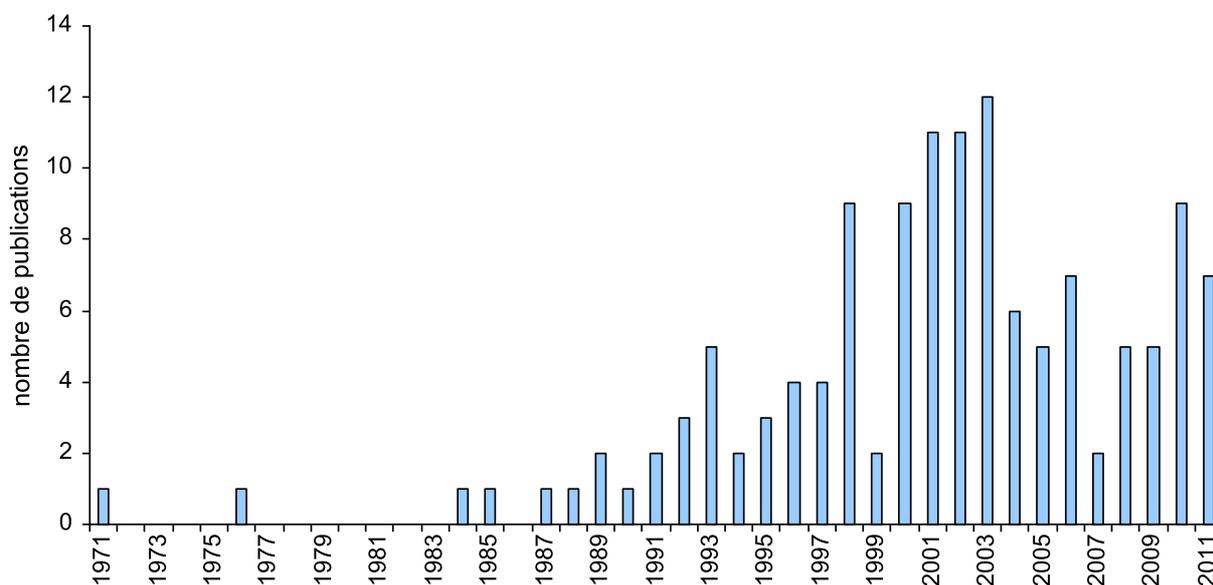


FIGURE 1.3 – Nombre de publications contenant dans le titre, le résumé ou bien les mots clés les termes « difformité (deformit*) » et « chironomes (chironom*) », en fonction du temps
Analyse de la base de données Web of Science.

TABLEAU 1.9: Effet de la pollution en milieu naturel sur le taux de phénodéviations chez les organismes appartenant à la famille des Chironomidae

référence bibliographique	taxon	trait	localisation	type de pollution	résultats
Hamilton et Saether (1971)	Chironomidae	mentum	lacs Erie et Okanagan, Canada	urbaine / industrielle / agricole	0 / + / +
Hare et Carter (1976)	<i>Chironomus</i> (s.s)? <i>cucuni</i>	mentum	baie Georgian et crique Parry, Canada	industrielle	+
Wiederholm (1984)	Chironomidae	mentum, mandibules, prémandibules	12 lacs, Suède	industrielle	+
Warwick (1985)	<i>Chironomus</i> spp.	antennes	lacs Tobin et Last Mountain, Canada	agricole + industrielle	+
Warwick <i>et al.</i> (1987)	<i>Chironomus</i> spp.	mentum	lac Port Hope, Canada	métaux lourds + ²³⁸ U + ²³² Th	+
Pettigrove (1989)	<i>Procladius paludicola</i>	ligule	rivières Murray et Darlings, Australie	agricole	+
Warwick (1990)	Chironomidae	mentum, antennes	lac St Louis et bassins Laprairie, Canada	industrielle + urbaine	+
Dickman <i>et al.</i> (1992)	Chironomidae	mentum	bassin versant rivière Niagara et lac Huron, Canada	industrielle	+
van Urk <i>et al.</i> (1992)	<i>Chironomus</i> cf. <i>plumosus</i> <i>Chironomus</i> spp.,	mentum	lac Vossemeer, Pays Bas	urbaine + industrielle	+
Madden <i>et al.</i> (1992)	<i>Dicrotendipes conjunctus</i> , <i>Procladius paludicola</i> <i>Chironomus</i> spp.	mentum, antennes	crique Cox et Aldgate, Australie	pesticide	+
Lenat (1993)	<i>Chironomus</i> spp.	mentum	rivières Caroline du Nord, Etats-Unis	pollution organique / rejets toxiques	0 / +
Diggins et Stewart (1993)	Chironomidae	mentum	rivière Buffalo, Etats-Unis	industrielle	+

référence bibliographique	taxon	trait	localisation	type de pollution	résultats
Bird (1994)	Chironomidae <i>Chironomus</i>	mentum	rivière Yasmake, Canada	urbaine / agricole	+ / +
Hudson et Ciborowski (1996)	spp. et <i>Phaenospectra</i> spp.	mentum	rivières Ste Claire et Détroit, Canada	organochlorée	+
Janssens de Bisthoven <i>et al.</i> (1996)	<i>Chironomus</i> spp.	mentum, antennes, mandibules	ruisseau, Pays-Bas	toluène + xylène	+
Janssens de Bisthoven <i>et al.</i> (1998b)	<i>Chironomus</i> <i>gr. thummi</i>	mentum, mandibules, pecten	rivières, Belgique	métaux lourds	+
Servia <i>et al.</i> (1998)	<i>Prodiamesa</i> <i>olivacea</i> , <i>Chironomus</i> <i>riparius</i>	prémandibules, mandibules, pecten, antennes	rivière Santiago de Compostelle, Espagne	urbaine	+
Vermeulen <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus</i> <i>riparius</i>	mentum, prémandibules, mandibules, pecten, antennes	3 rivières, Danemark	urbaine + agricole / urbaine / industrielle	+ / + / +
Groenendijk <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus</i> <i>riparius</i>	mentum	rivière Dommel, Belgique	métaux lourds	+
Kuhlmann <i>et al.</i> (2000)	<i>Chironomus</i> spp.	mentum	rivière Tiete, Brésil	urbaine + industrielle + agricole	+
Reynolds et Ferrington (2001)	Chironomidae	mentum	réservoir Empire Lake, Etats-Unis	métaux lourds	0
Dudley <i>et al.</i> (2001)	Chironomidae	mentum	rivières autour de Tchernobyl, Biélorussie	radiation	+
Janssens de Bisthoven et Gerhardt (2002)	Chironomidae	mentum, antennes, mandibules	rivière de Scanie, Suède	industrielle	+
Martinez <i>et al.</i> (2002)	Chironomidae	mentum	rivière aval mines Coeur d'Alene, Etas-Unis	métaux lourds	+
Bhattacharyay <i>et al.</i> (2005)	Chironomidae	antennes	rivière Damodar, Inde	métaux lourds	+

référence bibliographique	taxon	trait	localisation	type de pollution	résultats
MacDonald et Taylor (2006)	Chironomidae	mentum	rivières et lac Nord Nova scotia, Canada	agricole + forestière + urbaine	+
Swansburg <i>et al.</i> (2009)	Chironomidae	mentum	rivière aval mines, Canada	métaux lourds	+
Al-Shami <i>et al.</i> (2011a)	<i>Chironomus</i> spp.	mentum	3 rivières bassin Juru, Malaisie	urbaine + industrielle	+

+ : fréquence supérieure dans le site pollué par rapport au site de référence.

0 : pas de différence significative entre le site de référence et le site pollué.

Dans le milieu naturel, **les phénodéviations du mentum ont été corrélées à la présence de métaux** essentiels (le cuivre et le zinc) et non essentiels (l'arsenic, le cadmium et le plomb) dans le corps des larves et les sédiments (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b ; Martinez *et al.*, 2002). En outre, Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) ont mis en évidence une relation positive entre la quantité de plomb et de cuivre dans les larves et la fréquence de phénodéviations du pecten épipharynge.

Grâce à leurs travaux traitant de la relation entre les difformités du mentum de la larve de *Chironomus riparius*, les concentrations sédimentaires en métaux lourds et l'anthropisation du milieu, menés sur trois cours d'eaux danois, Vermeulen *et al.* (1998) ont établi une classification des sédiments en fonction de la fréquence de phénodéviations mesurée. Ainsi, par exemple, une fréquence inférieure à 8 % permet de distinguer un sédiment très faiblement contaminé d'un sédiment faiblement contaminé (tableau 1.10).

TABLEAU 1.10 – Classification des sédiments, d'après Vermeulen *et al.* (1998), en fonction de la fréquence de phénodéviations observée chez les larves appartenant au 4^{ème} stade de l'espèce

<i>Chironomus riparius</i>		
classe	fréquence de phénodéviations (%)	niveau de contamination du sédiment
I	< 0,8	propre
II	$0,8 \leq < 8$	très faible
III	$8 \leq < 18$	faible
IV	$18 \leq < 38$	modéré
V	$38 \leq < 60$	élevé
VI	$60 \geq$	très élevé

Les phénodéviations ont été largement observées sur le genre *Chironomus* (tableau 1.9), principalement pour trois raisons : ce taxon est abondant dans le milieu naturel et ce même dans des environnements dégradés (Marques *et al.*, 1999), il possède des habitudes de vie (déplacement, alimentation, construction de tubes de sédiment) qui l'exposent davantage aux toxiques présents dans la phase sédimentaire (Reynolds et Ferrington, 2001 ; Martinez *et al.*, 2002) et enfin, sa sensibilité aux phénodéviations a été montrée supérieure à celle des autres genres (Bird, 1994 ; Diggins et Stewart, 1993 ; Hudson et Ciborowski, 1996 ; Servia *et al.*, 1998).

Peu de travaux ont porté sur le niveau taxonomique de l'espèce ; la plupart s'arrêtent, en effet, à la famille ou bien au genre (tableau 1.9). Ceci peut être expliqué, d'une part, par le manque de connaissances quant à la détermination des espèces à partir des larves de Chironomidae (Reynolds et Ferrington, 2001), et en particulier de celles appartenant au genre *Chironomus* (Wiederholm, 1984 ; Sharley *et al.*, 2004). D'autre part, dans le milieu naturel, les assemblages de chironomes sont largement dépendants des caractéristiques physico-chimiques du site (vitesse du courant, profondeur, granulométrie du sédiment, teneur en matière organique...) (Lobinske *et al.*, 1996 ; Marques *et al.*, 1999 ; Arambourou et Chenevoy, 2010). Ainsi, si l'on souhaite obtenir des effectifs suffisants pour pouvoir comparer des stations entre elles, il s'avère souvent nécessaire de regrouper les différentes espèces colonisant une station (Reynolds et Ferrington, 2001).

Les analyses de phénodéviations ont porté sur différentes structures sclérifiées de la capsule céphalique de la larve du chironome (tableau 1.9) : sur le mentum (famille des Chironomidae) (Hamilton et Saether, 1971 ; Warwick *et al.*, 1987), sur la ligule (famille des Tanypodinae)

(Pettigrove, 1989), sur les mandibules (Wiederholm, 1984), sur les prémandibules (Wiederholm, 1984), sur le pecten épipharynge (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b) ainsi que sur les antennes (Warwick, 1985). **La majorité des travaux se sont, néanmoins, focalisés sur le mentum** et ce pour plusieurs raisons (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b). Premièrement, à la différence des antennes, il s'agit d'une structure très rigide et donc peu sensible à la pression exercée lors du montage entre lame et lamelle. Deuxièmement, à la différence du pecten épipharynge, c'est une structure dont la forme varie peu entre les individus (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998c). Enfin, à la différence des prémandibules, c'est une structure qui peut présenter des anomalies facilement observables. Servia *et al.* (2004) ont toutefois montré, dans le milieu naturel, que les antennes sont plus sensibles à la phénotypisation que le mentum. Au contraire, chez des organismes exposés en laboratoire à des perturbateurs endocriniens, si certains travaux rapportent une réponse du pecten épipharynge en l'absence de réponse du mentum (Vermeulen *et al.*, 2000), d'autres révèlent le résultat inverse (Meregalli *et al.*, 2001 ; Watts *et al.*, 2003).

1.3.2 Les asymétries fluctuantes

Si dès 1942, Waddington évoque le concept de stabilité de développement, repris en 1953 par Mather à travers ses travaux portant sur la relation entre génotype et asymétries chez *Drosophila melanogaster*, il faudra attendre les travaux de Beardmore en 1960 pour voir apparaître l'idée d'une **relation entre stress environnemental** (variation thermique) **et stabilité de développement**. Les années 1990 sont marquées par une quantité importante de publications (figure 1.4) mettant en évidence une corrélation entre stress environnemental, chimique et thermique essentiellement, et AF dans le milieu naturel (Clarke, 1993a ; Groenendijk *et al.*, 1998).

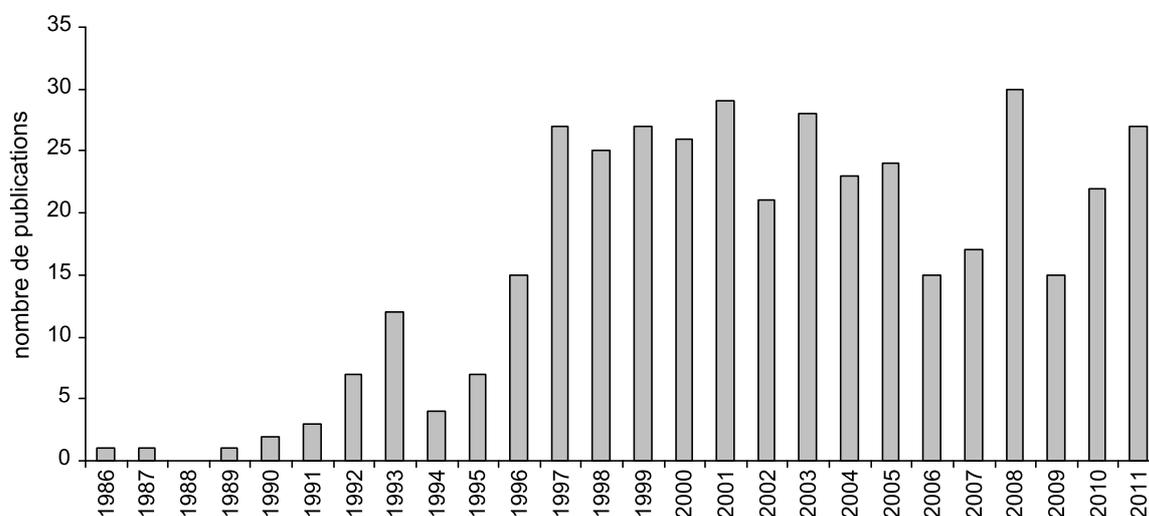


FIGURE 1.4 – Nombre de publications contenant dans le titre, le résumé ou bien les mots clés les termes « asymétrie fluctuante (fluctuating asymmetry) » et « stress (stress*) », en fonction du temps

Les mammifères et les oiseaux ont été exclus. Les travaux antérieurs à l'année 1986 ne sont pas rapportés en raison de l'utilisation du terme stabilité de développement dans ces publications et non du terme asymétrie fluctuante. Analyse de la base de données Web of Science.

Toutefois, plusieurs travaux soulignent, le fait que **sur un même organisme si certains traits réagissent, d'autres non** (Bonada et Williams, 2002 ; Servia *et al.*, 2004). Vrijenhoek

(1985), repris plus tard par Hardersen et Frampton (1999), explique ce résultat par l'existence de **fenêtres d'opportunité** au cours du développement. Une perturbation environnementale, lorsque ces **fenêtres d'opportunité** seraient ouvertes, conduirait à l'apparition d'un phénotype aberrant. Ainsi, si ces fenêtres d'opportunité varient dans le temps pour les différents caractères, les réponses observées ne seraient pas corrélées.

Toutefois, dans les expériences menées en laboratoire, le stress appliqué est constant au cours du développement de l'organisme. Ainsi, pour Clarke (1998), malgré l'existence de fenêtres d'opportunité variant dans le temps, les réponses des traits observés pourraient être corrélées. La différence de réponse serait davantage à mettre en relation avec l'existence de **caractères plus robustes** que d'autres, en raison de leur importance dans les processus de viabilité et d'adaptation de l'espèce (Mather, 1953 ; Beardmore, 1960 ; Clarke, 1998). Ainsi, les yeux de la drosophile posséderaient une **valeur adaptative** supérieure à celle des soies, ce qui expliquerait le faible niveau d'AF observé sur ce caractère par comparaison à celui affectant les soies (Beardmore, 1960).

La **polémique autour des AF** est lancée à la fin des années 1990, suite à quelques publications présentant des incohérences ou bien des résultats qualifiés de faux positifs⁷, et ce en raison selon Palmer et Strobeck (2003), d'une sous-évaluation de l'erreur de mesure. De plus, le biais de publication consistant à ne publier que les résultats positifs ou bien confirmant les hypothèses de départ, participerait à la sur-évaluation du lien entre AF et stress environnemental (Palmer, 2000). A l'heure actuelle, il n'existe pas de réel consensus sur cette question du fait, comme le souligne van Dongen (2006), du manque de connaissances sur le sujet.

Dans le milieu naturel (tableau 1.11), **une augmentation significative du niveau d'AF a été observée en réponse à des pollutions métalliques** (Groenendijk *et al.*, 1998 ; Bonada *et al.*, 2005 ; Al-Shami *et al.*, 2011b) et **agricoles** (Clarke, 1993a ; Al-Shami *et al.*, 2011b). En revanche, dans des stations contaminées par les PCB, aucune augmentation n'a pu être notée chez *Hexagenia rigida* (Dobrin et Corkum, 1999). Voets *et al.* (2006) n'ont également pas remarqué de variation du niveau d'AF chez l'espèce *Dreissena polymorpha* prélevée dans un milieu pollué en métaux lourds. De même, une augmentation de salinité n'a pas pu être corrélée à une augmentation d'AF chez *Hydropsyche contubernalis* et *Calopteryx splendens* (Piscart *et al.*, 2006).

7. Se dit d'un résultat considéré, à tort, comme positif.

TABLEAU 1.11: Effet de la pollution en milieu naturel sur le niveau d'AF chez les macro-invertébrés benthiques

référence bibliographique	taxon	trait	localisation	type de pollution	résultats
Clarke (1993a)	<i>Chironomus salinarius</i> (Diptère, Chironomidae)	pecten	bassins aval usine fertilisants, Ukraine	intrants	+
Groenendijk <i>et al.</i> (1998)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptère, Chironomidae)	pecten	rivière Dommel, Belgique	métaux lourds	+
Drover <i>et al.</i> (1999)	<i>Rheumatobates rileyi</i> (Hemiptère, Gerridae)	pattes	33 lacs, Canada	aluminium / pH	+ / -
Dobrin et Corkum (1999)	<i>Hexagenia rigida</i> (Ephéméroptère, Ephemeridae)	ailles, pattes, forceps	6 stations lac Erie, Canada	PCB	0
Bonada et Williams (2002)	<i>Hydropsyche morosa</i> (Trichoptère, Hydropsychidae)	pattes, mesonotum, griffes, soies	5 rivières Ontario, Canada	anthropique	+ et 0(dépend du trait)
Servia <i>et al.</i> (2004)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptère, Chironomidae)	mentum, antennes, pecten	rivières Galice, Espagne	urbaine + industrielle	+ (antennes), 0 (pecten, mentum)
Bonada <i>et al.</i> (2005)	<i>Hydropsyche exocellata</i> (Trichoptère, Hydropsychidae)	pattes, mandibules	rivière Llobregat, Espagne	sels + métaux lourds / organique + industrielle	+ et 0 (dépend du trait)
Voets <i>et al.</i> (2006)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Bivalve, Dreissenidae)	coquille	6 stations (canaux et bassins), Belgique	métaux lourds + organique	0
Piscart <i>et al.</i> (2006)	<i>Hydropsyche exocellata</i> et <i>Hydropsyche contubernalis</i> (Trichoptère, Hydropsychidae)	pattes, pygopodes	rivière Meurthe, France	salinité	0
Piscart <i>et al.</i> (2006)	<i>Calopteryx splendens</i> (Odonate, Calopterydidaedae)	pattes	rivière Meurthe, France	salinité	0

référence bibliographique	taxon	trait	localisation	type de pollution	résultats
Al-Shami <i>et al.</i> (2011b)	<i>Chironomus</i> spp. (Diptère, Chironomidae)	mentum, antennes	rivière bassin Juru, Malaisie	pesticides + intrants + métaux lourds	+

+ : niveau supérieur dans le site pollué par rapport au site de référence.

0 : pas de différence significative entre le site de référence et le site pollué.

- : niveau inférieur dans le site pollué par rapport au site de référence.

1.4 Les variations de forme en laboratoire

Afin d'expliquer les résultats observés dans le milieu naturel, des essais en laboratoire ont été menés. Cette approche a pour objectif non seulement de discriminer les substances impliquées dans les variations phénotypiques, mais également de déterminer les concentrations à partir desquelles l'ontogénie est affectée.

Dans la littérature, quatre types de réponses ont pu être relevées (figure 1.5) :

- une augmentation des variations phénotypiques (phénodéviations ou AF) avec l'augmentation des concentrations d'exposition (a) ;
- une diminution des variations phénotypiques avec l'augmentation des concentrations d'exposition (b) ;
- une augmentation suivie d'une diminution des variations phénotypiques avec l'augmentation des concentrations d'exposition (c) ;
- et enfin, une absence de variations avec l'augmentation des concentrations d'exposition (d).

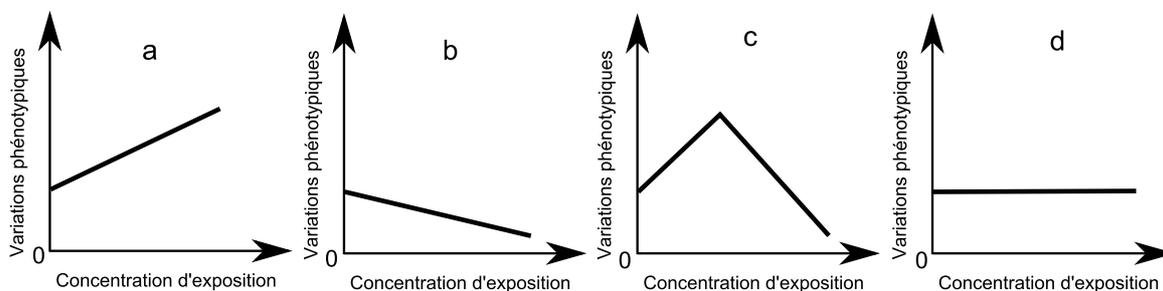


FIGURE 1.5 – Type de réponse phénotypique observée sur un trait en fonction de la concentration en toxique dans le milieu

1.4.1 Les phénodéviations

Une revue de la littérature sur les essais menés en conditions contrôlées (tableau 1.12) met en évidence une **forte variabilité des résultats**. Cette variabilité est liée, non seulement à l'espèce étudiée, au polluant testé, aux gammes de concentrations retenues, au trait mesuré mais également à la phase étudiée (solide ou liquide). En effet, la biodisponibilité d'un contaminant est largement dépendante de sa répartition entre phase liquide et phase solide. De plus, elle est généralement plus importante dans des sédiments dopés de laboratoire que dans des sédiments provenant du milieu naturel (Harrahy et William, 1997).

Les **deux principales espèces** de chironomes utilisées dans les tests écotoxicologiques en laboratoire sont *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans* (tableau 1.12). Ces espèces sont particulièrement faciles à élever en captivité (Anderson, 1980). Il existe peu de différences de sensibilité aux toxiques entre ces deux espèces (Watts et Pascoe, 2000 ; Leppänen *et al.*, 2006). Néanmoins, il est à noter que Watts et Pascoe (2000) observent une sensibilité légèrement supérieure au lindane chez *Chironomus tentans*.

En laboratoire, Martinez *et al.* (2003) ont mis en évidence un effet non linéaire du cuivre, un **métal essentiel**, sur le mentum de la larve de *Chironomus tentans*. Kosalwat et Knight (1987) observent, quant à eux, chez la larve de *Chironomus decorus*, une relation positive linéaire entre

le taux de phénodéviations du pecten et les concentrations sédimentaires en cuivre. Selon Martinez *et al.* (2001), le zinc, un autre métal essentiel, entraîne l'apparition de phénodéviations du mentum chez *Chironomus tentans* à partir de concentrations d'exposition de 1442 mg/kg de MS.

Concernant les **métaux non essentiels**, il a été noté un effet non linéaire du cadmium sur les **phénodéviations du mentum** de *Chironomus tentans* (Martinez *et al.*, 2003). Il existe, en outre, chez cette même espèce une relation dose-réponse entre les phénodéviations du mentum et la présence d'arsenic dans le sédiment (Martinez *et al.*, 2006). Alors que Martinez *et al.* (2001) notent un effet du plomb sur les anomalies du mentum de *Chironomus tentans*, Vermeulen *et al.* (2000) et Bird *et al.* (1995) ne relèvent, en revanche, pas d'effet significatif chez *Chironomus riparius* et *Chironomus tentans* respectivement. En outre, Vermeulen *et al.* (2000) ne remarquent pas d'effet du mercure sur la forme du mentum de *Chironomus riparius*. Ils observent, toutefois, une augmentation des anomalies morphologiques du pecten en présence de de plomb ou de mercure. Langer-Jaesrich *et al.* (2010) n'ont pas réussi à établir une corrélation entre phénodéviations du mentum et présence de nickel chez *Chironomus riparius*. Par ailleurs, sur cette même espèce, Dias *et al.* (2008) ont mis en évidence une relation inverse : plus la quantité d'uranium augmente dans la phase sédimentaire, moins les chironomes présentent de phénodéviations.

Les essais menés sur les **insecticides** (tableau 1.13) démontrent une **absence d'effets** significatifs en présence de chlorpyrifos, de thiacloprid, d'imidacloprid chez *Chironomus riparius* (Langer-Jaesrich *et al.*, 2010) et de DDE (uniquement sur les antennes) chez *Chironomus tentans* (Hamilton et Saether, 1971). De même, chez *Chironomus* sp. aucun effet n'a été relevé en présence d'un herbicide, le dacthal[®] (Madden *et al.*, 1992).

Il a été observé une **diminution du taux de phénodéviations** du mentum en présence de DDE chez *Chironomus tentans* (Warwick, 1985). Au contraire, une augmentation du taux de phénodéviations du mentum a été notée en présence des insecticides DDT (Madden *et al.*, 1992) et tebufénozide (Kwak et Lee, 2005) chez *Chironomus tentans* et *Chironomus plumosus* respectivement. En outre, si Langer-Jaesrich *et al.* (2010) n'observent **pas d'effet significatif d'insecticides testés indépendamment**, ils constatent une augmentation des anomalies du mentum chez *Chironomus riparius* exposé à un mélange imidacloprid et thiacloprid.

En ce qui concerne les substances identifiées comme perturbateur endocrinien (tableau 1.13), si Vermeulen *et al.* (2000) observent chez *Chironomus riparius* en présence de β -sitosterol un effet significatif sur le pecten, ils ne relèvent aucun effet sur le mentum. De façon surprenante, alors que Meregalli et Ollevier (2001) n'observent pas d'effet significatif du 17α -ethynylestradiol sur le mentum, le pecten et les mandibules de *Chironomus riparius*, pour des concentrations variant entre 0 et 100 $\mu\text{g/l}$, Watts *et al.* (2003) remarquent chez cette même espèce et pour une gamme de concentrations similaire, une augmentation des phénodéviations suivie d'une diminution à fortes concentrations. Watts *et al.* (2003) et Park et Kwak (2008) relèvent également ce type de variations chez *Chironomus riparius* en présence de bisphenol-A et de DEHP. Le 4-n-nonylphenol, un produit de dégradation de surfactants, ainsi que le fenbendazole, un antibiotique à usage vétérinaire, participent également à une augmentation significative du niveau de phénodéviations du mentum de chez *Chironomus riparius* (Meregalli *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2009).

TABLEAU 1.12 – Effet des éléments traces métalliques en laboratoire sur la phénodéviatation des larves appartenant au genre *Chironomus*

référence bibliographique	espèce	matrice	trait	toxique	Gamme de concentrations	résultats
Kosalwat et Knight (1987)	<i>Chironomus decorus</i>	sédiment	pecten	Cu	0-2643 mg/kg	+
Martinez <i>et al.</i> (2003)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	Cu	0-215 mg/kg	+ puis -
Martinez <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	Zn	16-5562 mg/kg	+ puis -
Bird <i>et al.</i> (1995)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	Pb	0-35000 mg/kg	0
Martinez <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	Pb	4-5252 mg/kg	+
Janssens de Bisthoven <i>et al.</i> (1998c)	<i>Chironomus riparius</i>	sédiment et eau	mentum, mandibules	Pb	0,8-136,1 mg/kg et 0,5-32,0 µg/l	+
Vermeulen <i>et al.</i> (2000)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, pecten	Pb	0-100 mg/l	0(mentum), + (pecten)
Vermeulen <i>et al.</i> (2000)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, pecten	Hg	0-500 µg/l	0(mentum), + (pecten)
Martinez <i>et al.</i> (2003)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	Cd	0-61 mg/kg	+ puis -
Martinez <i>et al.</i> (2006)	<i>Chironomus tentans</i>	sédiment	mentum	As	0-260 mg/kg	+
Langer-Jaesrich <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules	Ni	0-200 µg/l	0
Dias <i>et al.</i> (2008)	<i>Chironomus riparius</i>	sédiment	mentum	U	0-24 mg/kg	-

+ : augmentation significative de la fréquence de phénodéviants.

- : diminution significative de la fréquence de phénodéviants.

0 : pas de variation significative de la fréquence de phénodéviants.

TABLEAU 1.13: Effet des polluants organiques en laboratoire sur la phénodéviatation des larves appartenant au genre *Chironomus*

référence bibliographique	espèce	matrice	trait	toxique	gamme de concentrations	résultats
Hamilton et Saether (1971)	<i>Chironomus tentans</i>	eau	mentum	DDE	0-20 µg/l	0
Warwick (1985)	<i>Chironomus tentans</i>	eau	antennes	DDE	0-20 µg/l	-
Madden <i>et al.</i> (1992)	<i>Chironomus</i> sp.	eau	mentum, antennes	DDT	0-10 µg/l	+
Madden <i>et al.</i> (1992)	<i>Chironomus</i> sp.	eau	mentum, antennes	dacthal®	0-10 µg/l	0
Langer-Jaesrich <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules	chlorpyrifos	0-10 µg/l	0
Langer-Jaesrich <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules	thiacloprid	0-10 µg/l	0
Langer-Jaesrich <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules	imidacloprid	0-10 µg/l	0
Kwak et Lee (2005)	<i>Chironomus plumosus</i>	eau	mentum	tebufenozid	0-30 µg/l	+
Vermeulen <i>et al.</i> (2000)	<i>Chironomus riparius</i>	sédiment	mentum, pecten	β-sitosterol	0-500 µg/kg	0(mentum), + (pecten)
Meregalli et Ollevier (2001)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules, pecten	17α-ethynylestradiol	0-100 µg/l	0
Watts <i>et al.</i> (2003)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules, pecten	17α-ethynylestradiol	0-1 mg/l	+ puis - (mentum et mandibules), 0 (pecten)
Watts <i>et al.</i> (2003)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, mandibules, pecten	bisphenol-A	0-1 mg/l	+ puis - (mentum et mandibules), 0 (pecten)
Meregalli <i>et al.</i> (2001)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum, pecten, mandibules	4-n-nonylphenol	0-100 µg/l	+ (mentum), 0 (pecten et mandibules)

référence bibliographique	espèce	matrice	trait	toxique	gamme de concentrations	résultats
Park et Kwak (2008)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum	DEHP	0-30 µg/l	+ puis -
Park <i>et al.</i> (2009)	<i>Chironomus riparius</i>	eau	mentum	fenbendazole	0-30 µg/l	+

+ : augmentation significative de la fréquence de phénodéviants.

- : diminution significative de la fréquence de phénodéviants.

0 : pas de variation significative de la fréquence de phénodéviants.

L'augmentation du taux de phénotypiques suivi d'une diminution (Watts *et al.*, 2003 ; Dias *et al.*, 2008) serait selon Watts *et al.* (2003) caractéristique de l'effet de perturbateurs endocriniens. Selon Warwick (1985), Polak *et al.* (2002) et Dias *et al.* (2008) ce type de variation ainsi que la diminution d'anomalies morphologiques en présence de toxiques seraient davantage expliqués par **l'hypothèse de la mortalité différenciée**. Dans les gammes de concentrations sub-létales, l'effet tératogène d'un toxique pourrait être exprimé par une augmentation des phénotypiques, tandis que, dans le cas d'un stress plus important, les larves présentant les variations phénotypiques les plus fortes pourraient disparaître en premier, laissant aux larves présentant une stabilité de développement élevée, un avantage sélectif.

De nombreux travaux rapportent une diminution du taux de phénotypiques chez des populations appartenant au genre *Chironomus* provenant de sites contaminés en métaux lourds et/ou en polluants organiques et dont la génération F1 est maintenue en laboratoire sur sédiment propre (Franck, 1983 ; Dickman *et al.*, 1992 ; Groenendijk *et al.*, 1998). Ces auteurs concluent alors que **la majorité des phénotypiques observées dans le milieu naturel possède une origine environnementale** et non génétique. Toutefois, en laboratoire, Martinez *et al.* (2003) montrent chez *Chironomus riparius* exposé à du cuivre, que la fréquence de phénotypiques est similaire entre le groupe parent et la génération F1 élevée sur sédiment propre. Ils émettent alors l'hypothèse d'un effet mutagène du cuivre chez cette espèce.

En résumé, sur la totalité des travaux en laboratoire relevés portant sur l'induction de phénotypiques chez le genre *Chironomus* en réponse à une exposition toxique (minérale ou organique) :

- 30 % font état d'absence de réponse ;
- 26 % constatent une augmentation du nombre de phénotypiques en présence de toxiques ;
- 22 % observent une réponse variable en fonction de la nature du trait observé ;
- 15 % remarquent une augmentation du nombre de phénotypiques suivi d'une diminution si l'on augmente les concentrations d'exposition ;
- 7 % mettent en évidence une diminution du nombre de phénotypiques en présence de toxiques.

1.4.2 Les asymétries fluctuantes

En laboratoire (tableau 1.14), en réponse à la présence d'insecticides, une augmentation du niveau d'AF est observée chez des larves d'odonates uniquement sur certains traits (Chang *et al.*, 007a,b). Campero *et al.* (2008) n'observent pas d'augmentation du niveau d'AF sur la larve de *Coenagrion puella* en réponse à un stress alimentaire ou bien à un stress toxique à l'endosulfan. Toutefois, en présence de ces deux stress combinés, le niveau d'AF augmente de façon significative. Ainsi, comme l'ont évoqué Langer-Jaesrich *et al.* (2010) au sujet des phénotypiques, **les AF répondraient davantage à un stress multiple**. Par ailleurs, en présence d'azaarene, un hydrocarbure aromatique polycyclique, aucune augmentation du niveau d'AF du mentum n'est observée chez la larve de *Chironomus riparius* (Bleeker *et al.*, 1999).

Sur les ailes de trois insectes adultes provenant de larves exposées à des pesticides (tableau 1.14), Hoffmann *et al.* (2005) n'observent aucune augmentation du niveau d'AF. De même, aucune variation n'est relevée chez des adultes d'*Haematobia irritans* dont les larves ont été exposées au diflubenzuron (da Silva *et al.*, 2004). Hardersen et Frampton (1999) observent une augmentation d'AF uniquement sur certains traits mesurés sur l'aile de *Xanthocnemis zealandica* provenant de larves exposées au carbaryl. De plus, si Mpho *et al.* (2001) n'observent pas de réponse chez les femelles de *Culex quinquefasciatus* exposées à du temephos, ils notent, en revanche, une augmentation des AF chez les mâles.

TABLEAU 1.14 – Effet d'un stress toxique sur le niveau d'AF chez les insectes exposés en laboratoire

référence bibliographique	espèce	matrice	trait	toxique	gamme de concentrations	résultats	
Hardersen et Frampton (1999)	<i>Xanthocnemis zealandica</i> (Odonate, Coenagrionidae)	adulte	eau	ailes	carbaryl	0 et 100 µg/l	+ et 0 (dépend du trait)
Chang <i>et al.</i> (007a)	<i>Copera annulata</i> (Odonate, Plactycnemididae)	larve	eau	pattes, antennes, fourreaux alaires	imidacloprid	0-180.10 ⁻⁹ mg/l	+ et 0 (dépend du trait)
Chang <i>et al.</i> (007b)	<i>Ceriagrion</i> sp. (Odonate, Coenagrionidae)	larve	eau	pattes, prementum	monosultap	0-150.10 ⁻⁹ mg/l	+ et 0 (dépend du trait)
Campero <i>et al.</i> (2008)	<i>Coenagrion puella</i> (Odonate, Coenagrionidae)	larve et adulte	eau	pattes et ailes	endosulfan	0-31,7 ppb	0
Bleeker <i>et al.</i> (1999)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptère, Chironomidae)	larve	eau	mentum	azaarene	0-3,2 µM	0
Dias (2010)	<i>Chironomus riparius</i> (Diptère, Chironomidae)	adulte	sédiment	pattes et ailes	uranium	0-128 µg/g	0 (pattes), + (ailes)
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Chironomus tepperi</i> (Diptère, Chironomidae)	adulte	eau	ailes	pyrethroid	0-2,8 ppb	0
da Silva <i>et al.</i> (2004)	<i>Haematobia irritans</i> (Diptère, Muscidae)	adulte	eau	pattes, ailes	diflubenzuron	0-30 ppb	0
Mpho <i>et al.</i> (2001)	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptère, Culicidae)	adulte	eau	ailes	temephos	0-3,2.10 ⁻⁴ mg/l	+ (mâle), 0 (femelle)
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Lucilia cuprina</i> (Diptère, Calliphoridae)	adulte	eau	ailes	dieldrin	0-0.0005 % (m/v)	0
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Epiphyas postvittana</i> (Lépidoptère, Tortricidae)	adulte	eau	ailes	esfenvelerate + methyl-parathion	0-0.00054 + 0-0.000065 % (v/v)	0
Hoffmann <i>et al.</i> (2002)	<i>Helicoverpa punctigera</i> (Lépidoptère, Noctuidae)	adulte	eau	ailes	esfenvelerate	0 et 0,54 ml/l	0

+ : augmentation significative du niveau d'AF.

0 : pas de variation significative du niveau d'AF.

En ce qui concerne le lien entre niveau d'AF chez la larve et niveau d'AF chez l'adulte, Campero *et al.* (2008) constatent que l'augmentation du niveau d'AF, en réponse à un stress alimentaire combiné à un stress toxique, décelable sur des larves d'odonates, disparaît après la métamorphose des organismes. En effet, la métamorphose entraîne une augmentation du niveau d'AF chez le groupe témoin et chez le groupe stressé, ce qui suggère une augmentation du stress au cours de cette étape (Heyland et Moroz, 2006). Cependant, ce niveau atteint une même valeur dans ces deux groupes, ce qui empêche, par conséquent, de distinguer le groupe stressé au cours du stade larvaire du groupe témoin. Par conséquent, la mise en évidence d'un stress toxique *via* l'analyse des AF semble largement **dépendante du stade observé**. Piscart *et al.* (2005) observent, quant à eux, que le niveau d'AF reste constant entre le dernier stade larvaire et le stade adulte dans une population de trichoptères prélevés dans un site soumis à des rejets de soudières.

Afin d'évaluer la transmission des AF, Groenendijk *et al.* (1998) ont étudié les AF de la génération F1 affectant des larves de *Chironomus riparius* élevées sur sédiment propre et provenant de parents prélevés dans une station contaminée en métaux lourds et présentant un niveau élevé d'AF. Par rapport au groupe parent, ils n'observent aucune diminution du niveau d'AF chez la génération F1. Pour expliquer ce résultat, ils émettent l'hypothèse d'une origine génétique des AF observées. Cette pression génétique serait liée au croisement (hybridation), dans le milieu naturel, d'une souche adaptée à la pollution métallique avec une souche non adaptée provenant des zones amonts de la rivière.

Sur la totalité des travaux en laboratoire relevés portant sur les AF affectant les macro-invertébrés aquatiques en réponse à une exposition toxique (minérale ou organique) :

- 62 % font état d'absence de réponse ;
- 31 % observent une réponse variable en fonction du trait observé ;
- 8 % mettent en évidence une réponse qui dépend du sexe considéré.

En résumé, il ressort que le niveau d'AF mesuré est largement dépendant de l'espèce étudiée, pour une même espèce, du trait mesuré, du stade observé (larve ou imago), du toxique analysé, du sexe considéré et enfin de l'interaction entre ces différents facteurs.

1.4.3 La variation de la forme moyenne

L'étude de la **variation de la forme moyenne** entre groupe témoin et groupe stressé peut également renseigner sur un stress environnemental (Klingenberg *et al.*, 2001 ; Hoffmann *et al.*, 2002). En effet, le développement d'un organisme nécessite l'intervention de nombreux gènes. Une perturbation, même mineure, au cours de cette étape peut se traduire par la production de phénotypes différents (Emlen et Nijhout, 2000).

Les travaux relevés dans la littérature, traitant de la relation entre un stress toxique et la variation de la forme moyenne chez les insectes, portent uniquement sur **les ailes**. Si Hoffmann *et al.* (2005) ne parviennent pas à mettre en évidence une différence du degré d'asymétrie entre une population témoin et une population exposée à un **pesticide**, soulignent l'existence de variations significatives de la forme moyenne entre ces deux groupes (tableau 1.15). En outre, Klingenberg *et al.* (2001) observent une variation de la forme moyenne des ailes chez un groupe d'hyménoptères élevé dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

TABLEAU 1.15 – Effet d'un stress toxique en laboratoire sur la forme moyenne des ailes chez les insectes

référence bibliographique	espèce	stade exposé	matrice	trait	toxique	gamme de concentrations	résultats
Klingenberg <i>et al.</i> (2001)	<i>Bombus empatiens</i> (Hyménoptère, Apidae)	larve	air	ailes	CO ₂	<0,05-10 %	+
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Chironomus tepperi</i> (Diptère, Chironomidae)	larve	eau	ailes	pyrethroid	0-2,8 ppb	+
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Lucilia cuprina</i> (Diptère, Calliphoridae)	larve	eau	ailes	dieldrin	0-0.0005 % (m/v)	+
Hoffmann <i>et al.</i> (2005)	<i>Epiphyas postvittana</i> (Lépidoptère, Tortricidae)	larve	eau	ailes	esfenvelerate + methyl-parathion	0-0.00054 + 0-0.000065 % (v/v)	+
Hoffmann <i>et al.</i> (2002)	<i>Helicoverpa punctigera</i> (Lépidoptère, Noctuidae)	larve	eau	ailes	esfenvelerate	0 et 0,54 ml/l	+

+ : variation significative de la forme.

0 : pas de variation significative.

En résumé, afin de mettre en évidence, chez les macro-invertébrés aquatiques, une exposition sub-létale à un toxique, de nombreux biomarqueurs, moléculaires, cellulaires, physiologiques ou bien ontogéniques ont été étudiés. La mesure des altérations du système de défense anti-oxydant constitue l'un d'eux. En présence d'un toxique, l'activation des mécanismes de défense peut, en outre, se traduire par une consommation énergétique accrue. Par conséquent, la mesure des réserves énergétiques a également fait l'objet de nombreux travaux de recherche en écotoxicologie. Lorsque les systèmes de lutte mis en place par l'organisme ne permettent plus de contenir les effets délétères des molécules toxiques, des dommages physiologiques et ontogéniques peuvent alors apparaître. C'est ainsi que des retards de croissance et des réductions de la fécondité ont été associés à l'introduction de toxiques. De même, des variations morphologiques ont été observées chez des organismes provenant de milieux pollués en métaux lourds et/ou en substances organiques. Ces variations de forme consistent en des phénotypiques, c'est à dire des déviations sévères par rapport au phénotype moyen de l'espèce, et des asymétries fluctuantes, c'est à dire des déviations mineures par rapport à la symétrie de l'organisme. En laboratoire, afin de déterminer les molécules impliquées dans ces altérations morphologiques, des essais ont été menés selon une approche par substance. Les résultats sont peu concluants ; de nombreux travaux rapportent ainsi l'absence de réponse claire.

Chapitre 2

Organisme et toxiques étudiés

2.1 L'organisme modèle retenu : *Chironomus riparius*

Ce travail a porté sur un diptère non piqueur, le chironome, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il constitue un maillon essentiel des chaînes trophiques : il représente, en effet, une nourriture importante pour les poissons (Gilinsky, 1984) ainsi que pour les oiseaux (Sherfy *et al.*, 2000). En outre, il est ubiquiste, c'est à dire qu'on le trouve aussi bien dans des environnements préservés que dans des milieux dégradés. Cette caractéristique est nécessaire pour la mise en place d'un indicateur de toxicité dans le milieu naturel. Il présente, de plus, quatre avantages pour des essais en laboratoire (Anderson, 1980) : son cycle de vie est maîtrisé, son cycle de vie est court, la quantité d'œufs pondus par femelle est importante et il possède des appendices buccaux facilement observables. L'espèce retenue est *Chironomus riparius*. Son stade larvaire se déroule dans la zone hyporhéique, au contact du sédiment et de l'eau interstitielle. Cette espèce constitue ainsi un bon modèle pour évaluer la toxicité de ce compartiment. En outre, à ce jour, de nombreux travaux ont porté sur *Chironomus riparius* (Rossaro *et al.*, 1986 ; Meregalli *et al.*, 2001 ; Park et Kwak, 2008 ; Langer-Jaesrich *et al.*, 2010), permettant ainsi une comparaison avec les résultats obtenues au cours des études antérieures.

2.1.1 Classification

Les Chironomidae sont une famille d'insectes appartenant à l'ordre des Diptera. Au sein de la région holartique, ils sont divisés en huit sous-familles (Wiederholm, 1983) : les Tanypodinae, les Chironominae, les Orthocladinae, les Diamesinae, les Podonominae, les Diamesinae, les Buchonomyiinae et les Telmatogetoninae. L'organisme que nous avons étudié appartient à la sous famille des Chironominae, à la tribu des Chironomini, au genre *Chironomus* et à l'espèce *riparius*.

2.1.2 Cycle de vie

Les Chironominae sont des insectes holométaboles. Ils présentent un cycle larvaire aquatique qui peut durer de plusieurs jours à plusieurs mois, en fonction entre autres de la température de l'eau et de la quantité de nourriture disponible (Péry, 2006) et un cycle adulte aérien de quelques jours, qui permet la dissémination de l'espèce (figure 2.1). Le stade nymphal assure le passage du stade larvaire au stade adulte. L'imago (adulte) s'extrait de l'enveloppe nymphale, appelée exuvie. Le mâle émerge avant la femelle ; phénomène qui a été largement observé chez les insectes (Wiklund, 1977). Après fécondation, la femelle dépose une ponte à la surface de l'eau. Cette ponte contient entre 265 et 722 œufs qui éclosent après quelques jours (Strenzke,

1959). Le cycle larvaire se décompose en quatre stades. La larve croit par mues successives. La largeur de la capsule céphalique permet de déterminer le stade larvaire auquel appartient l'organisme (Watts et Pascoe, 2000). A partir du 3^{ème} stade, le chironome acquiert de l'hémoglobine qui assure le transport de l'oxygène et lui confère une couleur rouge. C'est l'un des rares insectes à posséder cette protéine qui lui permet de vivre dans des environnements pauvres en oxygène.

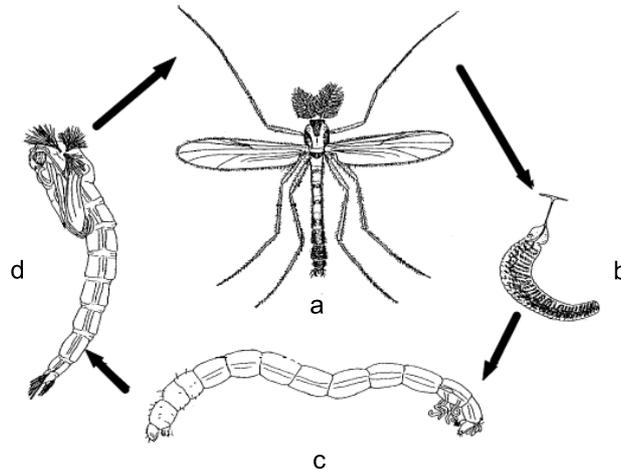


FIGURE 2.1 – Cycle de vie du chironome
(a) imago ,(b) ponte ,(c) larve ,(d) nymphe, d'après Bonnet (2000).

La larve de *Chironomus riparius* construit des tubes composés de grain de sable dans lesquels elle vit. Elle se nourrit de fines particules à la surface du sédiment (Moller Pillot, 2009). Cette espèce est particulièrement abondante dans les sites riches en matière organique (Moller Pillot, 2009).

2.1.3 Anatomie

Les adultes (figure 2.2) possèdent des ailes glabres (Goetghebuer, 1928) présentant trois nervures longitudinales, une nervure discoïdale, deux nervures posticales ainsi que deux nervures anales n'atteignant pas le bord de l'aile. Il existe un dimorphisme chez l'adulte : la femelle est plus grande que le mâle. De plus, à la différence des femelles, le mâle possède des antennes plumeuses et une pince à l'extrémité de son abdomen (figure 2.2).

La larve est de type vermiforme (figure 2.1). Elle peut mesurer jusqu'à 3 cm. Elle possède une tête individualisée et totalement sclérifiée (figure 2.3). Le thorax est composé de trois segments, le premier porte une paire de pseudopodes. L'abdomen présente neuf segments, le dernier porte ventralement une paire de pseudopodes et dorsalement une paire de tubercules sétigères. En outre, chez le genre *Chironomus*, on observe quatre tubules ventrales, organes impliqués dans la respiration, sur le dernier segment.



FIGURE 2.2 – Chironomes adultes et détails de l'aile

(a) Chironome adulte : à gauche mâle, à droite femelle et (b) détails de l'aile : R₁, 1^{ère} nervure longitudinale; R₂₊₃, 2^{ème} nervure longitudinale, R₄₊₅, 4^{ème} nervure longitudinale; M : nervure discoïdale; Cu₁, rameau antérieur de la posticale; Cu₂, rameau postérieur de la posticale; an, deux nervure anales; rm, nervure transversale, d'après Goetghebuer (1928)

La capsule céphalique de *Chironomus riparius* porte des plaques paralabiales striées (figure 2.3). Les mandibules présentent une dent apicale noire et trois dents internes. Le mentum comporte trois dents médianes, deux dents latérales ainsi que quatre dents externes. Les antennes possèdent cinq segments et un organe arrondi situé sur la première moitié du segment basal. Le pecten epipharynge présente entre 15 et 30 dents. Des variations de forme, parfois sévères, de ces appareils buccaux ont été constatées dans des environnements pollués (Wiederholm, 1984 ; Dickman *et al.*, 1992).

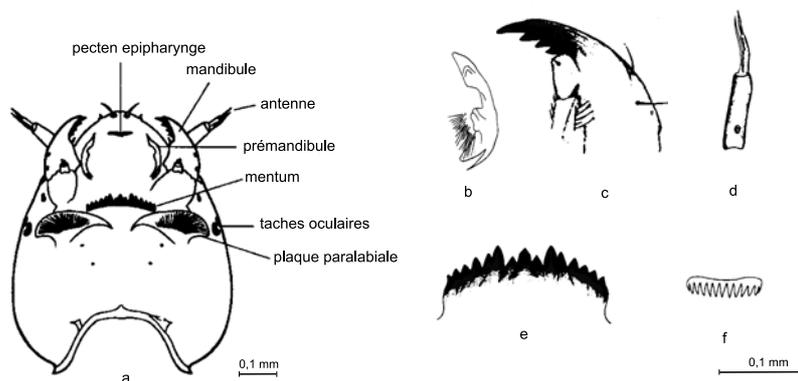


FIGURE 2.3 – Vue ventrale de la capsule céphalique du chironome et détails des pièces buccales (a) capsule céphalique, (b) prémandibule, (c) mandibule, (d) antenne, (e) mentum, (f) pecten epipharynge d'après Vermeulen (1995) et Epler (2001)

2.2 Les toxiques étudiés

2.2.1 Le plomb dans l'environnement

Les émissions de plomb sont principalement liées aux **activités anthropiques**. Les activités émettrices principales sont : l'extraction et le traitement de minerais (Axtmann et Luoma, 1991) et les filières industrielles (Loska et Wiechula, 2003) telles que la métallurgie et la sidérurgie. Dans les centre villes anciens, le ruissellement des eaux pluviales sur les toitures et les chaussées constitue également une source importante (Gromaire *et al.*, 1999). Il est à noter que depuis l'interdiction de l'utilisation de l'essence plombée en France à la fin des années 1990, les rejets

des véhicules à moteur sont faibles (Thomas, 1995).

TABLEAU 2.1 – Concentrations de plomb détectées dans l’environnement

	type de bassins versants	n ¹	concentrations sédiments (mg/kg MS)	n ¹	concentrations eau (µg/l)
AESN (2008)	agricole, urbain et industriel	442	<5-534,3	4785	0,2-23,8
Jain (2004)	urbain, industriel	10	40-75	nd	nd
Loska et Wiechula (2003)	industriel	364	11,0-315,0	nd	nd
Ramos <i>et al.</i> (1999)	agricole, urbain et industriel	7	4,84-56,9	nd	nd
Axtmann et Luoma (1991)	minier	4	129-157	nd	nd

1 : nombre de stations échantillonnées.

nd : non déterminé.

Dans les environnements peu pollués, les concentrations en plomb n’excèdent pas la centaine de milligrammes par kilogramme (tableau 2.1) (Ramos *et al.*, 1999). En revanche, ces concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de milligrammes par kilogramme dans des sédiments provenant de bassins versants industriels (Loska et Wiechula, 2003) et miniers (Axtmann et Luoma, 1991). Les données 2008 de l’AESN laissent apparaître des concentrations variant entre 5,1 et 534,3 mg/kg de MS dans la phase sédimentaire et entre 0,2 et 23,8 µg/l dans la phase aqueuse.

2.2.2 Toxicité du plomb sur le chironome

La larve du chironome est capable d’accumuler d’importantes quantités de plomb, un métal non essentiel, ce qui lui permet de vivre dans des environnements très contaminés. Ainsi, le pourcentage de survie n’est pas affecté chez *Chironomus tentans* ayant crû pendant 14 jours dans un sédiment contenant 5000 mg/kg de MS de plomb (Bird *et al.*, 1995), ou bien chez *Chironomus* sp. exposés pendant 4 jours à une eau chargée à 10 mg/l de plomb (Lagrana *et al.*, 2010). Elle peut, en outre, accumuler jusqu’à 19000 mg/kg de MS de plomb dans son corps (Lagrana *et al.*, 2010).

Le chironome est incapable de réguler l’absorption du plomb (Krantzberg et Stockes, 1989). Dans la littérature, le facteur de bioaccumulation¹ varie entre 0,3 (Martinez *et al.*, 2001) et 0,5 (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998c) dans les expériences portant sur substrats artificiels et entre 0,1 et 1 (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1992 ; Bervoets *et al.*, 1996a ; Martinez *et al.*, 2002) sur celles portant sur sédiments naturels. Ce facteur dépend largement de la biodisponibilité du plomb, elle même largement corrélée aux caractéristiques physico-chimiques du sédiment telles que la teneur en matière organique, la teneur en argile, la granulométrie et le pH. Chez *Chironomus riparius*, le facteur de bioconcentration² du plomb, s’élève selon Timmermans *et al.* (1992) à 3670.

1. Rapport entre la concentration larvaire à l’équilibre (mg/kg de MS) et la concentration sédimentaire (mg/kg de MS).

2. Rapport entre la concentration larvaire à l’équilibre (mg/kg de MS) et la concentration dans l’eau (µg/l).

Deux mécanismes entrent en jeu dans ce phénomène de bioaccumulation (Péry, 2003) : l'**adsorption** du plomb sur l'exosquelette et les tubules anales ainsi que l'**assimilation** de ce métal dans l'organisme (figure 2.4). Timmermans *et al.* (1992) montrent que le premier phénomène est faible en comparaison au second. L'assimilation dans l'organisme s'effectue via l'ingestion de nourriture (phase particulaire) et la diffusion à travers le tégument et les tubules (phase dissoute) (Timmermans *et al.*, 1992). Dans l'organisme, la forme toxique du plomb est la forme cationique. Une partie de l'ion métallique est chélatée par des protéines extra-cellulaires. Une autre partie atteint la cellule. Là, il peut précipiter, être piégé dans les organites ou bien chélaté par des protéines (Fowler, 1987) telles que les metallothionéines (Petering et Fowler, 1986). La pénétration du métal dans l'organisme s'accompagne, en outre, d'une induction de la synthèse des protéines de piégeage. Timmermans *et al.* (1992) montrent que la constante d'élimination du plomb chez *Chironomus riparius* est faible.

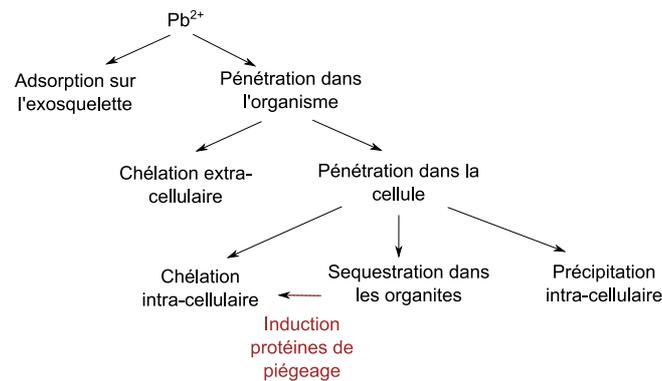


FIGURE 2.4 – Différentes voies d'assimilation du plomb sous forme cationique
Schéma réalisé d'après les travaux de Petering et Fowler (1986), Fowler (1987) et Timmermans *et al.* (1992).

Concernant la **toxicité aiguë**, bien que le plomb possède une forte affinité pour la phase particulaire, les données relevées dans la littérature concernent uniquement l'exposition en phase aqueuse (tableau 2.2). La CL_{50} à 3 jours varie entre 2,8 et 3,7 mg/l chez *Chironomus* sp. en fonction de la température d'exposition (Dutta *et al.*, 2010). En effet, Dutta *et al.* (2010) montrent que la CL_{50} diminue lorsque la température augmente. La CL_{50} à 10 jours s'élève à 258 $\mu\text{g/l}$ chez *Tanytarsus dissimilis* (Anderson *et al.*, 1980). Grosell *et al.* (2006) ont quant à eux observés une NOEC et une LOEC sur *Chironomus tentans*, après 27 jours d'exposition, de 109 et 497 $\mu\text{g/l}$ respectivement. Enfin, Ingersoll *et al.* (1996) ont établi chez *Chironomus riparius* une valeur seuil d'effet médian³ de 62,85 $\mu\text{g/l}$. Il est à noter que cette valeur demeure supérieure à la valeur maximale mesurée par le réseau de contrôle de l'AESN (base de données 2008) (tableau 2.1).

Les effets délétères du plomb sur l'**expression des gènes** de l'hémoglobine et de l'HSP 70 apparaissent à partir de concentrations d'exposition de 50 $\mu\text{g/l}$ chez *Chironomus tentans* (Lee *et al.*, 2006).

Concernant les **effets physiologiques**, si Timmermans *et al.* (1992) relèvent un retard de croissance chez des larves de *Chironomus riparius* exposées pendant 25 jours à une eau contenant 1 mg/l de plomb, d'autres travaux mettent en évidence l'absence d'effets sur la croissance chez *Tanytarsus dissimilis* pour des concentrations inférieures à 258 $\mu\text{g/l}$ (Anderson *et al.*, 1980)

3. Valeur au-dessus de laquelle on observe fréquemment sinon toujours un effet toxique.

ou bien chez *Chironomus riparius* pour des concentrations inférieures à 100 (Vermeulen *et al.*, 2000) et 500 mg/l (Ha et Choi, 2008b). De même, Bird *et al.* (1995) ne notent aucun effet sur la croissance de *Chironomus tentans* pour des concentrations sédimentaires d'exposition inférieures à 5000 mg/kg de MS.

TABLEAU 2.2 – Données toxicologiques du plomb en phase aqueuse sur le chironome

	taxon	durée essai (jours)	CL ₅₀ (mg/l)	NOEC ¹ (mg/l)	LOEC ¹ (mg/l)
Qureshi <i>et al.</i> (1980)	<i>Chironomus</i> sp.	1	350	–	–
Ha et Choi (2008b)	<i>Chironomus</i> <i>riparius</i>	1	6693	–	–
Qureshi <i>et al.</i> (1980)	<i>Chironomus</i> sp.	2	220	–	–
Dutta <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus</i> sp.	3	2,82-3,69	–	–
Dutta <i>et al.</i> (2010)	<i>Chironomus</i> sp.	4	2,28-3,02	–	–
Anderson <i>et al.</i> (1980)	<i>Tanytarsus</i> <i>dissimilis</i>	10	0,258	–	–
Grosell <i>et al.</i> (2006)	<i>Chironomus</i> <i>tentans</i>	27	–	0,109	0,497

1 : NOEC et LOEC sur la survie.

Les résultats portant sur **les variations morphologiques** de la larve de *Chironomus* sp. sont très variables. Ils semblent, en effet, largement dépendants des concentrations d'exposition, des matrices testées (eau ou sédiment), du trait considéré et de l'espèce étudiée. Ainsi, si aucune augmentation significative des phénotypiques du mentum n'est observée ni pour des concentrations aqueuses inférieures à 100 mg/l chez *Chironomus riparius* (Vermeulen *et al.*, 2000) ni pour des concentrations sédimentaires inférieures à 5000 mg/kg de MS chez *Chironomus tentans* (Bird *et al.*, 1995), Martinez *et al.* (2001) notent, en revanche, une augmentation des phénotypiques du mentum chez *Chironomus tentans* exposé à 1723 et de 5252 mg/kg de MS. De plus, Vermeulen *et al.* (2000) observent un niveau d'anomalies du pecten important chez *Chironomus riparius* exposé à 100 mg/l de plomb.

Janssens de Bisthoven *et al.* (1998c) ont étudié les effets d'une exposition au plomb pendant cinq générations sur les variations morphologiques du mentum et des mandibules de *Chironomus riparius*. Ils constatent, pour des concentrations d'exposition variant entre 0 et 500 µg/l, des effets significatifs des facteurs concentration et génération sur les anomalies morphologiques. Par ailleurs, dans le milieu naturel, un fort taux de phénotypiques du mentum du chironome a été associé à des concentrations élevées en plomb dans les larves et le sédiment (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b ; Martinez *et al.*, 2002).

2.2.3 Le 4-nonylphénol dans l'environnement

Le nonylphénol (NP) appartient à la famille des alkylphénols (AP). Il est principalement **issu de la dégradation du nonylphénol éthoxylé**. Ce dernier est un **tensio-actif non ionique**

utilisé comme détergent domestique, dans la formulation des pesticides ainsi que dans certains produits industriels. Il atteint le milieu naturel principalement via les rejets d'eau traitée (Giger *et al.*, 1984). La dégradation du nonylphénol ethoxylé en condition aérobie conduit à la formation de nonylphénols ethoxylés à chaînes plus courtes (figure 2.5), mono à tri-ethoxylés (NPE1, NPE2 et NPE3) (Ying *et al.*, 2002). Enfin, la déethoxylation complète avec formation de nonylphénol (NP) se produit en condition anaérobie (Giger *et al.*, 1984). Des processus d'oxydation de la chaîne ethoxylée peuvent également conduire à la formation d'acide acétique nonylphenoxy ethoxy (NPEC2) et d'acide acétique nonylphenoxy (NPEC1) (Ding et Tzing, 1998). La persistance du NP dans l'environnement peut être supérieure à 400 jours (Gross-Sorokin *et al.*, 2003).

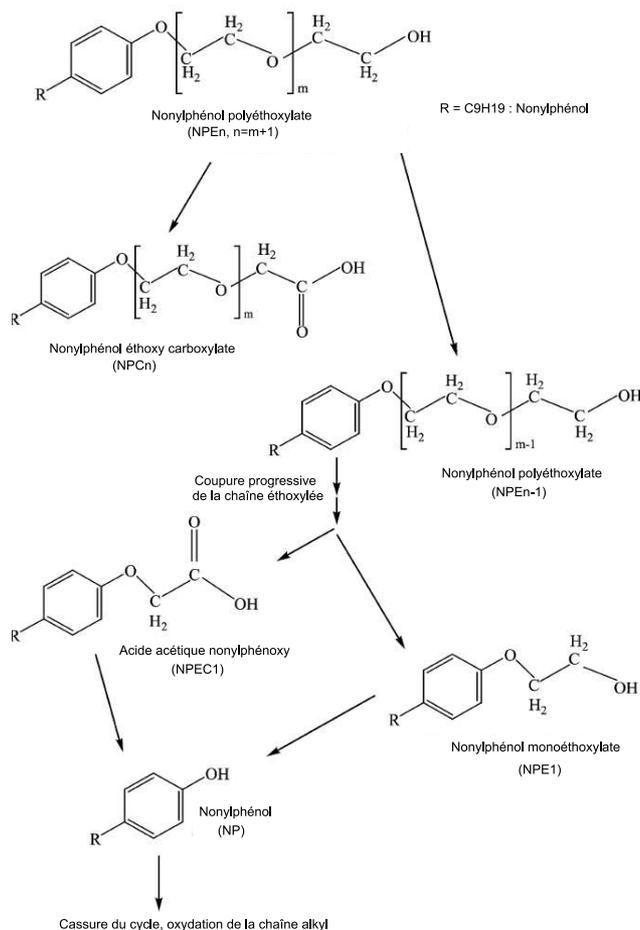


FIGURE 2.5 – Dégradation d'un alkylphénol ethoxylé en alkylphénol
D'après Ying *et al.* (2002).

Il existe plusieurs isomères ramifiés et substitués en position 4 qui constituent la majorité des nonylphénols dans les productions commerciales (80 %) (Becue et Nguyen, 2005). Aussi lorsque l'on parle du nonylphénol fait-on généralement référence au 4-nonylphénol (4-NP).

Les concentrations relevées dans l'environnement sont très variables d'un site à l'autre (tableau 2.3). Blackburn et Waldoock (1995) relèvent ainsi sur 29 rivières du Royaume-Uni, des concentrations en 4-NP inférieures à 2 µg/l dans 41 % des cas et supérieures à 10 µg/l dans 34 % des cas. Naylor *et al.* (1992) observent dans les eaux de surface des concentrations en 4-NP qui n'excèdent pas 0,1 µg/l dans la majorité des cas, les concentrations les plus élevées étant

de l'ordre du microgramme par litre. De même, Isobe *et al.* (2001) notent, autour de la zone urbaine de Tokyo, des concentrations variant entre 0,05 et 1,08 µg/l. L'étude de la base de données 2008 de l'AESN fait, en revanche, apparaître des concentrations pouvant atteindre 38 µg/l.

TABLEAU 2.3 – Concentrations de 4-NP détectées dans l'environnement

	n ¹	concentrations eau (µg/l)	n ¹	concentrations sédiments (mg/kg MS)
AESN (2008)	1696	< 0,2-38,2	441	< 0,02-8
Isobe <i>et al.</i> (2001)	24	0,05-1,08	20	0,03-13,00
Blackburn <i>et al.</i> (1999)	69	< 0,2-22	56	< 0,0001-0,01
Bennie <i>et al.</i> (1997)	35	< 0,01-0,92	9	< 0,10-72
Naylor <i>et al.</i> (1992)	30	< 0,11-0,64	30	< 0,003-3,0

1 : nombre de stations échantillonnées.

Si les concentrations mesurées dans les eaux de surface demeurent relativement faibles, il existe en revanche une **large contamination des sédiments de rivière**, liée à la forte affinité du 4-NP pour la matière organique. En effet, le 4-NP est un toxique hydrophobe. Son coefficient de partage octanol-eau (logKow) est de 4,48 et son coefficient de partage carbone organique-eau (logKoc) est de 5,2 (Isobe *et al.*, 2001), ce qui indique une aptitude importante à s'adsorber sur la matière organique. Mäenpää et Kukkonen (2006) ont mis en évidence une relation inverse entre bioaccumulation chez *Lombriculus variegatus* (Oligochète) et teneur en matière organique du sédiment, ce qui suggère qu'une fraction du 4-NP est piégée dans une fraction non biodisponible du sédiment.

Naylor *et al.* (1992) mettent en évidence des concentrations atteignant 3 mg/kg de MS dans le milieu naturel et Isobe *et al.* (2001) relèvent des concentrations variant entre 0,03 et 13 mg/kg de MS. En outre, dans un site soumis à des rejets industriels, Bennie *et al.* (1997) observent des concentrations pouvant atteindre 72 mg/kg de MS. Les concentrations sédimentaires maximales relevées dans la base de données 2008 de l'AESN sont de 8 mg/kg de MS et le 4-NP est détecté dans 33 % des 441 stations échantillonnées.

2.2.4 Toxicité du 4-nonylphénol sur le chironome

Le 4-NP est plus toxique que son composé parent éthoxylé à longue chaîne. En effet, les substances à longue chaîne sont faiblement liposolubles et présentent plus de difficultés à traverser les membranes biologiques constituées de phosphoaminolipides. Jobling *et al.* (1996) ont montré **une activité œstrogénique** du 4-NP chez la truite.

La concentration entraînant la mort de 50 % des individus appartenant à l'espèce *Chironomus riparius* dans la phase aqueuse est de 688 µg/l à 24 heures (Lee et Choi, 2006) et de 874 µg/l à 48 heures (Mäenpää et Kukkonen, 2006) (tableau 2.4). Kahl *et al.* (1997) mettent en évidence sur *Chironomus tentans* les premiers **effets létaux** à partir d'une concentration de 91 µg/l. Schmude *et al.* (1999) ont établi en mésocosme, sur la tribu des Chironomini, une NOEC supérieure à 243 µg/l. Ils notent en outre que si l'abondance des larves appartenant à la tribu des Tanytarsini est significativement réduite après 25 jours d'exposition à 243 µg/l, elle n'est, en revanche, pas affectée pour la tribu des Chironomini. Les concentrations toxiques létale relevées dans la littérature demeurent inférieures aux concentrations généralement détectées dans

l'environnement (tableau 2.3).

TABLEAU 2.4 – Données toxicologiques du 4-NP en phase aqueuse sur le chironome

	taxon	durée essai (jours)	CL ₅₀ (µg/l)	NOEC ¹ (µg/l)	LOEC ¹ (µg/l)
Lee et Choi (2006)	<i>Chironomus riparius</i>	1	688	–	–
Ha et Choi (2008a)	<i>Chironomus tentans</i>	1	1271	–	–
Mäenpää et Kukkonen (2006)	<i>Chironomus riparius</i>	2	874	–	–
England et Bussard (1993)	<i>Chironomus tentans</i>	4	160	–	–
England et Bussard (1993)	<i>Chironomus tentans</i>	14	119	–	–
Kahl <i>et al.</i> (1997)	<i>Chironomus tentans</i>	20	–	42	91
Schmude <i>et al.</i> (1999)	<i>Chironomini</i>	20	–	243 ± 41	> 243

1 : NOEC et LOEC sur la survie.

En ce qui concerne les **effets moléculaires**, Lee et Choi (2006) et Park et Choi (2009) relèvent des dommages à l'ADN chez *Chironomus riparius* à partir de concentrations d'exposition de 10 µg/l, ce qui suggère un **effet génotoxique du 4-NP**. De plus, à partir de concentrations dans la phase aqueuse de 1 µg/l, l'activité de la protéine chaperonne HSP 70 augmente chez *Chironomus riparius* ainsi que chez *Chironomus tentans* (Lee et Choi, 2006 ; Lee *et al.*, 2006). L'expression des gènes de l'hémoglobine augmente également pour cette concentration d'exposition chez ces deux espèces (Lee *et al.*, 2006 ; Ha et Choi, 2008b).

Le 4-NP a, en outre, un **effet sur le système de défense anti-oxydant**. Ainsi, des dommages cellulaires sont observés par Park et Choi (2009) chez *Chironomus riparius* en présence de 100 µg/l de nonylphénol. Pour cette même concentration, l'activité de certaines enzymes impliquées dans le stress oxydatif augmente (Lee et Choi, 2006).

Concernant les marqueurs physiologiques, **aucun effet sur la masse des larves ni sur le ratio sexuel** n'est observé chez *Chironomus riparius* ou bien chez *Chironomus tentans* pour des concentrations atteignant 100 (Lee et Choi, 2006) et 200 µg/l (Kahl *et al.*, 1997), respectivement. Pour une concentration d'exposition de 100 µg/l, Ha et Choi (2008a) notent, en revanche, une diminution de la masse larvaire. Le **taux d'émergence est, en outre, réduit** pour cette concentration d'exposition (Lee et Choi, 2006). Cette diminution pourrait être liée à une mortalité larvaire élevée en présence de 4-NP (Lee et Choi, 2006) ou bien aux propriétés physiques du 4-NP qui, en augmentant la tension superficielle à la surface de l'eau, empêcherait les adultes de s'envoler (Schmude *et al.*, 1999). **Aucun effet sur la reproduction** (fécondité et viabilité des pontes) n'est observé pour des concentrations inférieures à 200 µg/l. Néanmoins, des anomalies morphologiques des pontes sont constatées à partir de 50 µg/l (Kahl *et al.*, 1997).

Meregalli *et al.* (2001) notent une augmentation significative du niveau de phénodéviations du mentum chez les larves de *Chironomus riparius* en présence de 100 µg/l de 4n-NP (isomère

linéaire et substitué en position 4). Il est à noter que le niveau d'anomalies morphologiques augmente également de façon significative chez *Daphnia magna* exposés à 44 µg/l de 4-NP (LeBlanc *et al.*, 2000) ou bien chez *Hydra attenuata* exposées à des concentrations de l'ordre du µg/l (Pachura, 2005).

TABLEAU 2.5 – Données toxicologiques du 4-NP en phase sédimentaire sur le chironome

	espèce	durée essai (jours)	mesure	CL ₅₀ (mg/kg MS)	LOEC ¹ (mg/kg MS)
Bettinetti <i>et al.</i> (2002)	<i>Chironomus riparius</i>	10	survie	315-465	115
Bettinetti et Provini (2002)	<i>Chironomus riparius</i>	28	émergence	380	–
Mäenpää et Kukkokken (2006)	<i>Chironomus riparius</i>	10	survie	–	79
England et Bussard (1993)	<i>Chironomus tentans</i>	14	survie	261 ²	–

1 : LOEC sur le poids humide.

2 : 75 µg/l dans l'eau interstitielle.

Sur la fraction sédimentaire, Bettinetti *et al.* (2002) mettent en évidence chez *Chironomus riparius* des CL₅₀ à 10 jours variant entre 315 et 465 mg/kg de MS en fonction des caractéristiques physico-chimiques du sédiment. England et Bussard (1993) relèvent, quant à eux, chez *Chironomus tentans*, une CL₅₀ à 14 jours de 261 mg/kg de MS dans le sédiment et de 75 µg/l dans l'eau interstitielle (tableau 2.5).

Les **effets sur la croissance** apparaissent chez *Chironomus riparius* à partir de 79 mg/kg de MS selon Mäenpää et Kukkokken (2006) et à partir de 115 mg/kg de MS selon Bettinetti *et al.* (2002). Bettinetti et Provini (2002) remarquent, en outre, que des organismes exposés à 250 mg/kg de MS ne pondent pas lorsqu'ils atteignent le stade adulte. Les concentrations sédimentaires qui entraînent un effet sur la physiologie (croissance ou fécondité) du chironome demeurent inférieures aux concentrations généralement détectées dans l'environnement (tableau 2.3).

En résumé, l'organisme modèle choisi, *Chironomus riparius*, est un diptère non piqueur à cycle larvaire aquatique et à cycle adulte aérien. Son développement larvaire se déroule dans la phase sédimentaire. Les deux polluants retenus dans ce travail sont le plomb, un métal non essentiel, et le 4-nonylphénol, une substance organique identifiée comme perturbateur endocrinien. Le plomb provient essentiellement des activités anthropiques. Il continue à être mesuré en quantité relativement importante dans les cours d'eau, et en particulier dans la phase sédimentaire. Néanmoins, la majorité des essais écotoxicologiques menés en laboratoire a porté sur la phase aqueuse. C'est ainsi qu'une LOEC de 497 µg/l a pu être déterminée chez *Chironomus tentans* après 27 jours d'exposition (Grosell *et al.*, 2006). En raison de sa forte affinité pour la matière organique, le 4-nonylphénol est également majoritairement détecté dans les sédiments de rivière. Il est issu de la dégradation de surfactants utilisés dans les détergents, les pesticides ainsi qu'au cours de process industriels. Sa LOEC à 20 jours sur *Chironomus tentans* dans la phase aqueuse s'élève à 91 µg/l (Kahl *et al.*, 1997) tandis que sa LOEC à 10 jours sur *Chironomus riparius* dans la phase sédimentaire varie entre 79 et 115 mg/kg de MS (Bettinetti *et al.*, 2002 ; Mäenpää et Kukkokken, 2006).

Chapitre 3

Matériel et méthode

Trois types d'essai ont été réalisés en laboratoire (figure 3.1). Pour chacun d'eux, plusieurs sessions d'essais ont été menées séparément en raison du nombre d'organismes disponibles limité pour chaque essai :

1. Essais de type 1 : mise en contact des larves, du premier au dernier stade, avec un sédiment contaminé au plomb. Analyse des quantités de plomb accumulées dans les larves, analyse du contenu tissulaire des larves en malondialdéhyde, métallothionéines et réserves énergétiques (lipides, protéines et glycogène). Analyse du plomb contenu dans le corps des adultes.
2. Essais de type 2 : mise en contact des larves, du premier au dernier stade, avec un sédiment contaminé au plomb ou au 4-NP. Analyse des effets de ces toxiques sur la forme du mentum.
3. Essais de type 3 : mise en contact des larves, du premier au dernier stade, avec un sédiment contaminé provenant du milieu naturel. Analyse des variations de forme du mentum, des variations de forme des ailes des adultes et analyse des variations de forme du mentum affectant la génération suivante.

3.1 Caractéristiques des sédiments d'essai

Les essais ont été menés en laboratoire sur deux types de sédiment : du sédiment artificiel, fabriqué en laboratoire, ainsi que du sédiment provenant du milieu naturel. Le sédiment artificiel a été utilisé comme substrat témoin. En outre, afin de tester les effets du plomb, d'une part, et du 4-NP, d'autre part, ce sédiment a été dopé avec les toxiques étudiés. Deux sédiments provenant du milieu naturel ont, de plus, été étudiés : l'un a été prélevé dans une station soumise à de faibles rejets urbains, l'autre, dans une station fortement anthropisée soumise à des rejets urbains et industriels.

3.1.1 Fabrication du sédiment artificiel

Comme le recommande l'OCDE (2004), le sédiment artificiel utilisé dans les tests de toxicité est un mélange de sable de Fontainebleau (diamètre des particules compris entre 150 et 300 μm) (75,3 %), d'argile kaolinite (19 %), de tourbe broyée (5 %) et de carbonate de calcium (0,7 %). Le sédiment humide est obtenu par ajout d'eau déminéralisée (33 % de la masse totale). Les caractéristiques physico-chimiques de ce sédiment sont indiquées dans le tableau 3.1.

Le rapport entre carbone organique et azote organique est supérieur à 17 ce qui indique la présence de matière organique inutilisable pour l'alimentation du chironome (Péry *et al.*, 2003).

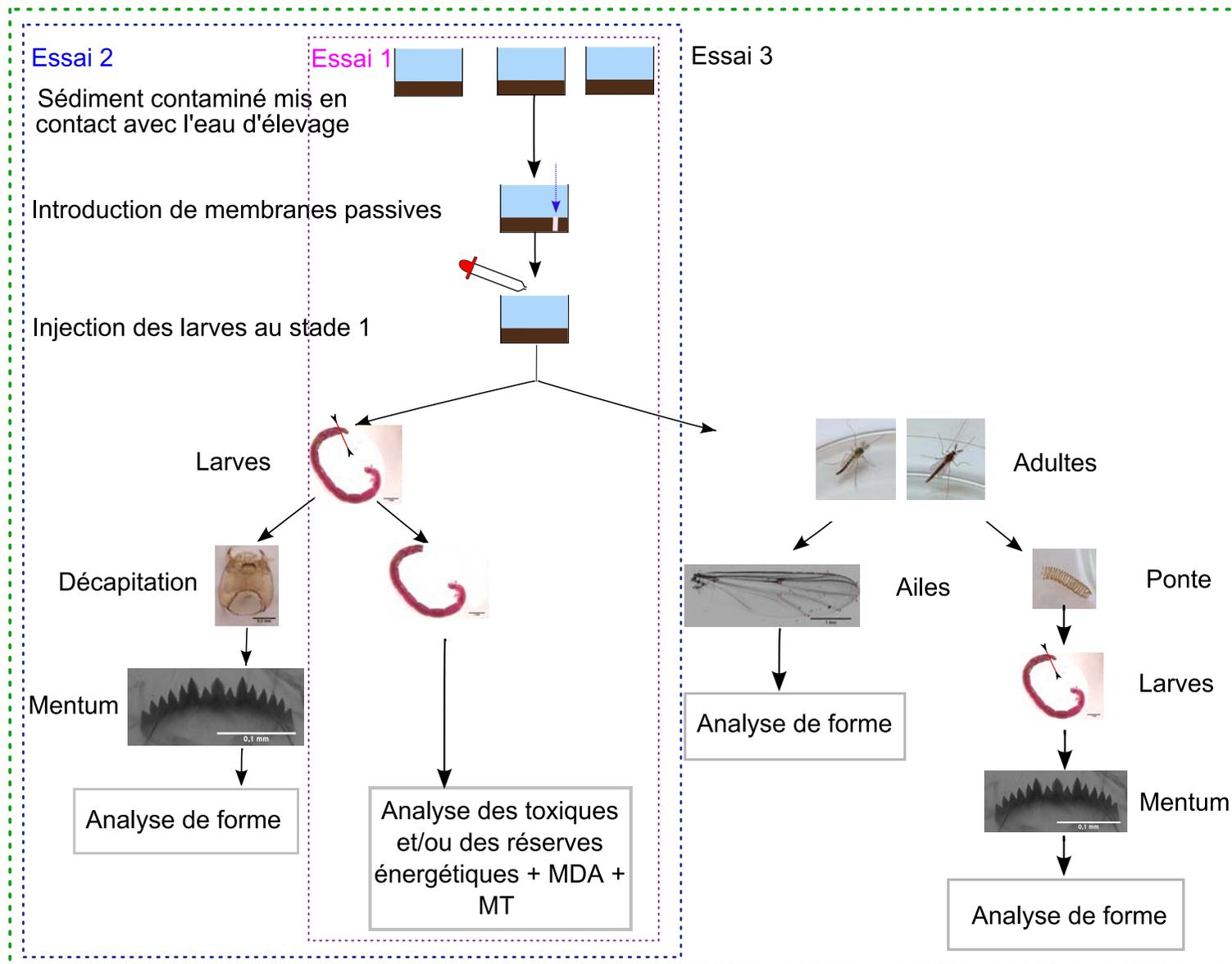


FIGURE 3.1 – Démarche méthodologique

Essai 1 : essais sur plomb de bioaccumulation + dosage des réserves énergétiques + MT + MDA, essai 2 : essai sur Pb et 4-NP avec analyse de forme du mentum, essai 3 : essai sur sédiment naturel avec analyse de forme du mentum + analyse de forme des ailes + analyse de forme du mentum de la génération suivante.

TABLEAU 3.1 – Caractéristiques du sédiment artificiel

Moyenne et écart-type entre trois prises d'essai.	
MO (%)	4,9 ± 0,9
CO (%)	1,9 ± 0,2
Norg (%)	0,03 ± 0,01
Ptot (%)	0,06 ± 0,02
pH	8,9 ± 0,2
C/N	62

Par conséquent, les organismes seront alimentés quotidiennement au cours des essais. L'utilisation de sable fin permet de limiter les phénomènes d'usure et d'abrasion des dents du mentum (Bird, 1997) qui pourraient occulter les phénotypages observés (Warwick, 1988). En outre, il a été montré que les substrats silicateux sont particulièrement adaptés à la croissance de *Chironomus riparius* (Péry *et al.*, 2003).

3.1.2 Dopage du sédiment artificiel

Dans ce travail, nous avons tenté d'évaluer chez *Chironomus riparius*, les effets sub-létaux d'une exposition au plomb. Les données 2008 issues du réseau de contrôle de l'AESN font apparaître des concentrations sédimentaires en plomb dans les stations échantillonnées variant entre 5 et 534 mg/kg de MS (tableau 2.1). Aussi, afin de travailler avec des concentrations d'exposition réalistes, le sédiment artificiel utilisé dans nos essais écotoxicologiques a été dopé au plomb avec des concentrations variant entre 0 et 500 mg/kg de MS.

Par ailleurs, compte tenu des données toxicologiques du 4-NP sur *Chironomus*, nous avons choisi de travailler avec des concentrations inférieures à 200 mg/kg de MS. Il est à noter que les concentrations testées sont supérieures aux concentrations usuellement mesurées dans l'environnement (tableau 2.3).

Le sédiment artificiel humide est mis en contact avec des solutions de PbCl₂ (PbCl₂ anhydre pour synthèse, Merck) de concentrations croissantes. Pour 1000 g de sédiment humide, on ajoute 400 ml de solution. De même, pour le dopage au 4-NP (Sigma Aldrich, Pestanal, n°CAS : 84852-15-2), la quantité souhaitée de toxique est introduite directement sur le sédiment, puis 400 ml d'eau déminéralisée sont ajoutés à 1000 g de sédiment humide. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter d'ajout de solvant (Bettinetti *et al.*, 2002) qui peut favoriser l'apparition de phénotypages du mentum (Vermeulen *et al.*, 2000 ; Watts *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2009). Ce mélange est agité pendant 24 h sur une table d'agitation afin de favoriser la sorption des contaminants sur la matrice solide. Puis, il est centrifugé pendant 20 minutes à 4000 tours/min. Le culot de centrifugation est récupéré.

Pour les essais portant sur le plomb, les contenants utilisés sont en plastique et préalablement nettoyés à l'acide nitrique dilué. Pour les essais portant sur le 4-NP, les contenants utilisés sont en verre. La verrerie est grillée pendant 2 heures à 550°C ou bien, lorsque ce n'est pas possible, rincée à l'acétone.

3.1.3 Prélèvement du sédiment dans la station d'Orcemont

Le sédiment a été prélevé dans la rivière La Drouette, dans le village d'Orcemont (Yvelines). La station échantillonnée se situe en milieu péri-urbain, caractérisé par une alternance de hameaux, de forêts et de zones d'agriculture intensive (figure 3.2).

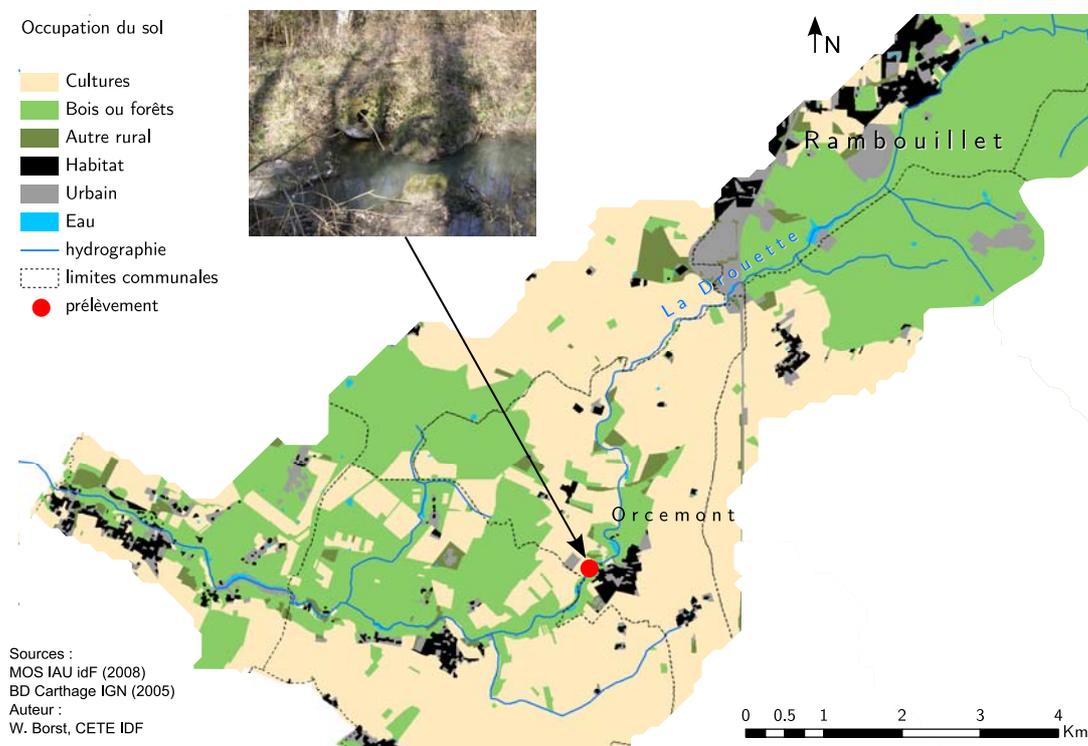


FIGURE 3.2 – Occupation du sol du bassin versant de la rivière La Drouette et point de prélèvement du sédiment

Le sédiment a été récolté par temps sec (24 février 2012) à la pelle à sédiment dans un rayon de deux mètres à l'aval du rejet d'une station d'épuration raccordée à un réseau unitaire domestique. Cette station reçoit une charge équivalente à 400 équivalents habitants (débit moyen environ 0,7 l/s). Par temps sec, l'effluent est traité par la station. Par temps de pluie l'apport excédentaire est by-passé directement dans la canalisation de rejet des eaux épurées. Le débit de la rivière par temps sec à l'amont du rejet est inférieur à 10 l/s. L'échantillon prélevé a été tamisé à 3000 μm , puis lyophilisé.

Sur ce sédiment, ont été analysés les éléments minéraux suivants : Pb, Cu, Zn, Cr, Ni, Cd, Mn, Ba, As, Se, Hg, Fe, Al, Mg et K, ainsi que les substances organiques suivantes : OP, NP, Hct et HAP.

3.1.4 Prélèvement du sédiment dans la station d'Andrésey

Le second sédiment étudié a été prélevé par temps sec dans la Seine (figure 3.3), en amont de l'écluse d'Andrésey (PK 72,00) au cours d'une opération de dragage (1^{er} juin 2012). Trois prélèvements à la pelle ont été réalisés. La station échantillonnée se situe en milieu urbain dense. De plus, elle se trouve à 7,5 km environ en aval du rejet de la station d'épuration d'Achères

(6000000 équivalents habitants). En outre, elle est soumise à de nombreux rejets d'eaux pluviales (DRIEE, 2010). Le trafic annuel moyen sur cet axe représente 16323 bateaux (VNF, 2010).

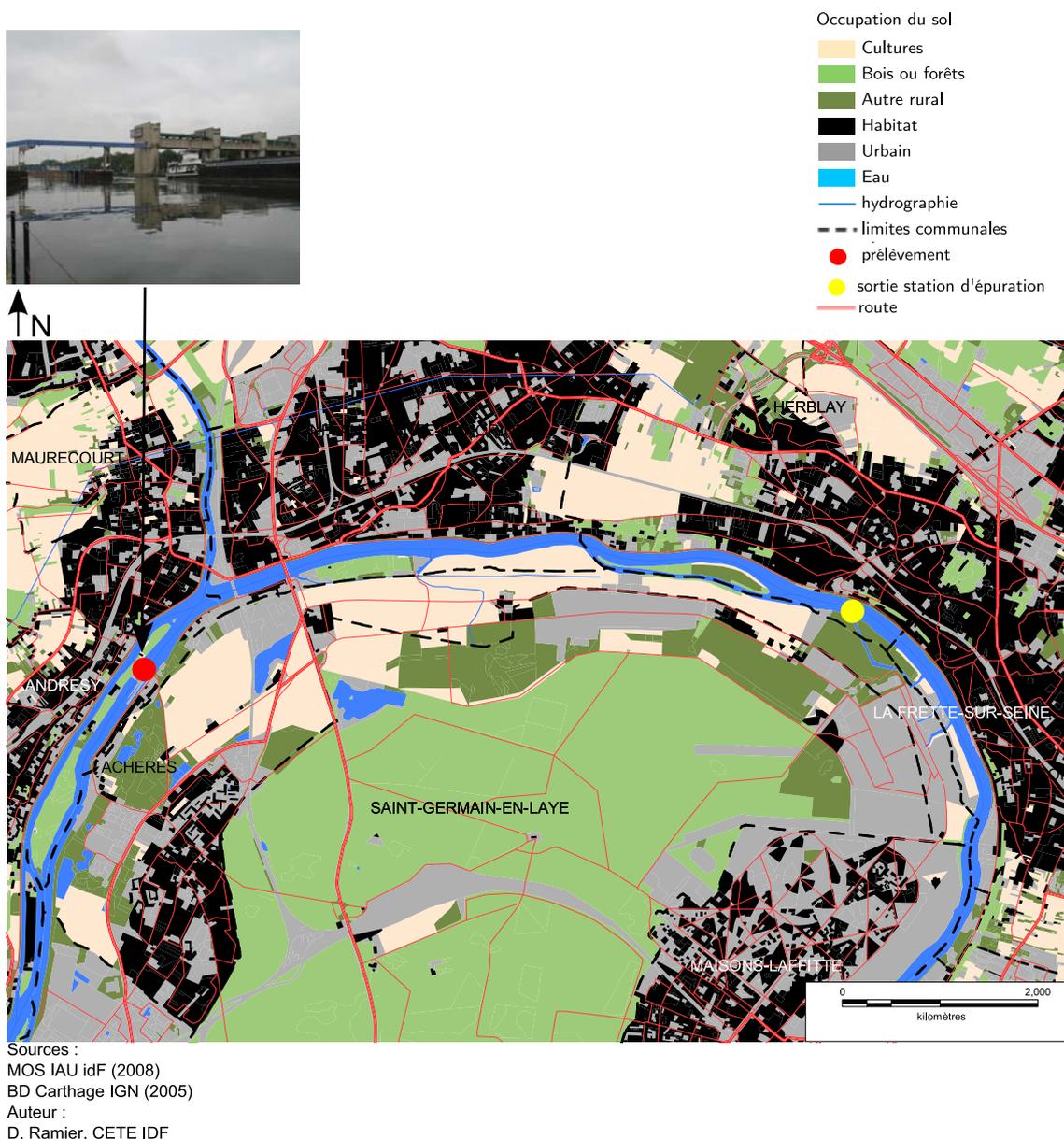


FIGURE 3.3 – Localisation du prélèvement (écluse d'Andrésy) et occupation du sol

Sur ce sédiment, ont été analysés les éléments minéraux suivants : Pb, Cu, Zn, Cr, Ni, Cd, Mn, Ba, As, Se, Hg, Fe, Al, Mg et K, ainsi que les substances organiques suivantes : OP, NP, Hct, HAP et PCB. En outre, des essais écotoxicologiques sur *Brachionus calyciflorus* (NF ISO 20666) ont été réalisés à la demande de VNF par le Laboratoire Santé Environnement Hygiène de Lyon.

3.1.5 Caractérisation physico-chimique des sédiments

Les mesures physico-chimiques ont été réalisées par l'équipe Qualité des Eaux et des Sols du CETE IDF. La teneur en matière organique est mesurée par perte au feu. Pour déterminer la teneur en carbone organique, l'échantillon est préalablement acidifié avec de l'acide phosphorique

(H_3PO_4) à 85 % pour éliminer le carbone inorganique. Puis, la teneur en carbone organique est obtenue par combustion à 900°C de l'échantillon et détection infra-rouge du CO_2 formé. L'azote organique est obtenu par soustraction de la concentration en NH_4 à la concentration en NK. Le NK est déterminé selon la norme NF EN 13342 et le NH_4 selon la norme NF ISO 14256-1 par extraction au KCl. Le dosage de phosphore total est réalisé par la méthode d'extraction à l'eau régale (NF EN 14672). Le pH est mesuré selon la norme NF ISO 10390. Enfin, la granulométrie a été mesurée sur tamis par l'équipe Infrastructure Durable du CETE IDF.

3.2 Organisme modèle et conception expérimentale

3.2.1 Élevage de *Chironomus riparius*

L'élevage de *Chironomus riparius* est réalisé, en condition statique, dans un incubateur (tableau 3.2). La souche a été obtenue auprès de l'IRSTEA (Lyon) et est maintenue dans le laboratoire du CETE IDF depuis 2004.

TABLEAU 3.2 – Caractéristiques de l'élevage de *Chironomus riparius*

Température ($^\circ\text{C}$)	15 ± 1
Cycle jour-nuit (heures)	16-8
Intensité lumineuse (Lux)	1000-2000
Volume aquarium (l)	8
Renouvellement eau	50 % trois fois par semaine
Type de substrat	sable de Fontainebleau
Épaisseur du substrat (cm)	2
Oxygène dissous ($\text{mg O}_2/\text{l}$)	7 ± 1
Quantité nourriture/jour (mg)	200

La température d'élevage choisie est volontairement inférieure à la température usuelle de 20°C (Langer-Jaesrich *et al.*, 2010 ; Watts *et al.*, 2003), afin d'être plus proche des caractéristiques du milieu naturel. En effet, une étude menée préalablement sur la rivière La Drouette (Arambourou et Chenevoy, 2010), nous a permis de constater que les températures ne dépassaient pas dans l'année 18°C . Le substrat des aquariums est composé d'une couche de 2 cm de sable de Fontainebleau (diamètre moyen des particules entre 150 et $300 \mu\text{m}$). Le volume d'eau est quatre fois supérieur à celui du substrat. L'eau est constituée d'un mélange d'eau de source (S^t Lambert[®]) et d'eau déminéralisée (7:3 v/v) (tableau 3.3). Elle est aérée grâce à un système de bullage. Les chironomes sont nourris quotidiennement avec 200 mg de Tetramin[®] par aquarium. Chaque semaine, les paramètres conductivité, pH, oxygène dissous et concentration en nitrites sont relevés. Régulièrement, une partie des individus est sacrifiée afin de limiter la surpopulation. Quatre aquariums contiennent la souche d'élevage, les populations de ces quatre milieux sont mélangées chaque semaine, afin d'assurer un brassage génétique.

TABLEAU 3.3 – Caractéristiques de l'eau d'essai

Moyenne et écart-type entre trois prises d'essai.	
Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	346 ± 4
pH	$7,7 \pm 0,1$
Dureté ($\text{mg CaCO}_3/\text{l}$)	146 ± 3

3.2.2 Conception expérimentale

Quelques jours avant le début de l'essai, des pontes et de l'eau sont prélevés dans les aquariums d'élevage et mis dans des boîtes de pétri. Les pontes sont suivies quotidiennement pour s'assurer de leur éclosion.

La préparation des unités expérimentales débute avec la mise en place d'une couche de 1,5 cm de sédiment d'essai (cf. partie 3.1 du chapitre 3). Cette couche de sédiment est mise en contact avec un volume d'eau (tableau 3.3) quatre fois supérieur au volume de substrat, pendant 24 heures au minimum, afin de permettre la décantation des particules ainsi que l'équilibrage entre phase solide et phase liquide. Les unités expérimentales sont disposées dans un incubateur (température = $15^{\circ}\text{C} \pm 1$, cycle jour/nuit = 16/8 heures, intensité lumineuse = 1000-2000 lux). Une heure avant le début de l'essai, l'eau est aérée. Du sédiment ainsi que de l'eau surnageante sont prélevés pour l'analyse des toxiques.

Puis des chironomes au premier stade larvaire sont introduits aléatoirement dans chaque unité expérimentale grâce à une pipette. Pour ce faire, une matrice de piochage aléatoire entre les différentes pontes provenant de l'élevage est créée sous le logiciel R (Development Core team, 2010). Chaque individu dispose d'une surface de sédiment supérieure à 2 cm^2 (OCDE, 2004), ce qui correspond à 80 individus/bac pour les unités expérimentales en plastique (essais sur le plomb) et à 100 individus/bac pour les unités expérimentales en verre (essais sur le 4-NP et sur les sédiments provenant du milieu naturel). Pour chaque concentration testée, trois unités expérimentales au minimum sont mises en place.

Les chironomes sont nourris quotidiennement avec 0,40 mg de Tetramin[®] par individu. Pour les essais portant sur le plomb, la nourriture est dopée suivant les mêmes proportions que le sédiment (Bird *et al.*, 1995). Le pH, la température, l'oxygène dissous, la conductivité ainsi que la concentration en nitrites sont relevés tous les trois jours. Les larves de chironome sont récupérées au dernier stade larvaire, c'est à dire au stade quatre, soit entre 15 et 20 jours après injection.

Les larves extraites des essais sont tamisées à $400\ \mu\text{m}$ et rincées dans deux bains d'eau milliQ. Ce traitement a été montré suffisant pour éliminer les métaux adsorbés sur les corps (Bervoets *et al.*, 1996b). Puis, elles sont placées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau milliQ, elles mêmes disposées dans une boîte fermée dont l'atmosphère est saturée en formaldéhyde. Après 24 heures, les têtes sont tranchées puis conservées jusqu'au montage dans de l'eau milliQ.

Pour les essais portant sur l'analyse des variations de forme chez l'adulte (essai de type 3), seule la moitié des larves est retirée, l'autre partie est laissée dans le sédiment jusqu'à émergence (figure 3.1). Les unités expérimentales sont alors recouvertes d'un couvercle grillagé afin de retenir les imagos. Le premier jour d'émergence observé dans chaque unité expérimentale est noté. Lorsque des pontes apparaissent, elles sont retirées et disposées dans des boîtes de pétri. Puis, après leur éclosion, les organismes appartenant à la génération F1 sont introduits aléatoirement grâce à une pipette dans des unités expérimentales contenant du sédiment témoin artificiel ou bien du sédiment contaminé provenant du milieu naturel (cf. partie 3.1 du chapitre 3).

Afin de vérifier que les chironomes prélevés à la fin de l'essai ont atteint le stade 4, nous avons réalisé au préalable des essais de croissance. Pour ce faire, nous avons laissé croître des larves (température = $15^{\circ}\text{C} \pm 1$, cycle jour/nuit = 16/8 heures, intensité lumineuse = 1000-2000

lux) nourries quotidiennement avec 0,40 mg de Tetramin[®] par individu. Le chironome croît par mues successives. Une vingtaine d'individus ont été prélevés 2 jours, 7 jours, 12 jours et 19 jours après éclosion des pontes. Leurs têtes ont été montées entre lame et lamelle. Chaque tête a ensuite été prise en photo (grossissement 100-400) sous microscope (Nikon - Eclipse E600), grâce à une caméra vidéo (Sony - SSC-DC14/14P/18P). Puis la plus grande largeur de la capsule céphalique ainsi que la demi largeur du mentum ont été mesurées grâce au logiciel ImageJ (Rasband, 2010). Ces mesures nous ont permis d'établir la relation linéaire présentée sur la figure 3.4. Ainsi, les larves appartenant au quatrième et dernier stade présentent une demi taille du mentum variant entre 0,09 et 0,12 mm. Nous avons vérifié, dans nos essais, que les larves observées avaient atteint cette demi taille. Les larves de taille inférieure ont été exclues.

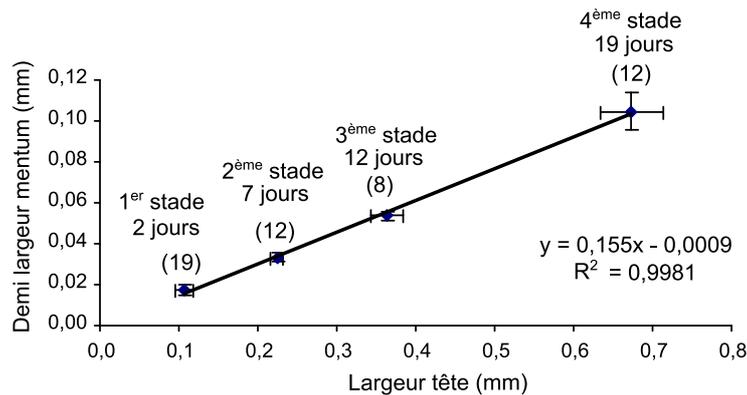


FIGURE 3.4 – Demi taille du mentum en fonction de la largeur de la tête
Entre parenthèse les effectifs. Moyenne et écart-type des différents lots d'organismes mesurés.

3.2.3 Expérience sur une population de *Chironomus* provenant de la station d'Orcemont

Le niveau d'anomalies morphologiques affectant la population de *Chironomus* colonisant la station d'Orcemont (La Drouette) a été déterminé. Nous n'avons pas pu descendre au niveau de l'espèce, car l'identification des espèces appartenant au genre *Chironomus* s'avère difficile (Wiederholm, 1984 ; Sharley *et al.*, 2004). Des larves de chironomes appartenant au 4^{ème} stade larvaire ont été prélevées par temps sec (24 juillet 2012) au surber dans la station d'Orcemont (cf. partie 3.1.3). Ce prélèvement a permis d'évaluer la densité d'organismes. La population prélevée a été divisée en lots de cent individus. Puis, trois lots ont été tirés au hasard afin de déterminer les variations de forme affectant le mentum des organismes.

Une étude antérieure nous a permis de constater que le genre *Chironomus* ne colonisait pas la zone amont de la rivière La Drouette (Arambourou et Chenevoy, 2010). Par conséquent, afin de pouvoir comparer le niveau de variations phénotypiques observé dans la station d'Orcemont avec celui mesuré dans un groupe témoin, nous avons élevé des larves provenant de la station d'Orcemont, en laboratoire, sur un sédiment témoin artificiel. En effet, si les variations phénotypiques possèdent une origine environnementale et que les polluants impliqués n'ont pas eu un effet mutagène, alors les variations observées ne devraient pas être transmises à la génération suivante. Pour ce faire, cent-cinquante individus ont été placés dès notre retour au laboratoire, dans un aquarium présentant les mêmes caractéristiques que nos aquariums d'élevage (cf. partie 3.2.1 du chapitre 3) (figure 3.5). Après émergence des larves de la station d'Orcemont, nous

avons isolé cinq pontes. Les individus fraîchement éclos ont ensuite été aléatoirement injectés dans trois unités expérimentales contenant du sédiment artificiel. Après 20 jours, les phénodéviation et les AF affectant le mentum des larves ont été quantifiées.

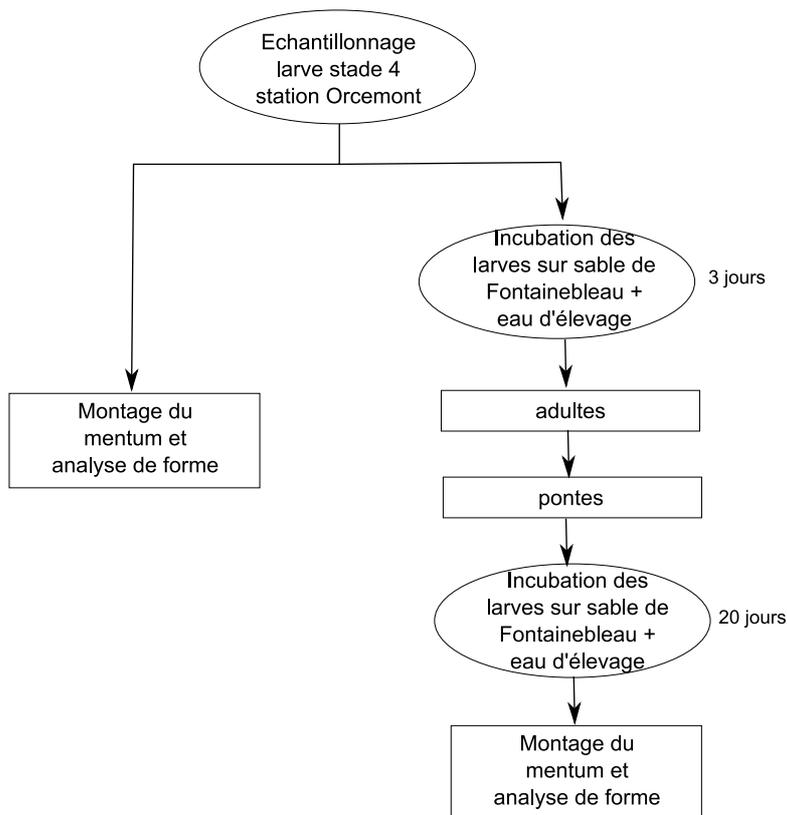


FIGURE 3.5 – Représentation schématique de l'essai sur une population provenant du milieu naturel

3.3 Mesure des réserves énergétiques, du malondialdéhyde et des métallothionéines

3.3.1 Préparation des échantillons

Les larves sont extraites des unités expérimentales après 16 jours d'exposition. Des pools de 50 individus sont formés. Leurs corps sont introduits dans des cryo-tubes que l'on plonge dans de l'azote liquide. Puis ces cryo-tubes sont envoyés au LIEBE (Metz) dans de la neige carbonique pour analyse des concentrations en glycogène, lipides, protéines, malondialdéhyde et métallothionéines. Ces analyses ont été réalisées par Eric Gismondi.

Chaque pool est homogénéisé manuellement à l'aide d'un Potter Elvehjem dans une solution tampon de 50 mM de phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,6) à laquelle est ajouté 1 mM de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). En outre, afin d'inhiber les protéases et la γ -glutamyl transpeptidase, 1 mM de mélange serine-borate et 5 mM de phenylglyoxal sont ajoutés. La solution est ajustée à un volume correspondant à deux fois le poids humide de l'échantillon (c'est à dire 400 μl de solution tampon pour 200 mg de tissu humide). Les homogénats de tissus ainsi obtenus sont analysés immédiatement. Afin de mesurer les paramètres cités précédemment, chaque homogénat est divisé en quatre. Pour chacun, deux mesures indépendantes de chaque

biomarqueur sont réalisées.

3.3.2 Dosage des lipides et du glycogène

Le dosage du contenu en glycogène et en lipides s'inspire de celui décrit par Plaistow *et al.* (2001). 20 μL d'une solution à 2 % de sulfate de sodium (m/v) et 540 μL d'un mélange chloroforme/méthanol 1:2 (v/v) sont ajoutés à 40 μL d'homogénat. Après stockage pendant une heure dans de la glace, les échantillons sont centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi que le culot obtenus sont utilisés pour déterminer le contenu en lipides et en glycogène, respectivement.

100 μL du surnageant sont transférés dans des tubes de culture et placés dans un bain sec à 95°C afin d'évaporer le solvant. Puis, 200 μL d'acide sulfurique à 95 % sont ajoutés. Après 10 minutes, les tubes de culture sont refroidis dans de la glace. Puis, 4,8 ml d'un réactif de vanilline-acide phosphorique, composé de 120 mg de vanilline, de 20 ml d'éthanol ultra-pur à 95 % et de 80 ml d'acide phosphorique à 85 %, sont ajoutés. Après 10 minutes, la densité optique est mesurée à 535 nm. Du cholestérol commercial est utilisé comme étalon. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide.

Afin de dissoudre le culot, 400 μL d'eau milliQ sont ajoutés au culot. L'échantillon est placé pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons. 100 μL d'échantillon sont ensuite introduits dans des tubes de culture et 4,9 ml de réactif anthrone sont ajoutés. Ce réactif est composé d'un mélange de 1,13 g d'anthrone, de 170 ml d'eau ultra-pure et de 630 ml d'acide sulfurique à 95 %. Le mélange est placé dans un bain sec à 95°C pendant 17 min, puis il est refroidi dans de la glace. La densité optique est mesurée à 625 nm. Du glucose est utilisé comme étalon. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide.

3.3.3 Dosage du contenu total en protéines

Le contenu total en protéines de chaque échantillon est mesuré selon le protocole établi par Bradford (1976). L'étalon utilisé consiste en de l'albumine de sérum bovin. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide.

3.3.4 Dosage des métallothionéines

Les métallothionéines sont mesurées par HPLC (chromatographie liquide à haute performance), selon le protocole décrit par Alhama *et al.* (2006). 150 μL d'homogénat sont centrifugés à 3500 g pendant 10 minutes. Puis, le surnageant est de nouveau centrifugé à 22000 g pendant 30 minutes à 4°C afin d'obtenir la fraction S22000. Cette fraction est diluée 10 fois dans le tampon d'homogénéisation. Afin de réduire et de dénaturer la protéine, 108 μL d'un mélange d'incubation (230 mM Tris (pH 9,5), 300 mM DTT, 100 mM EDTA et 10 % de dodécylsulfate de sodium) sont ajoutés à 125 μL d'échantillon dilué. Ce mélange est placé dans un bain à 70°C pendant 20 minutes. Puis, 17 μL de monobromobimane à 180 mM sont ajoutés. Le tout est incubé dans le noir à température ambiante pendant 15 minutes, ceci afin de marquer les métallothionéines. L'étalon utilisé consiste en une solution de métallothionéines I issue de foie de lapin et préparée dans un mélange de Tris à 230 mM (pH 9,5). Les concentrations sont exprimées en nmol-MT/mg de protéine.

3.3.5 Dosage du malondialdéhyde

La concentration en malondialdéhyde (MDA) est mesurée par HPLC avec détection UV à 267 nm selon la méthode décrite par Behrens et Madère (1991). Un volume de 70 μl d'homogénat est dilué 4 fois dans de l'éthanol à 95 % (HPLC grade). Le tout est refroidi dans de la glace pendant 1h30 afin de déprotéiniser le mélange. Puis, la solution obtenue est centrifugée à 18000 g pendant 30 minutes à 4°C. 100 μL de surnageant sont ensuite injectés dans l'HPLC. Les résultats obtenus sont exprimés en ng-MDA/mg de lipides.

3.4 Quantification des toxiques dans l'eau interstitielle

3.4.1 Les sondes DGT pour la mesure des métaux labiles

Afin de déterminer les concentrations labiles en métaux lourds (Pb, Cu, Ni, Cr et Cd) dans l'eau interstitielle, nous avons eu recours à des échantillonneurs passifs de type DGT (gradient diffusif en film fin). Ces sondes sont constituées d'un support en téflon recouvert d'une résine échangeuse d'ions (gel de Chelex), elle même placée derrière un gel diffusif (Zhang et Davison, 1995). Les ions diffusent dans le gel avant d'atteindre la résine. La masse d'ion collectée par la résine est proportionnelle à la concentration de la fraction labile dans l'eau interstitielle. Les gels sont protégés par un filtre en nitrate de cellulose possédant des pores de diamètre 0,45 μm . Cette structure est maintenue par un couvercle en téflon présentant une ouverture de 2 cm de diamètre. Nous nous sommes procurés les gels auprès de DGT Research LTD (Lancaster, UK). Les sondes sont conservées à 4°C dans un sac plastique contenant une solution de NaCl à 0,03 M.

Avant introduction dans le sédiment, les sondes DGT sont désoxygénées. Pour ce faire, elles sont plongées pendant une nuit dans une solution de NaCl à 0,03 M contenant un gel Chelex, que l'on fait buller avec de l'azote. Les sondes sont ensuite rapidement introduites verticalement dans le sédiment. A la fin de l'essai, les DGT sont extraites du sédiment. Elles sont rincées à l'eau milliQ, puis désassemblées. Le gel chelex est récupéré et introduit dans 1 ml d' HNO_3 (pour analyse, Merck) dilué à 10 % en volume. Ce mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 3000 tours/min (Zhang et Davison, 1995). Puis, il est conservé à l'obscurité à 4°C avant analyse.

La concentration dans la DGT est calculée selon l'équation 3.1 :

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{DtA} \quad (3.1)$$

avec M la masse accumulée (ng) sur la résine de surface A (cm^2), pendant la durée de contact avec le sédiment t (s). D le coefficient de diffusion du métal (cm^2/s) dans le gel diffusif d'épaisseur Δg (cm).

La masse M (ng) est obtenue par la relation suivante :

$$M = \frac{C(V_{HNO3} + V_{gel})}{fe} \cdot 1000 \quad (3.2)$$

avec C la concentration en métal mesurée ($\mu\text{g}/\text{l}$) dans le volume d'extraction V_{HNO3} (l) du gel de chelex de volume V_{gel} (l). fe le facteur d'élution du métal considéré.

3.4.2 Les membranes SPMD pour la mesure des polluants organiques

Afin de déterminer les concentrations dissoutes en AP (alkylphénols) et en HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) dans l'eau interstitielle, nous avons utilisé des SPMD (membranes

semi-perméables). Ces membranes ont été obtenues auprès d'Exposmeter AB (Suède). Elles consistent en des tubes de polyéthylène de 15 cm de long, de 2,5 cm de large renfermant 0,17 ml de lipide (trioléine).

Avant introduction dans le sédiment, les membranes sont dopées avec un étalon interne, le 4n-NP pour le dosage en AP et le 5-méthylchrysène pour le dosage en HAP. Pour ce faire, les membranes sont percées à leur extrémité, puis 100 µl d'une solution de 4n-NP (Dr. Ehrenstorfer) à 10000 µg/l ou bien 50 µl d'une solution de 5-méthylchrysène (Dr. Ehrenstorfer) à 10000 µg/l, sont introduits à l'aide d'une micro-seringue. Les membranes sont refermées à l'aide d'un soude-sac. L'introduction de cet étalon interne permet de déterminer le taux d'échantillonnage Rs qui représente le volume d'eau extrait par la membrane par unité de temps (en cm³/j). Il est calculé selon l'équation 3.3 (Huckins *et al.*, 1993).

$$Rs = V_s \cdot K_{sw} \cdot k_e \quad (3.3)$$

avec V_s le volume de la membrane (cm³), K_{sw} déterminé grâce à l'équation 3.4 et k_e (j⁻¹) déterminé grâce à l'équation 3.5.

$$\log K_{sw} = a_0 + 2,321 \log K_{ow} - 0,1618 (\log K_{ow})^2 \quad (3.4)$$

avec $a_0 = -2,61$ (composé hydrophobe) et K_{ow} le coefficient de partage octanol-eau du composé étudié.

$$k_e = -\frac{\ln(N/N_0)}{t} \quad (3.5)$$

avec N_0 et N la concentration en 4n-NP ou en 5-méthylchrysène au début et à la fin de l'expérience et t , le temps d'exposition (j).

Les SPMD sont introduites verticalement dans le sédiment en début d'essai. A la fin de l'essai, elles sont retirées puis rincées à l'eau milliQ. Elles sont ensuite dialysées dans 30 ml d'un mélange hexane-dichlorométhane (80:20 en volume) (Lichrosolv[®], Merck) pendant 48 heures à l'obscurité et à température ambiante (Meadows *et al.*, 1993). Pour les essais ne nécessitant que le dosage du 4-NP, ce mélange est évaporé à sec puis repris dans 500 µl de méthanol. Pour les essais nécessitant le dosage des AP et des HAP (sédiment naturel), l'extrait obtenu après dialyse de la membrane est préalablement purifié sur colonne en verre contenant 1 g de silice. La colonne est ensuite éluee au dichlorométhane. Puis 500 µl d'isopropanol (keeper) sont ajoutés. Le mélange est évaporé jusqu'à un volume de 500 µl. Il est ensuite complété à 2 ml avec de l'isopropanol. Tous les extraits sont filtrés à 0,2 µm sur un filtre en PTFE avant analyse.

La concentration finale dans l'eau interstitielle est obtenue selon l'équation suivante :

$$C_{\text{eau interstitielle}} = \frac{N}{V_s \cdot K_{sw} (1 - \exp(-Rs \cdot t / V_s \cdot K_{sw}))} \quad (3.6)$$

avec N la quantité d'AP ou bien d'HAP mesurée (ng).

3.5 Analyses des toxiques dans les différents compartiments

3.5.1 Dosage des métaux lourds

Après décapitation, les corps des chironomes sont séchés pendant 24 heures à 30°C. Puis, ils sont digérés dans un mélange de 6 ml d'HCl (pour analyse, Merck), de 2 ml d'HNO₃ (pour analyse, Merck) et de 2 ml d'H₂O₂ (extra pur, Merck). L'H₂O₂ permet de compléter l'attaque de la matière organique. La solution est ensuite chauffée à 125°C pendant deux heures. Puis, elle est diluée à 40 ml par ajout d'eau milliQ. Les dosages en plomb, cuivre, chrome nickel et cadmium sont réalisés par absorption atomique four (Varian GTA 120). Le dosage du zinc est réalisé par absorption atomique flamme (Varian 280 FS).

Les exuvies et les pontes sont rincées dans deux bains d'eau milliQ. Les corps des adultes, les exuvies ainsi que les pontes sont extraits selon le même protocole que celui décrit pour les larves, à la nuance près que les volumes utilisés ont été divisés par deux. Le plomb est ensuite dosé par absorption atomique four.

Les sédiments sont séchés à 105°C pendant 24 heures. Puis une masse de 0,5 g est digérée dans un mélange de 6 ml d'HCl, de 2 ml d'HNO₃ et de 2 ml d'H₂O₂. Le mélange obtenu est ensuite dilué avec de l'eau milliQ jusqu'à un volume de 100 ml. Les dosages sont réalisés par absorption atomique four ou bien par absorption atomique flamme.

L'eau provenant des unités expérimentales est filtrée à 0,45 µm sur un filtre en nitrocellulose (Millipore[®]) préalablement nettoyé à l'HNO₃. Puis l'échantillon est stabilisé par ajout d'HNO₃ et conservé à l'obscurité à 4°C jusqu'à analyse. Les dosages sont réalisés par absorption atomique four ou bien par absorption atomique flamme.

La calibration est réalisée grâce à des solutions standards de l'élément dosé (Certipur[®], Merck). En outre, des contrôles qualité multi-éléments (Certipur[®], Merck) sont injectés au cours de chaque série d'analyse. La limite de quantification de l'élément dosé est également vérifiée pour chaque série d'analyse.

Les limites de quantification en plomb sont de 1,00 µg/l pour l'eau, de 0,23 mg/kg de MS pour les corps des larves, de 0,20 mg/kg de MS pour le sédiment, de 21 mg/kg de MS pour les exuvies, de 7 mg/kg de MS pour les pontes et de 3 mg/kg de MS pour les adultes. Les limites de quantification des autres éléments minéraux sont données en annexe 2.

3.5.2 Dosage des substances organiques

La méthode de dosage des AP (4-NP et 4t-OP) a été développée au cours de ce travail doctoral. Son détail est présenté dans l'annexe 3.

Après décapitation, les corps des chironomes sont lyophilisés. Ils sont ensuite extraits dans 5 ml de méthanol (Chromasolv[®], Sigma Aldrich) par passage dans deux bains à ultrasons d'une durée de 15 minutes chacun avec un temps de repos de 15 minutes entre les deux. L'extrait obtenu est complété jusqu'à 100 ml avec de l'eau milliQ. Cette solution est ensuite aspirée à travers une colonne d'extraction SPE (extraction en phase solide) C18 encapée en verre (Macherey-Nagel) présentant un taux de carbone de 14 %. La colonne est séchée sous flux d'air puis éluée au dichlorométhane (Lichrosolv[®], Merck). L'éluat récupéré est évaporé à sec puis le résidu est

repris dans 500 μ l de méthanol.

Pour les essais portant sur les chironomes exposés aux sédiments naturels (dosage des AP et des HAP), l'extraction est réalisée dans 5 ml de dichlorométhane grâce à deux bains à ultrasons. L'extrait est purifié sur une colonne en verre contenant 1 g de silice (Macherey-Nagel). Puis, 500 μ l d'isopropanol (keeper) sont ajoutés. Le mélange obtenu est évaporé à 500 μ l, puis il est complété à 1 ml avec de l'isopropanol.

Le sédiment est lyophilisé puis broyé. 10 g d'échantillon sont extraits au Soxhlet par 50 ml de méthanol (extraction solide-liquide). Pour les essais portant sur le sédiment artificiel dopé au 4-NP, l'extrait est ensuite complété à 50 ml avec du méthanol (excepté pour les échantillons témoins qui sont concentrés par évaporation à 1 ml). Les extraits chargés sont dilués par 10 ou par 20 avant injection. Pour les essais portant sur les sédiments prélevés dans le milieu naturel (dosage des AP et des HAP), 10 g d'échantillon sont extraits au Soxhlet par 50 ml de dichlorométhane. Les extraits sont purifiés sur une colonne en verre contenant 5 g de silice et activée selon la norme NF EN ISO 18857-1. Après ajout de 500 μ l d'isopropanol utilisé comme keeper, l'extrait purifié est évaporé à 500 μ l, puis il est complété à 5 ml avec de l'isopropanol.

L'eau provenant des unités expérimentales est filtrée à 0,7 μ m sur un filtre en fibre de verre (Whatmann, GF/F), puis 200 ml d'échantillon sont aspirés à travers une colonne SPE C18 encapsulée en verre. La colonne est séchée sous flux d'air puis éluée au dichlorométhane (Lichrosolv[®], Merck). L'extrait est ensuite évaporé. Dans le cas d'une analyse portant uniquement sur le 4-NP, l'extrait est repris dans 1 ml de méthanol. Dans le cas d'une analyse en AP et en HAP, un keeper, de l'isopropanol, est ajouté avant évaporation et l'extrait est repris dans 1 ml d'isopropanol.

Tous les échantillons sont filtrés à 0,2 μ m sur un filtre en PTFE avant injection. L'analyse des AP est réalisée par HPLC couplée à un fluorimètre (Waters 2475). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont de 230 et de 290 nm respectivement. 50 μ l d'échantillon sont injectés à travers une colonne C18, 5 μ m (4,6 x 150 mm, Alltima, Alltech) maintenue à une température de 30°C et éluée avec un mélange isocratique eau-acétonitrile de 30:70 (v/v), à un débit constant de 1 ml/min.

La calibration est réalisée grâce à des solutions standards de l'élément dosé. En outre, un contrôle qualité, consistant en une solution contenant des concentrations connues en AP, est injecté au cours de chaque série d'analyse.

Les limites de quantification en 4-NP et 4t-OP sont de 0,20 μ g/l pour l'eau, de 0,40 mg/kg de MS pour les corps des organismes et de 0,02 mg/kg de MS pour le sédiment.

Quinze HAP sont analysés : le naphtalène, l'acénaphène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le dibenzo(ah)anthracène, le benzo(ghi)perylène et l'indeno(123cd)pyrène. L'analyse des HAP est réalisée par HPLC couplée à un fluorimètre (Waters 2475). Les longueurs d'ondes des couples émission/excitation sont de 225/320 nm pour le naphtalène, l'acénaphène et le fluorène, de 250/375 nm pour le phénanthrène et l'anthracène, de 270/410 nm pour le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène et le 5-méthylchrysène (étalon interne) et de 300/466 nm pour le dibenzo(ah)anthracène, le benzo(ghi)perylène et l'indeno(123cd)pyrène. 50 μ l d'échantillon sont injectés à travers une colonne C18, 5 μ m possédant un greffage spécial HAP (4,6 x 250 mm, Vydac) maintenue à une température de 30°C et éluée

avec un gradient eau-acétonitrile (60:40 (v/v) à t=0 et 15:85 (v/v) à t=56 min (courbe 5)) à un débit de 0,9 ml/min. Les limites de quantification pour chacun des HAP dosés sont de 1 µg/l dans l'eau, de 0,005 mg/kg de MS dans le sédiment et de 0,04 mg/kg de MS dans le corps des organismes.

Pour calculer les rendements d'extraction du sédiment, un étalon interne, du 4-n-NP (pour le dosage du NP) ou du 5-méthylchrysène (pour le dosage des HAP), est injecté avant extraction. Le résultat obtenu sur les matrices sédimentaires est ensuite corrigé, pour chaque série d'analyse, par le taux de recouvrement de l'étalon interne.

Les hydrocarbures aliphatiques (Hct) entre n-C10 et n-C40 sont analysés par GC-FID selon la norme NF EN ISO 9377-2 pour les eaux et ISO-16703 pour les sédiments. Les limites de quantification sont de 200 µg/l pour la phase aqueuse et de 100 mg/kg de MS pour la phase sédimentaire.

Enfin, pour le sédiment provenant de la station d'Andrésey, les PCB, à la demande de VNF, ont été mesurés par le Laboratoire Santé Environnement Hygiène de Lyon par GC-MS après ASE (NF X33-012). Sept congénères ont été dosés : le PCB 28, le PCB 52, le PCB 101, le PCB 118, le PCB 138, le PCB 153 et le PCB 180.

3.6 Montage des appendices étudiés

3.6.1 Le mentum

Avant montage, afin d'éliminer les tissus internes gênant l'observation des pièces buccales, les capsules céphaliques sont mises à tremper successivement dans un bain de KOH à 10 % pendant 24 heures, puis dans un bain d'eau déminéralisée pendant 10 minutes, puis dans un bain d'acide acétique glacial pendant 10 minutes et enfin dans un bain d'éthanol pur (Epler, 2001). Elles sont ensuite disposées ventralement sur des lames de microscope et écrasées entre lame et lamelle dans une résine transparente (Eukitt[®]). Chaque tête est ensuite prise en photo, au grossissement 100 sous microscope (Nikon - Eclipse E600), grâce à une caméra vidéo (Sony - SSC-DC14/14P/18P).

3.6.2 Les ailes

Les mâles et les femelles sont séparées. Les ailes sont découpées à leur base à l'aide d'un scalpel et disposées sur une lame. Puis, elles sont écrasées entre lame et lamelle dans une résine transparente (Eukitt[®]).

3.7 Etude des variations de forme

3.7.1 Les phénodéviations

Dans un premier temps, les phénodéviations du mentum sont évaluées. Les dents asymétriques ou bien réduites ne sont pas comptabilisées comme des phénodéviations. De même, les dommages physiques, tels que les abrasions ou bien les cassures de dents, n'ont pas été pris en compte. Seule les déviations claires et distinctes sont relevées : ajout, absence, fusion, double fente et Khön gap (figure 3.6).

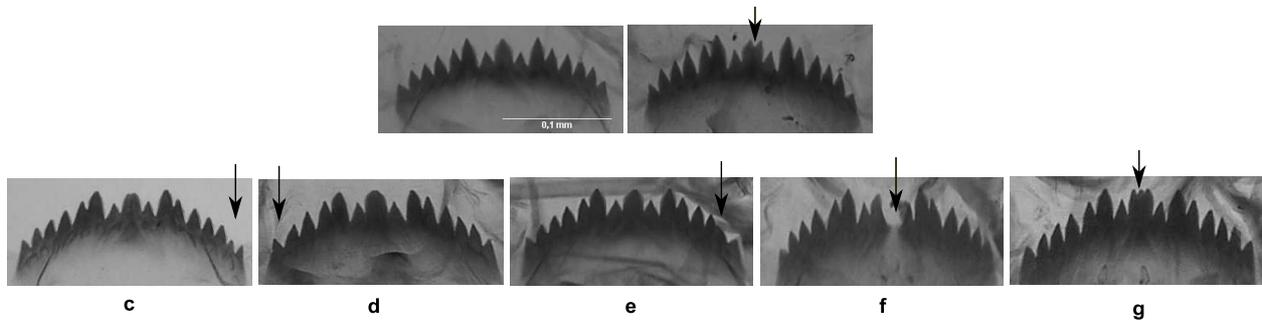


FIGURE 3.6 – Menta considérés comme normaux (a et b) et phénodéviation (c à g)
 (a) : mentum normal, (b) : dent médiane bifide, (c) : ajout d'une dent extérieure, (d) : absence d'une dent
 extérieure, (e) : fusion de la 2^{ème} et 3^{ème} dent extérieure, (f) : Khön gap, (g) : double fente.
 Les flèches indiquent les anomalies observées.

De nombreux organismes, appartenant aussi bien aux groupes témoins qu'aux groupes exposés, présentent une dent médiane bifide (figure 3.6). Ce type d'anomalie a également été relevé par Bird *et al.* (1995), Janssens de Bisthoven *et al.* (1998c) et Langer-Jaesrich *et al.* (2010). Bird *et al.* (1995) concluent qu'il s'agit là d'une anomalie liée à un phénomène génétique et non à un stress environnemental. Ces anomalies morphologiques sont difficiles à évaluer en raison de la taille de la fente médiane qui peut être faible. Par conséquent, nous ne les avons pas comptabilisées comme phénodéviation. Ce type de mentum a, en revanche, été pris en compte dans l'analyse des asymétries fluctuantes ainsi que dans l'étude de la variation de la forme moyenne du mentum.

3.7.2 Les asymétries fluctuantes

Le côté gauche et le côté droit du mentum (figure 3.7) des individus considérés comme non phénodéviant sont mesurés deux fois à vingt-quatre heures d'intervalle minimum ; ceci afin de déterminer l'erreur de mesure. Les mesures sont réalisées grâce au logiciel de traitement d'image ImageJ (Rasband, 2010).

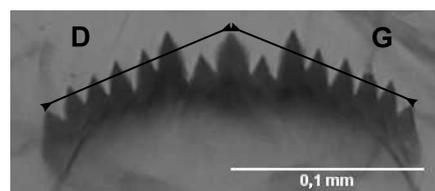


FIGURE 3.7 – Trait étudié et mesures de longueur effectuées sur le mentum
 D : mesure de longueur du côté droit, G : mesure de longueur du côté gauche

Vingt neuf points repères de type 1 (Bookstein, 1991), c'est à dire correspondant à l'intersection de deux lignes, ont été identifiés sur le mentum du chironome (figure 3.8) ; ils sont digitalisés grâce au logiciel tpsDig2 2.16 (Rohlf, 2010). Les répliqués de chaque concentration ont été regroupés de façon à obtenir un nombre d'individus supérieur au nombre de points repères. Chaque mentum a été digitalisé deux fois à vingt quatre heures d'intervalle minimum ; ceci afin de déterminer l'erreur de mesure.

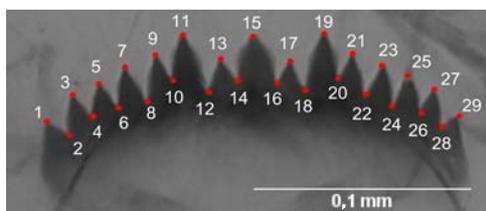


FIGURE 3.8 – Localisation des 29 points repères sur le mentum

Les ailes sont scannées (Scanner Plustek, OpticFilm 7400). Puis, huit points repères de type 1 (figure 3.9) sont digitalisés deux fois à vingt quatre heures d'intervalle minimum ; ceci afin d'évaluer l'erreur de mesure.

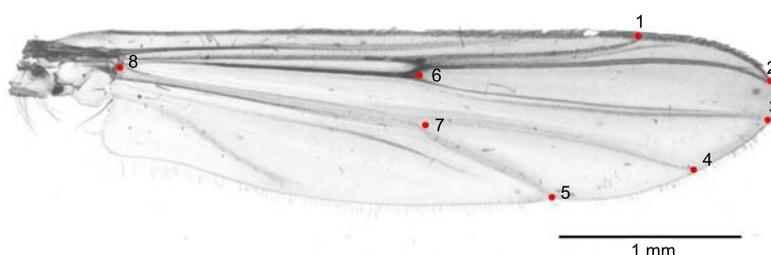


FIGURE 3.9 – Localisation des 8 points repères sur l'aile

Le jeu de coordonnées de points repère obtenu pour chaque individu est appelé configuration.

3.8 Analyse des données

Le seuil α des tests statistiques a été fixé à 5 %. Les analyses ont été menées grâce au logiciel R (Development Core team, 2010).

3.8.1 Données biochimiques

Afin de tester l'effet de la concentration d'exposition sur les caractéristiques biochimiques mesurées (concentrations en lipides, en glycogène, en protéines, en métallothionéines et en malondialdéhyde), une ANOVA a été réalisée. Dans le cas d'un effet significatif, cette ANOVA a été suivie d'un test Post-hoc de Tukey, afin de déterminer les groupes significativement différents des autres.

3.8.2 Cycle de vie

La comparaison des taux obtenus de survie et d'émergence deux à deux a été réalisée grâce au test des proportions. Les masses larvaires mesurées ont été comparées deux à deux grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon. Un test non paramétrique a été préféré car il permet de ne pas faire les hypothèses d'une distribution normale des données et de l'homogénéité des variances.

3.8.3 Fréquence de phénodéviant

Le taux de phénodéviant a été calculé comme le rapport du nombre de phénodéviant sur le nombre total d'individus observés. La comparaison des taux obtenus deux à deux a été réalisée grâce au test des proportions. En outre, nous avons complété l'estimation en fréquence par la détermination du score mis en place par Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) (annexe 1). Nous avons préféré utiliser cet indice car, à la différence de ceux définis par Lenat (1993), Vermeulen *et al.* (1998) et Al-Shami *et al.* (2011b), il présente l'avantage de faire appel à des notions claires (nombre de dents), qui sont, par conséquent, peu dépendantes de l'observateur.

3.8.4 L'asymétrie fluctuante de longueur

Dans ce travail, nous considérons que seule l'AF peut permettre de révéler un stress environnemental (Palmer et Strobeck, 2003). Par conséquent, il convient au préalable de séparer les AF des deux autres formes d'asymétrie mesurées chez les organismes vivants : l'AA et l'AD.

Afin de calculer l'indice d'AF de longueur, les données ont été au préalable log transformées. Cette transformation permet de ne pas dépendre des effets d'échelle, c'est à dire de la corrélation entre les asymétries et la longueur du trait étudié (Palmer et Strobeck, 2003). Puis, la distribution normale de la différence de longueur entre côté droit et côté gauche a été graphiquement vérifiée. De plus, le coefficient de dissymétrie a été calculé. Une valeur proche de zéro indique une distribution de type normal. L'erreur de mesure (MSm) a été évaluée grâce à une ANOVA mixte à deux facteurs, avec le côté pris comme facteur fixe et l'individu pris comme facteur aléatoire (Palmer et Strobeck, 1986). Afin de vérifier l'absence de phénomène d'AA, les valeurs de kurtosis ont été calculées (Darlington, 1970 ; Sokal et Rohlf, 1995). Une kurtosis inférieure à 0 peut indiquer un phénomène de platykurtosis caractéristique de l'AA.

En outre, afin de vérifier l'absence d'AD, nous avons utilisé les résultats de l'ANOVA mixte. Pour ce faire, la variance liée au côté (MSj) a été comparée à la variance liée au phénomène d'AF (MSsj) grâce à un test paramétrique F. Afin de vérifier l'absence d'allométrie, nous avons réalisé un test de corrélation non paramétrique de Spearman entre la longueur du trait étudié $((\ln(D)+\ln(G))/2)$ et l'asymétrie $(|\ln(D)-\ln(G)|)$. Nous avons eu recours à un test non paramétrique car il présente un double avantage : il n'est pas nécessaire de vérifier l'homogénéité des variances des données traitées et ce test n'est pas influencé par les individus extrêmes (Palmer et Strobeck, 2003).

L'indice retenu pour le calcul du niveau d'AF est l'indice AF10b (Palmer et Strobeck, 2003) (équation 3.7). Il présente l'avantage d'intégrer l'erreur de mesure (Palmer et Strobeck, 2003). Il est calculé sur des données log-transformées.

$$AF10b = 0,798 \cdot \sqrt{2} \frac{MSsj - MSm}{M} \quad (3.7)$$

avec M : nombre de répétitions de la mesure.

La répétabilité a été estimée, grâce au descripteur ME5 (Palmer et Strobeck, 2003), selon l'équation 3.8 :

$$ME5 : r_a = \frac{MSsj - MSm}{MSsj + (M - 1)MSm} \quad (3.8)$$

Afin de tester la différence de niveau d'AF entre groupes, nous avons eu recours au test F. L'indice AF10 est une variance. Par conséquent, le test F consiste à calculer le ratio de la plus grande sur la plus petite variance (Palmer, 1994). Les degrés de liberté des indices d'AF ont été estimés selon l'équation 3.9 (Palmer, 1994):

$$df = \frac{(MSsj - MSm)^2}{\frac{(MSsj)^2}{(S-1)(J-1)} + \frac{(MSm)^2}{SJ(M-1)}} \quad (3.9)$$

avec S le nombre de côtés et J le nombre d'individus.

3.8.5 L'asymétrie fluctuante en morphométrie géométrique

Afin de s'affranchir des différences de taille et d'orientation des caractères (ailes ou mentum) appartenant aux différents individus, une superposition procuste selon le critère des moindres carrés a été réalisée sur les données de chaque groupe. Cette superposition se décompose en trois étapes : 1) une mise à l'échelle des configurations par rapport à la taille centroïde¹, 2) une translation des configurations permettant la superposition des centroïdes (centres de gravité) et 3) une rotation des configurations autour de leurs centroïdes afin d'obtenir une superposition optimale des points repères homologues. Les nouvelles coordonnées obtenues, appelées coordonnées procuste, contiennent l'information complète sur la forme. Elles sont ainsi utilisées comme variables de forme. La projection des données dans l'espace tangent est une projection orthogonale. L'asymétrie est mesurée comme la déviation entre les points repères homologues.

Une ANOVA procuste (Klingenberg et McIntyre, 1998), avec le côté pris comme variable fixe et l'individu pris comme variable aléatoire, a ensuite été effectuée sur chaque coordonnée, selon le modèle isotropique grâce au logiciel MorphoJ (Klingenberg, 2011). Ce modèle suppose une variation égale autour de chaque point repère, c'est à dire qu'il n'existe pas de directions privilégiées (Klingenberg *et al.*, 2002). Pour le mentum, une ANOVA procuste de forme a été réalisée (objet présentant un axe de symétrie), pour les ailes une ANOVA procuste de taille et de forme ont été réalisées (objet présentant deux structures distinctes, image en miroir l'une de l'autre).

L'indice d'AF de forme et de taille a été estimé selon l'équation 3.7.

Pour l'ANOVA procuste de forme (mentum et ailes), afin de tester l'importance de l'AD, nous avons réalisé une analyse MANOVA utilisant la trace statistique de Pillai. Ce test présente un double avantage : il considère les variations des points repères autour du point moyen comme anisotropiques, ce qui est une hypothèse généralement plus réaliste en biologie (Klingenberg et Monteiro, 2005) et il est plus puissant que le test F pour détecter les phénomènes d'AD. Afin de vérifier l'absence d'AA de forme, nous avons vérifié la non agrégation des vecteurs de la différence D-G pour chaque point repère après la superposition procuste (Klingenberg et McIntyre, 1998). Les effets allométriques ont été testés grâce à une régression entre les vecteurs d'asymétrie et la taille centroïde suivie d'un test de permutation (10000 permutations).

Pour l'ANOVA procuste de taille centroïde (ailes), afin de vérifier l'absence d'AA de taille, nous avons vérifié la normalité de la distribution de la différence D-G, D étant la taille centroïde de l'aile droite et G celle de l'aile gauche. L'AD a été testée par comparaison de la variance liée

1. La taille centroïde est définie comme la racine carrée de la somme des distances au carré entre le centre de gravité de l'objet étudié et les différents points repères (Bookstein, 1991).

au côté avec la variance liée à l'asymétrie (côté x individu). Enfin, nous avons évalué l'effet allométrique en réalisant un test non paramétrique de Spearman entre l'asymétrie en valeur absolue ($|D - G|$) et la taille moyenne du caractère étudié $((D+G)/2)$. Ces opérations ont été menées avec le logiciel R (Development Core team, 2010) grâce à la librairie Rmorph (M. Baylac, communication personnelle).

3.8.6 L'analyse canonique de la variance entre groupe

Nous avons procédé à une analyse canonique de la variance (ou bien à une analyse discriminante dans le cas d'une comparaison entre deux groupes) (Albrecht, 1980) sur les coordonnées procuste de chaque individu. Le sédiment dans lequel les larves ont crû a été considéré comme un facteur indépendant. Cette analyse permet, en décrivant la forme de chaque individu par un unique point dans un espace multidimensionnel, de visualiser les différences de forme du mentum ou des ailes entre les différents groupes considérés (Klingenberg et Monteiro, 2005).

Les hypothèses biologiques expliquant la séparation des groupes sont alors construites en analysant la position relative de chaque groupe (Albrecht, 1980). La distance procuste, qui peut être définie par un angle séparant chaque groupe dans l'espace multidimensionnel, peut être directement convertie en similarité ou en différence de forme entre les groupes. Nous avons évalué la significativité de cette distance par un test de permutations (10000 permutations). En outre, afin de visualiser les zones de variation, nous avons effectué une superposition des consensus des groupes soumis à un stress sur les consensus des groupes témoins. Ces opérations ont été menées avec le logiciel MorphoJ (Klingenberg, 2011).

3.8.7 Relation entre phénomène de canalisation et instabilités de développement

Afin de déterminer si les variations entre individus et le phénomène d'AF reposent sur le même processus biologique, nous avons comparé les matrices de covariances liées à l'AF (c'est à dire à l'interaction côté x individu) à celles liées aux variations individuelles (c'est à dire à l'effet individu) (Klingenberg et McIntyre, 1998). Si ces deux variations reposent sur le même phénomène alors les matrices de covariances devraient être similaires. Au contraire, la matrice de covariance liée à l'erreur de mesure devrait différer des autres. La corrélation entre les matrices a été testée selon l'hypothèse de dissimilarité complète entre les deux matrices en ayant recours à un test de permutation des points repères (Klingenberg et McIntyre, 1998). Ces opérations ont été menées avec le logiciel MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Chapitre 4

Résultats et discussions

Chaque hypothèse testée fait l'objet d'une partie. Chaque partie est subdivisée en deux sous-parties : dans la première, nous présentons les résultats obtenus, dans la seconde nous discutons ces résultats.

4.1 Accumulation, élimination et effets biochimiques du plomb

Dans cette partie, nous testons l'hypothèse d'un effet du plomb au niveau de différents marqueurs biochimiques chez *Chironomus riparius*. Cinq concentrations sédimentaires d'exposition, variant entre 18 et 500 mg/kg de MS, numérotées de C1 à C5 ont été étudiées. Pour chaque concentration, nous avons mesuré l'accumulation du plomb dans le corps des larves appartenant au quatrième stade. En outre, pour deux des groupes exposés (C3 et C5) ainsi que pour le groupe témoin, nous avons mesuré trois marqueurs biochimiques : la concentration en MDA, la concentration en métallothionéines et le niveau des réserves énergétiques (lipides, glycogène et protéines). De plus, pour les groupes exposés aux concentrations C4 et C5, les concentrations en plomb ont été mesurées dans le corps des organismes mâles et femelles après leur émergence.

Les résultats présentés dans cette partie reprennent les données de tous les essais écotoxicologiques menés sur le plomb (essais de bioaccumulation et élimination, essais portant sur les marqueurs biochimiques ainsi que sur les variations de forme du mentum).

4.1.1 Résultats

4.1.1.1 Accumulation

Pour des concentrations d'exposition en plomb inférieures à 500 mg/kg de MS, nous observons une relation robuste entre la concentration en plomb dans le sédiment et la concentration en plomb dans le corps des organismes. Cette relation est de type log-log linéaire (figure 4.1) avec un coefficient directeur proche de 1.

De même, nous notons une relation log-log linéaire entre l'accumulation du plomb dans le corps des organismes et la quantité de plomb sous forme labile dans l'eau interstitielle, mesurée par DGT (figure 4.1). De plus, la relation reliant la concentration en plomb sédimentaire à la concentration labile dans l'eau interstitielle du sédiment artificiel est linéaire (équation 4.1) :

$$C_{\text{sédiment}} = 10,61.C_{\text{DGT}} + 8,22 \quad (4.1)$$

avec $C_{\text{sédiment}}$ la concentration dans le sédiment en mg/kg de MS et C_{DGT} la concentration labile dans l'eau interstitielle en $\mu\text{g/l}$. $R^2 = 0,994$ ($F_{1,4}=5357$, $p \leq 0,05$).

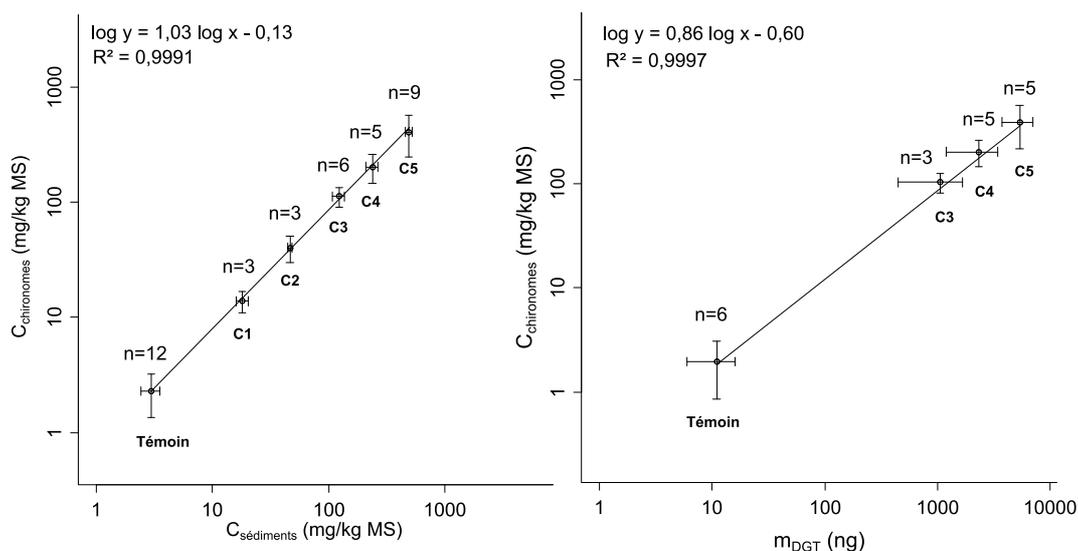


FIGURE 4.1 – Concentration de plomb dans le corps des larves de *Chironomus riparius* (mg/kg de MS) en fonction de l'exposition

A : en fonction de la concentration mesurée dans les sédiments (mg/kg de MS) et B : en fonction de la masse accumulée dans les DGT (ng). n indique le nombre de réplicats (unités expérimentales). Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les réplicats. Les concentrations sédimentaires d'exposition mesurées (moyenne \pm écart-type entre les réplicats) sont les suivantes (mg/kg de MS) : Témoin = $3,0 \pm 0,6$; C1 = $18,1 \pm 2,2$; C2 = $46,4 \pm 1,8$; C3 = $112,8 \pm 14,5$; C4 = $220,5 \pm 28,8$; C5 = $487,2 \pm 34,0$.

Le facteur de bioaccumulation (FBC), correspondant à la concentration larvaire après 16 jours d'exposition sur la concentration sédimentaire, varie autour d'une valeur moyenne de 0,8 (figure 4.2).

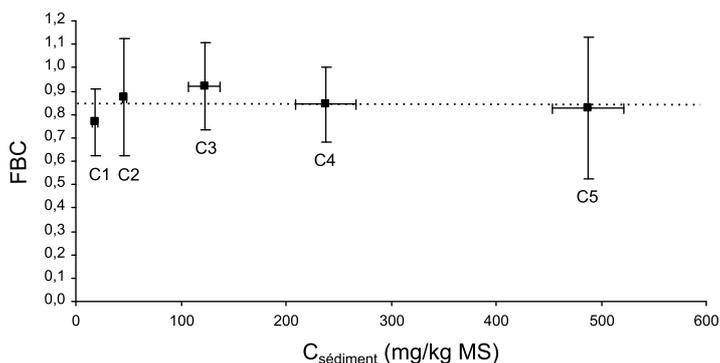


FIGURE 4.2 – Facteur de bioaccumulation en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments (mg/kg de MS)

Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les réplicats. La ligne en pointillés indique la valeur moyenne du FBC.

4.1.1.2 Cycle de vie

Pour deux des groupes exposés (C3 et C5) ainsi que pour le groupe témoin, nous avons mesuré la survie larvaire ainsi que le niveau de trois marqueurs biochimiques.

La survie n'est pas significativement affectée pour des concentrations d'exposition inférieures à 500 mg/kg de MS (tableau 4.1). Elle est même significativement supérieure pour la concentration d'exposition C5 la plus élevée (test des proportions, $\chi^2=6,3$, $p \leq 0,05$). Le pourcentage de survie est supérieur à 90 % dans les unités expérimentales ce qui indique que le sédiment artificiel utilisé est adapté à la vie larvaire du chironome. Par ailleurs, la masse larvaire n'est pas significativement affectée par la présence de plomb (test de Mann-Whitney-Wilcoxon deux à deux, tous les $p > 0,05$).

TABLEAU 4.1 – Masse et survie larvaire après 16 jours d'exposition au plomb
Moyenne et écart-type entre les trois réplicats. Les concentrations sédimentaires d'exposition mesurées (moyenne \pm écart-type entre les trois réplicats) sont les suivantes (mg/kg de MS) : Témoin=3,5 \pm 0,3 ; C3=132,1 \pm 13,3 ; C5=505,5 \pm 28,7.

	masse à 16 jours (mg/individu)	survie larvaire (%)
Témoin	0,32 \pm 0,09	93 \pm 4
C3	0,37 \pm 0,11	91 \pm 3
C5	0,35 \pm 0,04	98 \pm 3*

* : pourcentage supérieur aux autres groupes (test des proportions, $p \leq 0,05$).

4.1.1.3 Concentration en malondialdéhyde

La concentration en malondialdéhyde (figure 4.3) varie de façon statistiquement significative entre les trois groupes étudiés (ANOVA, $F_{2,6}=352$, $p \leq 0,05$). Elle atteint ainsi une valeur trois fois supérieure à celle du groupe témoin pour le groupe exposé à la concentration C5.

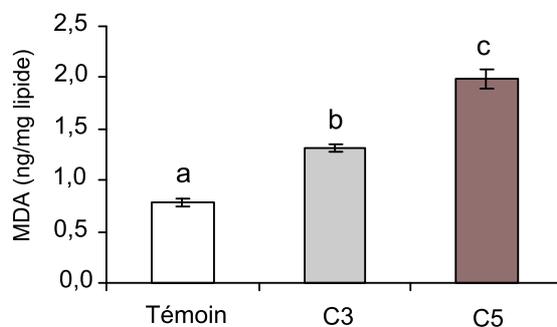


FIGURE 4.3 – Concentrations en malondialdéhyde (ng/mg de lipides) en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments

Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. Les différentes lettres au dessus des barres indiquent une valeur significativement différente des autres valeurs (test post-hoc de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.1.1.4 Concentration en métallothionéines

De même, la concentration tissulaire en métallothionéines (figure 4.4) varie de façon statistiquement significative entre les trois groupes étudiés (ANOVA, $F_{2,6}=300$, $p \leq 0,05$). Elle atteint une valeur deux fois plus importante chez les organismes appartenant au groupe C5.

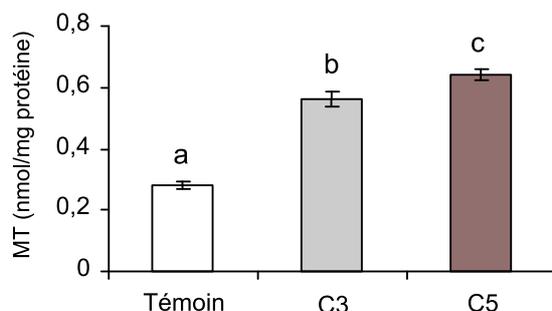


FIGURE 4.4 – Concentrations en métallothionéines (nmol/mg de protéine) en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments
Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. Les différentes lettres au dessus des barres indiquent une valeur significativement différente des autres valeurs (test post-hoc de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.1.1.5 Concentration en métaux essentiels

À mesure que les concentrations en plomb augmentent dans le corps des larves, les concentrations en cuivre augmentent et les concentrations en zinc diminuent légèrement (figure 4.5). Ainsi, la concentration en cuivre du groupe C5 est statistiquement supérieure à celle du groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, $W=0$, $p \leq 0,05$). En revanche, les variations de concentrations en zinc ne sont pas statistiquement significatives (test unilatéral deux à deux de Mann-Whitney-Wilcoxon, tous les $p > 0,05$).

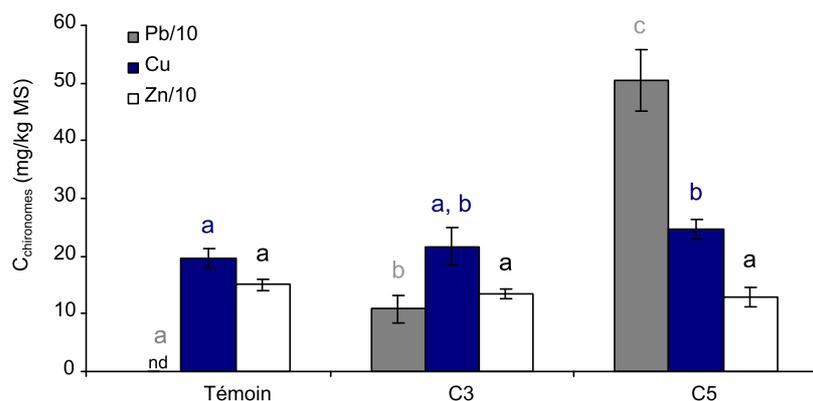


FIGURE 4.5 – Concentrations en plomb, zinc et cuivre (mg/kg de MS) dans le corps des larves en fonction de la concentration d'exposition en plomb dans les sédiments
Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. nd : non détecté. Les différentes lettres au dessus des barres indiquent une valeur significativement différente des autres valeurs (test unilatéral de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) pour chaque métal mesuré.

4.1.1.6 Réserves énergétiques

Le contenu en protéines (figure 4.6) ne varie pas de façon statistiquement significative en fonction de la concentration d'exposition (ANOVA, $F_{2,6}=3$, $p > 0,05$). En revanche, nous observons, une différence statistiquement significative du contenu en lipides et en glycogène entre les trois groupes étudiés (lipides : ANOVA, $F_{2,6}=352$, $p \leq 0,05$; glycogène : ANOVA, $F_{2,6}=64$, $p \leq 0,05$). En effet, alors que la concentration en lipides diminue, la concentration en glycogène augmente

avec l'exposition au plomb (figure 4.6).

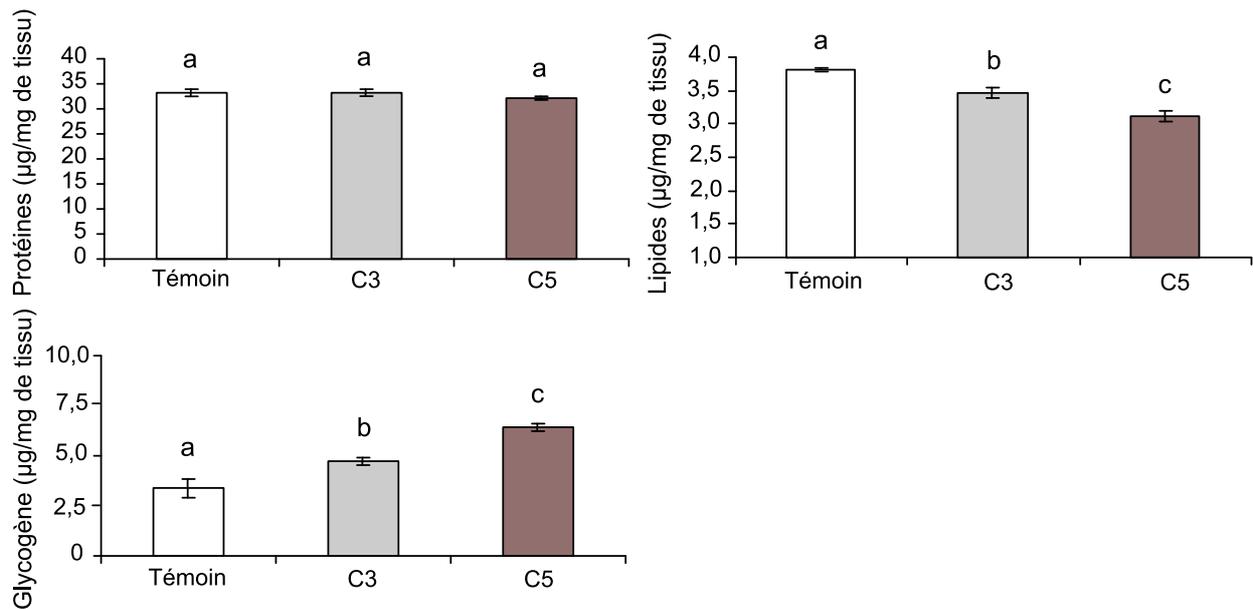


FIGURE 4.6 – Concentrations en protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide), lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide) et glycogène ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu humide) en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments

Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. Les différentes lettres au dessus des barres indiquent une valeur significativement différente des autres valeurs (test post-hoc de Tukey, $p \leq 0,05$).

En considérant les quantités d'énergie contenues dans les protéines (24000 mJ/mg), le glycogène (17500 mJ/mg) et les lipides (39500 mJ/mg) établies par Gnaiger (1983), nous notons une légère diminution de la quantité d'énergie totale chez les individus appartenant aux groupes exposés (figure 4.7), variation qui demeure néanmoins non statistiquement significative (ANOVA, $F_{2,6}=0.5$, $p > 0,05$).

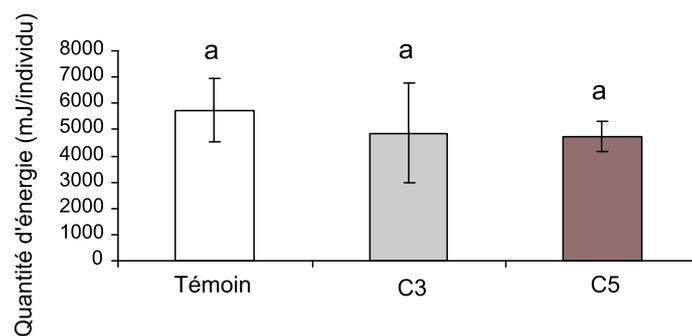


FIGURE 4.7 – Quantité d'énergie contenue dans les réserves énergétiques (protéines, lipides et glycogène) d'un individu (mJ/individu) en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments

Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. Les différentes lettres au dessus des barres indiquent une valeur significativement différente des autres valeurs (test post-hoc de Tukey, $p \leq 0,05$).

4.1.1.7 Métamorphose et élimination du plomb

Sur deux des groupes exposés au plomb (C4 et C5) ainsi que sur le groupe témoin, nous avons évalué les quantités de plomb présentes dans les adultes, dans les exuvies ainsi que dans les pontes.

Moins de 10 % du plomb contenu dans les larves est retrouvé dans les imagos, qu'il s'agisse des mâles ou bien des femelles (figure 4.8). Les quantités de plomb retrouvées dans les exuvies et les pontes ne permettent pas d'expliquer à elles seules l'élimination du plomb entre le stade larvaire et le stade adulte. En moyenne, 27 et 16 % du plomb présent dans les larves sont mesurés dans les exuvies et les pontes, respectivement.

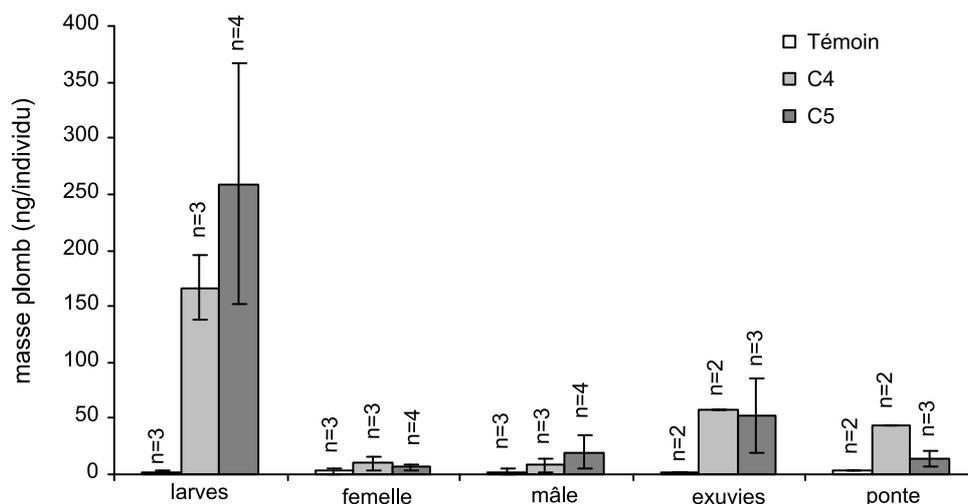


FIGURE 4.8 – Quantité de plomb (ng/individu) contenue dans le corps des larves, dans le corps des adultes mâles, dans le corps des adultes femelles, dans les exuvies et dans les pontes en fonction de la concentration en plomb dans les sédiments

n indique le nombre de répliqués (unités expérimentales) analysés. Les concentrations sédimentaires d'exposition mesurées (moyenne \pm écart-type entre les répliqués) sont les suivantes (mg/kg de MS) : Témoin = $2,2 \pm 0,5$; C4 = $255,8 \pm 17,4$; C5 = $496,1 \pm 24,9$.

4.1.2 Discussion

À l'instar de Roulier *et al.* (2008), nous remarquons une **accumulation du plomb dans le corps des organismes** selon une relation log-log linéaire entre les concentrations sédimentaires et les concentrations bioaccumulées avec un rapport proche de 1. Ce résultat est lié à l'incapacité du chironome à réguler ce métal non essentiel (Krantzberg et Stockes, 1989).

Nous observons également une **relation robuste entre quantité bioaccumulée et quantité de plomb sous forme labile dans l'eau interstitielle**. Cependant, comme le notent Roulier *et al.* (2008), la mesure de la fraction labile ne permet pas de prédire avec plus de précision la quantité de plomb accumulée dans les organismes. En effet, le plomb possède une forte affinité pour les particules ce qui contraint son relargage dans la phase interstitielle du sédiment. En outre, pour son alimentation *Chironomus riparius* ingère des particules sédimentaires. Ainsi, l'accumulation du plomb serait davantage liée à l'ingestion de particules et d'aliments qu'à l'exposition à la fraction labile.

Malgré l'accumulation continue de plomb observée dans le corps des organismes, aucune augmentation significative de la mortalité larvaire n'est relevée pour des concentrations d'exposition inférieures à 500 mg/kg de MS.

Les concentrations en plomb mesurées dans le corps des adultes sont faibles par comparaison à celles mesurées dans le corps des larves. Plus de 90 % du plomb présent dans les larves est éliminé après la métamorphose. Timmermans et Walker (1989) et Groenendijk *et al.* (1999) observent également chez *Chironomus riparius* dont la larve a été exposée à du cadmium, un métal non-essentiel, une élimination supérieure à 90 % après la métamorphose. De même, chez cette espèce exposée à du mercure, un métal non essentiel, Rossaro *et al.* (1986) constatent une élimination de l'ordre de 71 % entre le stade larvaire et l'imago. Janssens de Bisthoven *et al.* (1998c) remarquent également, pour une concentration d'exposition de 500 µg/l de plomb, une élimination supérieure à 70 % chez *Chironomus riparius*. Kosalwat et Knight (1987) observent chez *Chironomus decorus*, une élimination du cuivre, un métal essentiel, entre le stade larvaire et le stade adulte. De même, Bell *et al.* (2004) mesurent une élimination du fluoranthène, un HAP, chez *Chironomus tentans* après la métamorphose. Ainsi, **la métamorphose permettrait aux organismes d'éliminer le plomb accumulé au cours de la phase larvaire**. Une partie de ce métal pourrait être éliminée à travers les exuvies, ce que suggèrent également les travaux de Kosalwat et Knight (1987), Timmermans et Walker (1989) et Bell *et al.* (2004). En effet, nous mesurons du plomb dans les exuvies des organismes exposés. Toutefois, les quantités détectées ne permettent pas à elles seules d'expliquer l'élimination observée. Par ailleurs, comme l'évoquent Timmermans et Walker (1989), l'exuvie flotte à la surface de l'eau ; elle pourrait, par conséquent, avoir accumulé le plomb présent dans la phase aqueuse et inversement avoir perdu du plomb adsorbé. Ainsi, les résultats relevés sont à interpréter avec précaution. De même, nous ne pouvons conclure quant à l'origine du plomb présent dans les pontes : provient-il de la mère ou bien d'un passage de ce métal de l'eau vers la ponte ?

Comme l'ont proposé Timmermans et Walker (1989), nous pouvons cependant penser que l'élimination de ce métal non essentiel est principalement liée à trois phénomènes (figure 4.9) : la mue de l'exosquelette au cours du passage de la larve à la nymphe, la mue de l'exosquelette au cours du passage de la nymphe à l'adulte (exuvie) ainsi que l'excrétion du métal entre le stade larvaire et le stade nymphal par la désintégration cellulaire survenant au cours de la métamorphose. En effet, il a été montré que 90 % du cadmium se trouve dans les tissus du tube digestif du chironome (Postma *et al.*, 1996). De même, Seidman *et al.* (1986) ont montré que de 65 à 80 % du cadmium assimilé par *Chironomus thummi* était mesuré dans la partie postérieure de l'intestin moyen. Sumi *et al.* (1984) ont également constaté qu'une large proportion de cadmium était contenue dans le tube digestif de *Chironomus yoshimatsui*. Ainsi, au cours de la métamorphose, la désintégration de l'appareil digestif (inexistant chez l'adulte) pourrait contribuer à l'élimination des métaux non essentiels. Ceci expliquerait les importantes quantités de cadmium dans les débris de cellules provenant de l'épithélium du tube digestif de *Chironomus thummi* mesurées par Seidman *et al.* (1986). Nous pouvons, en outre, émettre l'hypothèse d'une élimination du plomb chez les femelles par passage de ce toxique dans la substance vitelline : une partie du plomb se retrouverait alors dans les pontes (figure 4.9).

Nous observons une **augmentation statistiquement significative du niveau de MDA** selon une relation dose-réponse dans le corps des larves. Cette observation a été faite à ce jour chez le chironome *Prosilocerus akamusi* (Zheng *et al.*, 2011) en présence de cadmium et chez *Chironomus riparius* en présence de nonylphénol (Lee et Choi, 2006). Le MDA est un marqueur d'effet caractéristique de dommages cellulaires causés par une peroxydation lipidique. En résumé, **le plomb** possède un effet toxique dose-dépendant chez la larve de *Chironomus riparius* :

il est **responsable de dommages cellulaires**.

Nous notons également en présence de plomb dans la matrice sédimentaire, une **augmentation statistiquement significative des concentrations tissulaires en métallothionéines**. Ce résultat est en accord avec les travaux rapportant une augmentation de la concentration en MT en présence de cadmium chez cette même espèce (Gillis *et al.*, 2002 ; Fabrick *et al.*, 2008). Il est aujourd'hui acquis que les MT jouent un rôle essentiel dans la régulation des métaux essentiels (Zn, Cu) ainsi que dans la détoxification des métaux non essentiels (Pb, Cd, Hg) (Fowler, 1987 ; Bonneton, 1994). L'augmentation de la concentration en MT consécutive à l'introduction du plomb permet probablement aux organismes exposés d'assurer le piégeage de la forme ionique toxique du plomb (Petering et Fowler, 1986). Cette séquestration pourrait, toutefois, avoir des répercussions sur le métabolisme courant des métaux essentiels (Fowler, 1987). Zhang *et al.* (2003) a ainsi montré que le cadmium se fixait préférentiellement sur les métallothionéines, entraînant un relargage du zinc fixé sur ces protéines. Cette libération de zinc permettrait alors d'activer la transcription des métallothionéines (Roesijadi, 1994 ; Zhang *et al.*, 2003). Dans ce travail, nous observons, d'une part, une légère augmentation du contenu tissulaire en cuivre et d'autre part, une légère diminution du contenu tissulaire en zinc en présence de plomb.

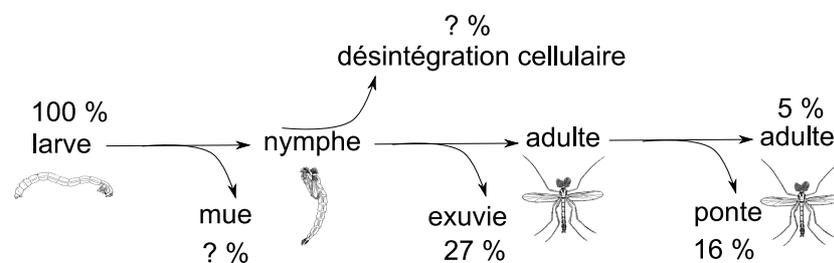


FIGURE 4.9 – Schéma des voies potentielles d'élimination du plomb
Les valeurs reportées correspondent aux valeurs moyennes que nous avons mesuré dans les différents compartiments.

La faible différence de concentrations en MT entre les groupes C4 et C5 pourrait être liée à un début de saturation du système de défense anti-toxique. L'existence de dommages cellulaires amène également à penser que ce système de défense n'est pas suffisant pour contenir les effets délétères du plomb. Par ailleurs, les processus de détoxification mis en place par le chironome pourraient entraîner une consommation d'énergie accrue.

En effet, si l'exposition au plomb, n'a **aucun effet statistiquement significatif sur le contenu tissulaire en protéines**, nous observons, en revanche, une **augmentation statistiquement significative du glycogène et une diminution statistiquement significative des lipides**. En considérant les quantités d'énergie contenues dans les lipides, le glycogène et les protéines établies par Gnaiger (1983), la **quantité moyenne d'énergie par individu contenue dans ses réserves énergétiques diminuent légèrement mais de façon non statistiquement significative entre le groupe témoin et les groupes exposés**. Ce résultat est contraire à celui observé par Graney et Giesy (1968), qui relèvent une diminution importante de la quantité totale d'énergie chez le gammare exposé au pentachlorophénol. Dans notre expérience, l'augmentation tissulaire en glycogène compense la réduction d'énergie inhérente à la diminution des lipides. Ainsi, l'exposition à des concentrations sédimentaires en plomb inférieures à 500 mg/kg de MS ne se traduirait pas par une perte nette d'énergie, ce qu'observent également De Coen et Janssen (1997) chez *Daphnia magna* exposées à de faibles

concentrations en lindane (inférieures à 0,32 mg/l) ou en mercure (inférieures à 5,6 µg/l).

Le **contenu tissulaire en protéines n'est pas significativement affecté** par la présence de plomb. Ce résultat est en accord avec les observations de Choi *et al.* (2001) chez *Chironomus riparius* exposé pendant quatre jours à un insecticide, le fenitrothion, ou bien avec celles de Ha et Choi (2008b) chez *Chironomus riparius* exposé à du plomb pendant 24 heures. De même, Jin-Clark *et al.* (2008) ne relèvent aucune variation du contenu protéique chez *Chironomus tentans* exposé pendant trois jours à un herbicide, l'alachlore. En revanche, Rathore *et al.* (1979) notent chez *Chironomus tentans* une diminution du contenu protéique en présence de cadmium et Jin-Clark *et al.* (2008) en présence de metolachlore, un herbicide qui agirait en bloquant la synthèse protéique. De même, Ortel (1991) observent cet effet chez un hyménoptère alimenté avec une nourriture dopée à 50 mg/kg de plomb. De plus, Graney et Giesy (1968) montrent, chez *Gammarus pseudolimnaeus*, qu'une exposition à long terme au pentachlorophénol (insecticide) entraîne la mobilisation des réserves protéiques. Dans notre travail, bien que nous ayons soumis nos organismes à une exposition longue (16 jours), **les besoins énergétiques inhérents au stress toxique ne requièrent pas la mobilisation des réserves protéiques**. Nous pouvons supposer, comme l'ont suggéré Blazka (1966) et De Coen et Janssen (1997) chez *Daphnia magna*, que bien que les **concentrations d'exposition** soient élevées, elles **ne sont pas suffisantes pour entraîner la mobilisation de ces réserves**. Ainsi, dans le cas d'un stress toxique, *Chironomus riparius* privilégierait, en premier lieu, l'utilisation des réserves non protéiques.

La **concentration en lipides diminue significativement avec l'exposition au plomb**. Ce résultat est en accord avec les travaux de Servia *et al.* (2006) mettant en évidence chez *Chironomus riparius* une diminution des triglycérides (lipides) en présence de cuivre dans la phase sédimentaire. Choi *et al.* (2001) observent également ce phénomène après 24 heures d'exposition à un insecticide. Néanmoins, dans cette même étude, le contenu tissulaire en lipides retrouve son niveau initial au delà de 48 heures d'exposition. Environ 75 % des lipides des larves de *Chironomus* sont des composés non structurels, qui constituent des réserves pour assurer l'activité métabolique des organismes (Choi *et al.*, 2001). Ainsi, **la réduction des lipides, consécutive à l'introduction de plomb, pourrait être liée à l'utilisation d'énergie pour les processus de détoxification**. Par exemple, l'augmentation du contenu en MT résulte d'une activité de synthèse protéique accrue qui exige de l'énergie. Par ailleurs, l'augmentation des dommages des membranes cellulaires lipidiques, mise en évidence grâce à la mesure du MDA, pourrait également se traduire par une diminution du contenu tissulaire en lipides.

La concentration en glycogène augmente significativement avec l'exposition au plomb. Ce résultat est *a priori* surprenant lorsqu'on le compare aux résultats de la littérature qui mettent en évidence une diminution du glycogène en présence d'un stress toxique chez *Gammarus roeseli* (Gismondi *et al.*, 2012b) ou bien chez *Lymnea acuminata* (Tripathi et Singh, 2002). Toutefois, si Choi *et al.* (2001) observent chez *Chironomus riparius* une diminution du contenu en glycogène après 24 heures d'exposition à un insecticide, ils notent également que ce contenu retrouve son niveau initial après 48 heures d'exposition.

L'absence de réduction des réserves glucidiques pourrait être expliquée par la capacité de **la larve du chironome à compenser l'utilisation du glycogène liée au stress toxique grâce à son alimentation**. C'est ce que proposent également Servia *et al.* (2006) pour expliquer le peu de variations des réserves en glycogène après une exposition de 7 et de 9 jours à du sédiment dopé au cuivre chez des larves de *Chironomus riparius* nourries *ad libitum*. En effet, de Hass *et al.* (2004) montrent que lorsque l'on augmente la quantité de nourriture chez

des larves de *Chironomus riparius* exposées à du cuivre, aucun effet sub-létal n'apparaît car les larves sont alors capables de compenser l'utilisation d'énergie inhérente à ce stress. Postma *et al.* (1994) montrent également chez *Chironomus riparius* exposé à des concentrations inférieures à 16,2 µg/l de cadmium, que l'augmentation de la mortalité larvaire participe à un accroissement de la nourriture disponible par individu permettant ainsi aux organismes survivants de compenser les effets négatifs du cadmium. De même, dans les expériences de Campero *et al.* (2008) sur un odonate, le stress toxique appliqué semble être compensé par l'apport de nourriture ; les effets sub-létaux (variations de forme) n'apparaissent que lorsque le stress toxique est combiné à un stress alimentaire.

En outre, **le chironome pourrait privilégier l'utilisation des lipides et non du glycogène** pour lutter contre un stress toxique. Le glycogène constitue, en effet, une réserve importante d'énergie pour les phases de mue et de métamorphose ainsi que pour le stade adulte, au cours duquel le chironome ne s'alimente pas (Hamburger *et al.*, 1996). Afin que l'espèce puisse assurer sa reproduction, il est par conséquent indispensable que la larve présente, au 4^{ème} et dernier stade, un niveau suffisant de glycogène.

L'augmentation statistiquement significative des réserves en glycogène pourrait être expliquée par une **diminution** de l'activité larvaire, et en particulier de l'activité **de bioturbation**¹, des organismes. En effet, il a été constaté une diminution de la bioturbation, mesurée *via* la turbidité de l'eau surnageante, chez *Chironomus tentans*, en présence de concentrations croissantes en cuivre, fluoranthène, bisphénol A, caféine ou fluoxétine (Cho, 2005). De même, en présence de lindane, Hirthe *et al.* (2001) constatent chez *Chironomus riparius* une diminution de cette activité. En outre, vanderZandt *et al.* (1994) montrent que l'activité de *Chironomus riparius*, enregistrée par une conversion des mouvements des larves en champs électrique, diminue en présence de polluants industriels.

De plus, comme l'ont montré Berni *et al.* (2009) chez un diptère exposé à un insecticide, l'augmentation des réserves en glycogène pourrait être liée à **l'altération du catabolisme du glycogène**.

La consommation énergétique accrue, en particulier de lipides, en présence de plomb dans la phase sédimentaire, pourrait s'accompagner d'une diminution de l'énergie allouée à la croissance. Néanmoins, nous n'avons observé aucune variation statistiquement significative de la masse larvaire entre le groupe témoin et les groupes exposés. De même, chez *Chironomus tentans*, pour des concentrations d'exposition inférieures à 5000 mg/kg de MS, Bird *et al.* (1995) n'ont pas relevé de différences statistiquement significatives de longueur entre le groupe témoin et les groupes exposés.

En résumé, les effets du plomb sur la biochimie de *Chironomus riparius* pourraient être schématisés par la figure 4.10. Dans des travaux ultérieurs, il s'avérerait, en outre, intéressant de mesurer les paramètres comportementaux de la larve, tels que l'alimentation, la locomotion et l'activité de bioturbation, afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses émises précédemment.

1. Mélange actif du sédiment ou de l'eau par un organisme vivant.

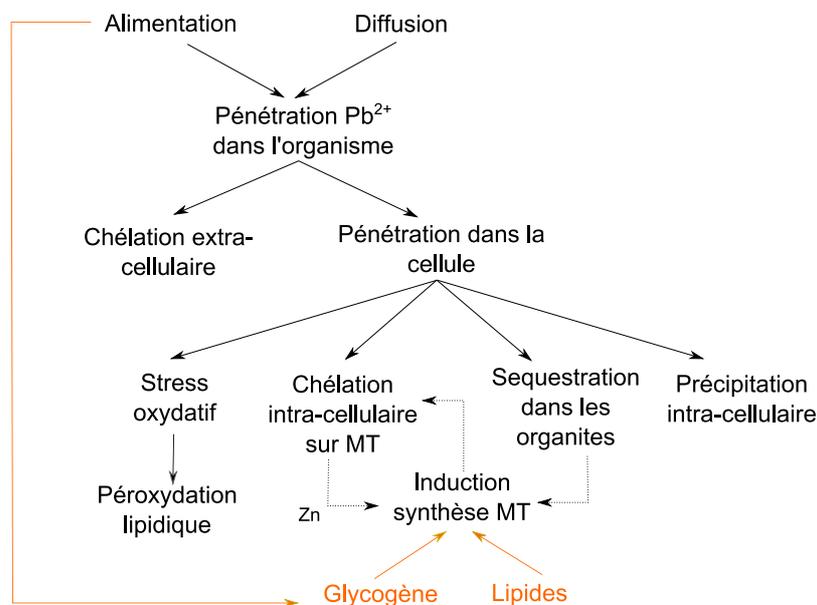


FIGURE 4.10 – Schéma des effets du plomb sur la biochimie de *Chironomus riparius* pour des concentrations d'exposition inférieures à 500 mg/kg de MS

Schéma réalisé d'après les travaux de Petering et Fowler (1986), Fowler (1987), Timmermans *et al.* (1992) et Zhang *et al.* (2003) ainsi que d'après les résultats obtenus dans ce travail. En orange, les effets sur les réserves énergétiques.

Ces résultats mettent en évidence, pour des concentrations d'exposition en plomb variant entre 3 et 500 mg/kg de MS :

1. une accumulation du plomb selon une relation log-log linéaire entre les concentrations sédimentaires et les concentrations accumulées dans le corps des larves ;
2. une élimination du plomb au cours de la métamorphose ;
3. un effet sur la larve se manifestant par une augmentation des dommages cellulaires, un accroissement des concentrations en métallothionéines et une diminution des lipides ;
4. aucun effet sur la croissance ni sur la mortalité des organismes.

La consommation d'énergie en présence de plomb pourrait s'accompagner d'une diminution de l'énergie allouée au développement larvaire. En outre, la présence de ce métal toxique pourrait perturber les mécanismes de contrôle et de régulation du développement. Des variations morphologiques pourraient alors apparaître. Par conséquent, nous avons testé, dans la partie suivante, si pour cette gamme de concentrations d'exposition, des variations phénotypiques du mentum apparaissaient chez la larve.

4.2 L'exposition à un toxique a-t-elle un effet sur la forme du mentum ?

Dans cette partie, nous discutons l'hypothèse selon laquelle l'exposition à un toxique favorise l'apparition de variations phénotypiques du mentum chez *Chironomus riparius*. D'une part, nous avons étudié les effets du plomb, testé dans la gamme de concentration induisant un effet au niveau de la biochimie (cf. partie 1 du chapitre 4). D'autre part, nous avons mesuré l'action d'un perturbateur endocrinien, le 4-NP.

4.2.1 Résultats

4.2.1.1 Suivi des paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques (pH, température, oxygène dissous, conductivité et concentration en nitrites) ne diffèrent pas de façon statistiquement significative entre les différentes unités expérimentales (test de Mann-Whitney-Wilcoxon deux à deux avec ajustement de Holm, $p > 0,05$). Nous notons cependant que le coefficient de variation (CV) de la conductivité pour les essais portant sur le 4-NP est élevé. Ceci est lié à l'augmentation de ce paramètre au cours du temps. Ces essais ayant été conduits au cours de périodes plus chaudes, ce résultat pourrait être expliqué par une évaporation de l'eau supérieure. Nous observons visuellement pour les deux concentrations d'exposition en 4-NP les plus élevées (C3 et C4), un mélange moindre du sédiment. Le 4-NP pourrait ainsi agir en limitant l'activité de bioturbation des larves.

TABLEAU 4.2 – Moyennes et variations des paramètres physico-chimiques au cours des essais

	Pb				4-NP			
	1 ^{er} essai	CV (%)	2 ^d essai	CV (%)	1 ^{er} essai	CV (%)	2 ^d essai	CV (%)
Température (°C)	15,1 ± 0,3	2	15,0 ± 0,3	2	15,0 ± 0,7	4	14,7 ± 0,4	2
pH	8,1 ± 0,1	1	8,1 ± 0,3	3	8,1 ± 0,2	2	8,2 ± 0,1	2
Conductivité (µS/cm)	461 ± 38	8	407 ± 33	7	555 ± 86	15	510 ± 90	19
Oxygène dissous (mgO ₂ /l)	9,0 ± 0,8	9	7,9 ± 0,4	5	7,7 ± 0,7	6	7,7 ± 0,5	6
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,3 ± 0,4	nd	0,0 ± 0,1	nd	1,6 ± 1,8	nd	0,5 ± 0,9	nd

nd : non déterminé car la plupart des valeurs sont inférieures à la limite de quantification (0,5 mg/l).

Pour les concentrations en plomb étudiées, aucune variation statistiquement significative de la mortalité larvaire n'a été observée (cf. 4.1.1.3). Pour l'essai portant sur le nonylphénol, les taux d'émergence ont été évalués pour les groupes témoin-2, C2-NP et C4-NP. Par rapport au groupe témoin, ce taux est significativement inférieure pour le groupe soumis à la concentration C4 (test des proportions unilatéral, $\chi^2=85$, $df=1$, $p \leq 0,05$) ; il passe, en effet en moyenne, de 76 à 17 %.

4.2.1.2 Concentrations d'exposition et bioaccumulation

Les concentrations moyennes en plomb dans la matrice solide varient entre 3,0 mg/kg de MS pour le groupe témoin et 456,9 mg/kg de MS pour le groupe C₅ (tableau 4.3). Ces concentrations correspondent à une fraction moyenne labile dans l'eau interstitielle variant de moins de

TABLEAU 4.3 – Concentrations moyennes en plomb et en 4-NP dans les différents compartiments et écart-types entre les trois réplicats

	$C_{\text{sédiments}}$	$C_{\text{sédiments}}$	$C_{\text{eau interstitielle}}$	C_{eau}	C_{eau}	C_{larves}
	(mg/kg MS)	(mg/kg MS)	($\mu\text{g/l}$) intégrée sur la durée de l'essai	($\mu\text{g/l}$)	($\mu\text{g/l}$)	(mg/kg MS)
	début	fin		début	fin	fin
Témoin 1-Pb	$3,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$	$0,1^1$	< 1	< 1	$2,0 \pm 0,6$
Témoin 2-Pb	$3,0 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,0$	< 1	< 1	$1,3 \pm 0,3$
C1-Pb	$18,1 \pm 1,8$	$21,2 \pm 0,4$	$1,5^1$	$10,2 \pm 1,6$	$13,7 \pm 1,4$	$13,9 \pm 2,8$
C2-Pb	$46,4 \pm 2,4$	$51,1 \pm 7,3$	$3,1^1$	$11,0 \pm 5,6$	$19,0 \pm 3,9$	$40,2 \pm 10,4$
C3-Pb	$112,8 \pm 7,9$	$145,6 \pm 12,0$	$11,8^1$	$71,3 \pm 32,6$	$83,5 \pm 13,5$	$115,3 \pm 24,7$
C4-Pb	$220,5 \pm 28,2$	$266,7 \pm 40,0$	$13,4 \pm 2,1$	$21,8 \pm 5,1$	$24,0 \pm 7,6$	$168,7 \pm 44,3$
C5-Pb	$456,9 \pm 65,1$	$432,0 \pm 64,5$	$35,3 \pm 0,5$	$93,5 \pm 64,8$	$40,0 \pm 4,9$	$272,9 \pm 99,4$
Témoin 1-NP	$0,5 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,0$	$0,0^2$	nd	$1,4 \pm 0,5$	$2,5 \pm 4,2$
Témoin 2-NP	$0,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,6$	$4,3 \pm 1,9$
C1-NP	$67,1 \pm 8,3$	$81,2 \pm 11,5$	$20,5^2$	nd	$19,2 \pm 0,7$	nd
C2-NP	$115,4 \pm 6,7$	$103,2 \pm 15,7$	$23,1 \pm 3,9$	$74,3 \pm 8,0$	$22,1 \pm 5,6$	$2,9 \pm 1,1$
C3-NP	$184,6 \pm 19,2$	$169,5 \pm 13,7$	$37,1^2$	nd	$50,5 \pm 8,1$	$16,0 \pm 3,1$
C4-NP	$198,8 \pm 25,3$	$176,8 \pm 8,6$	$28,6 \pm 3,2$	$123,4 \pm 56,2$	$66,8 \pm 4,1$	$12,6 \pm 2,4$

1 : une seule valeur.

2 : moyenne de deux valeurs.

nd : non déterminé.

1 $\mu\text{g}/\text{l}$ à 35,3 $\mu\text{g}/\text{l}$. La concentration en plomb sédimentaire est restée constante tout au long de l'essai. Comme nous l'avons détaillé dans la partie précédente (cf. partie 1 du chapitre 4), les larves accumulent le plomb linéairement dans leurs corps.

Les concentrations sédimentaires en 4-NP varient entre 0,5 mg/kg de MS pour le groupe témoin et 184,6 mg/kg de MS pour le groupe C4, ce qui correspond à des concentrations dissoutes dans l'eau interstitielle variant entre 0,05 et 37,1 $\mu\text{g}/\text{l}$. Nous notons une diminution des concentrations d'exposition au cours du temps dans la phase aqueuse de l'ordre de 70 % et 60 % en 20 jours pour les concentrations d'exposition C2 et C4. Dans la phase sédimentaire, cette réduction varie entre 8 et 17 %². L'accumulation de 4-NP dans le corps des organismes ne devient statistiquement significative que pour les concentrations C3 (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, $W=0$, $p \leq 0,05$) et C4 (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, $W=0$, $p \leq 0,05$).

4.2.1.3 Taux de phénodéviation du mentum

La fréquence de phénodéviantes varie entre 2,1 et 8,6 % (figure 4.11). Elle ne varie pas de façon statistiquement significative entre les différents groupes étudiés ni pour les essais portant sur le plomb ni pour ceux portant sur le 4-NP (test des proportions deux à deux, tous les $p > 0,05$). Néanmoins, nous notons un taux relativement élevé pour le groupe C4-NP.

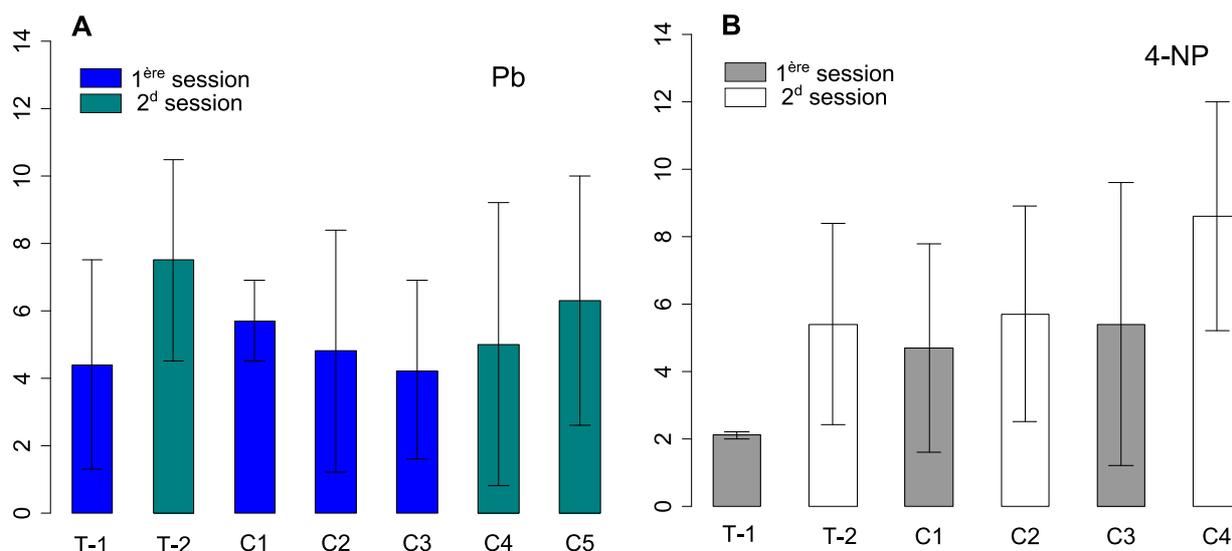


FIGURE 4.11 – Fréquence moyenne de phénodéviantes (%) en fonction des concentrations d'exposition en plomb et en 4-NP et écart-type entre les trois réplicats
A : essais au plomb, B : essais au 4-NP.

De même, les scores calculés selon les pondérations établies par Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) (annexe 1) varient peu en fonction des concentrations d'exposition (tableau 4.4).

Le taux de phénodéviantes est élevé pour les groupes témoins. Les phénodéviantes observées touchent essentiellement les dents extérieures ; elles consistent en une absence ou bien un ajout d'une dent (tableau 4.4). Des phénomènes de fusions de dents apparaissent chez les groupes exposés aux toxiques, excepté pour les groupes C5-Pb et C1-NP.

². cf. annexe 4 pour obtenir les concentrations en 4-NP dans les phases aqueuse et sédimentaire après 47 jours.

TABLEAU 4.4 – Pourcentage moyen de phénodéviants et type de phénodéviation observées

	effectif total	phénodéviants ajout (%)	dent (%)	absence dent (%)	fusion dents (%)	score ¹
Témoin 1-Pb	165	4,2	0,6	3,6	0,0	27
Témoin 2-Pb	123	7,3	2,4	4,9	0,0	77
C1-Pb	209	5,7	0,5	3,8	1,4	36
C2-Pb	162	4,9	0,6	3,7	0,6	34
C3-Pb	195	4,1	0,5	3,1	0,5	25
C4-Pb	119	5,0	1,7	3,4	0,0	44
C5-Pb	129	6,3	0,8	3,9	1,6	35
Témoin 1-NP	144	2,1	0,7	1,4	0,0	23
Témoin 2-NP	147	5,4	1,4	4,1	0,0	49
C1-NP	147	4,8	4,1	0,7	0,0	90
C2-NP	141	5,7	1,4	2,8	1,4	56
C3-NP	147	5,4	1,4	2,7	1,4	49
C4-NP	119	8,4	0,8	6,7	0,8	45

1 : d'après Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b).

4.2.1.4 Niveaux d'AF de longueur du momentum

Une représentation graphique de la différence entre côté droit et côté gauche met en évidence une distribution normale des données et ce quel que soit le réplikat considéré. En outre, les valeurs du coefficient de dissymétrie proches de zéro confirme la normalité des distributions (tableau 4.5). Les valeurs de Kurtosis indiquent une distribution de type mésokurtique, et par conséquent l'absence de phénomènes d'AA.

TABLEAU 4.5 – Caractéristiques moyennes de la différence entre côté droit et côté gauche et écart-type entre les trois réplikats

	effectif	$\ln(D)-\ln(G)$ (μm)	coeff. dissymétrie	Kurtosis
Témoin 1-Pb	31 ± 7	-3,4 ± 17,3	-0,7 ± 0,4	0,2 ± 0,3*
Témoin 2-Pb	32 ± 2	-7,5 ± 10,0	0,3 ± 0,2	-0,6 ± 0,4*
C1-Pb	30 ± 6	4,3 ± 14,1	0,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0*
C2-Pb	22 ± 11	-4,4 ± 1,9	0,0 ± 0,1	-0,2 ± 1,2*
C3-Pb	31 ± 3	-7,8 ± 1,6	-0,1 ± 0,3	-0,5 ± 0,2*
C4-Pb	31 ± 8	-5,3 ± 8,5	-0,2 ± 0,3	-0,4 ± 0,4*
C5-Pb	37 ± 1	-12,5 ± 8,5	0,5 ± 0,4	0,1 ± 1,3*
Témoin 1-NP	33 ± 3	6,7 ± 9,5	-0,2 ± 0,5	-0,5 ± 0,3*
Témoin 2-NP	34 ± 5	1,2 ± 14,4	-0,3 ± 0,1	-0,4 ± 0,4*
C1-NP	35 ± 4	-8,4 ± 9,9	-0,2 ± 0,3	-0,4 ± 0,3*
C2-NP	35 ± 1	-5,6 ± 9,8	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,6*
C3-NP	32 ± 2	-0,6 ± 8,8	0,3 ± 0,4	-0,6 ± 0,6*
C4-NP	29 ± 6	-15,8 ± 3,8	-0,0 ± 0,4	-0,1 ± 0,4*

* : valeurs significativement inférieures aux valeurs critiques de platykurtosis et de leptokurtosis (Palmer et Strobeck, 2003).

La répétabilité est supérieure à 96 % (tableau 4.6). En outre, la variance liée à l'interaction côté-individu est significativement supérieure à celle liée au côté (test F, tous les $p > 0,05$), ce qui suggère l'absence d'AD. Il est à noter qu'il n'existe pas de corrélation entre l'asymétrie et

la longueur du trait étudié (test de Spearman, tous les $p > 0,05$). Compte tenu de ces résultats, nous pouvons conclure que les asymétries observées consistent en des AF. L'effet individu ainsi que l'effet de l'interaction côté-individu sont significatifs (test F, tous les $p \leq 0,05$) (tableau 4.6). Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableaux 4.41 et 4.42).

TABLEAU 4.6 – Résultats de l'ANOVA mixte sur la longueur du mentum

ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante. Valeurs moyennes et écart-types entre les trois réplicats.

carré moyen :	côté (10^{-3})	individu (10^{-3})	côté x individu (10^{-3})	erreur de mesure (10^{-3})	ME5 (%)	AF10. (10^{-2})
Témoin 1-Pb	5,7±4,8	11,3±3,6*	2,9±0,4*	0,03±0,00	98±0	4,3±0,3
Témoin 2-Pb	3,6±5,6	24,4±2,8*	2,7±0,3*	0,04±0,01	97±1	4,1±2,4
C1-Pb	0,6±0,4	16,6±1,7*	2,5±0,5*	0,03±0,00	97±1	3,9±0,4
C2-Pb	3,5±1,9	14,3±7,1*	3,1±0,7*	0,05±0,01	97±0	4,4±0,5
C3-Pb	2,0±1,0	15,8±4,1*	3,0±0,2*	0,04±0,01	97±1	4,3±0,2
C4-Pb	2,1±2,4	20,0±4,2*	2,8±0,9*	0,04±0,01	97±1	4,2±0,7
C5-Pb	7,6±7,5	19,3±5,0*	3,3±1,1*	0,04±0,00	98±1	4,5±0,8
Témoin 1-NP	3,2±0,6	21,9±0,9*	3,0±0,6*	0,03±0,01	98±1	4,3±0,4
Témoin 2-NP	4,4±3,5	17,6±1,5*	3,0±0,9*	0,05±0,01	96±2	4,3±0,7
C1-NP	4,4±4,9	18,7±4,7*	2,8±0,3*	0,04±0,01	97±1	4,1±0,2
C2-NP	3,4±5,5	17,4±0,6*	2,8±0,4*	0,04±0,01	97±1	4,2±0,3
C3-NP	1,5±1,9	22,3±5,0*	2,5±0,6*	0,03±0,00	98±0	3,9±0,5
C4-NP	7,1±2,2	17,5±6,5*	2,6±0,2*	0,04±0,00	97±1	4,1±0,2

* : effets significatifs (test F, $p \leq 0,05$).

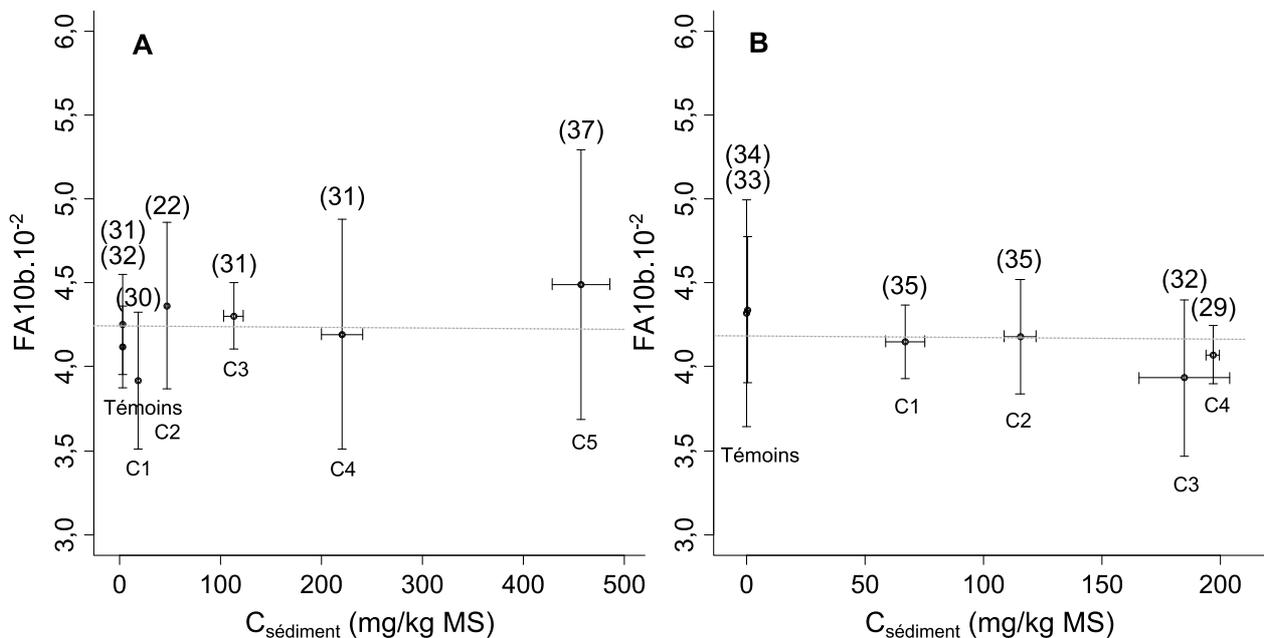


FIGURE 4.12 – Variation de l'indice d'AF de longueur en fonction des concentrations d'exposition

A : essais au plomb et B : essais au 4-NP. Moyenne et écart-type entre les trois réplicats. Entre parenthèses, effectif moyen entre les trois réplicats. Ligne en pointillés : valeur moyenne de l'indice AF10b.

Il n'existe aucune différence statistiquement significative en terme de niveau d'AF de longueur entre les différents groupes exposés (test F, tous les $p > 0,05$). Cet indice, que ce soit pour les essais au plomb ou bien au 4-NP, varie autour d'une valeur moyenne de $4,2 \cdot 10^{-2}$ (figure 4.12).

4.2.1.5 Niveaux d'AF de forme du mentum

Aucune variation statistiquement significative de la taille centroïde n'est observée (test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec ajustement de Holm, tous les $p > 0,05$). La taille centroïde moyenne des groupes étudiés varie entre 330 et 345 μm (figure 4.13).

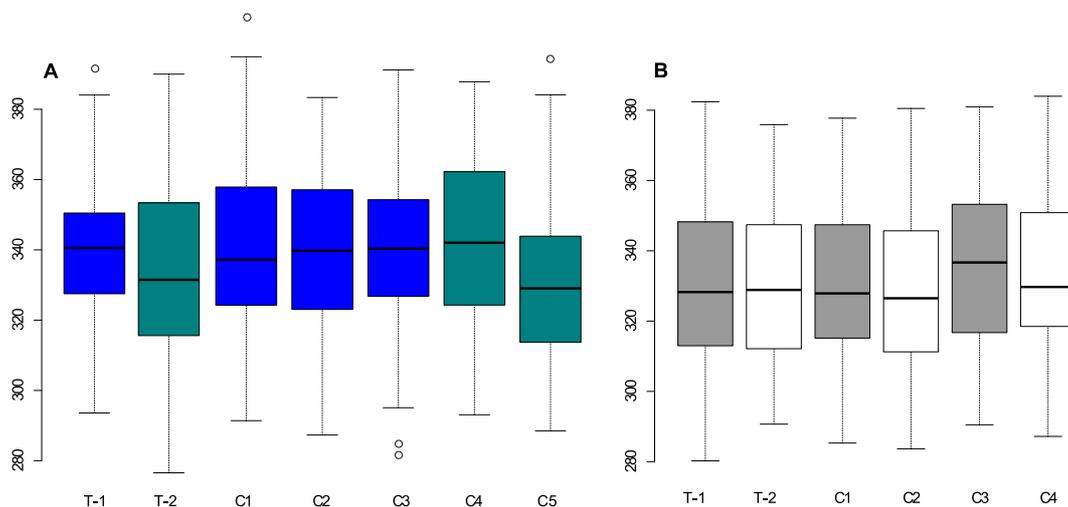


FIGURE 4.13 – Tailles centroïdes du mentum (μm) en fonction des concentrations d'exposition
 A : essais au plomb et B : essais au 4-NP. Les couleurs indiquent les différentes sessions d'essai, voir légende figure 4.11. Le trait épais indique la valeur médiane. La boîte à moustache s'étend du quartile 0,25 au quartile 0,75 et les moustaches jusqu'aux valeurs distantes d'au maximum 1,5 fois la distance interquartile. Les points représentent les valeurs qui se situent au delà de cette distance.

La représentation graphique des vecteurs d'asymétrie met en évidence l'absence de phénomène d'AA. En outre, aucune corrélation entre la taille et l'asymétrie n'a pu être détectée (test de permutation, tous les $p > 0,05$). La répétabilité est supérieure à 90 % (tableau 4.7), ce qui suggère que l'erreur de mesure est faible par comparaison au phénomène d'AF. Pour les essais portant sur le 4-NP, nous observons un phénomène d'AD pour le groupe soumis à la concentration C3 (MANOVA, $\text{Tr.Pillai}=0,49$, $p \leq 0,05$). En ce qui concerne les essais portant sur le plomb, une AD est détectée chez les groupes témoin 1 (MANOVA, $\text{Tr.Pillai}=0,43$, $p \leq 0,05$), C4 (MANOVA, $\text{Tr.Pillai}=0,66$, $p \leq 0,05$) et C5 (MANOVA, $\text{Tr.Pillai}=0,48$, $p \leq 0,05$). Ce phénomène d'AD est courant chez les insectes (Pelabon et Hansen, 2008). Compte tenu de ces résultats, nous ne pouvons pas conclure que les asymétries observées dans ces groupes sont uniquement des AF. Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableaux 4.43 et 4.44).

L'indice de forme varie peu (tableau 4.7). Toutefois, une augmentation significative est détectée pour le groupe C5-Pb (test F, $F_{2097,1742}=1,09$, $p \leq 0,05$). En outre, une diminution de cet indice est observée pour la concentration C3-NP (test F, $F_{2148,2350}=1,09$, $p \leq 0,05$). Les valeurs d'AF de forme fluctuent autour d'une valeur moyenne de $4,2 \cdot 10^{-3}$, qu'il s'agisse des essais portant sur le plomb ou bien sur le 4-NP.

TABLEAU 4.7 – Résultats de l'ANOVA mixte sur la forme du mentum
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	côté x individu (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	AF10. 10^{-3}
Témoin 1-Pb	93	3,1*	6,4*	3,0*	0,09	94	4,3
Témoin 2-Pb	73	4,3	6,3*	2,8*	0,15	90	4,1
C1-Pb	87	2,7	7,7*	2,7*	0,09	94	4,1
C2-Pb	65	10,5	6,4*	3,1*	0,09	94	4,4
C3-Pb	92	4,8	6,7*	2,7*	0,09	93	4,1
C4-Pb	61	3,4*	5,1*	2,9*	0,12	92	4,2
C5-Pb	85	7,0*	6,6*	3,2*	0,12	93	4,4*
Témoin 1-NP	95	3,0	6,3*	2,8*	0,11	93	4,2
Témoin 2-NP	91	2,8	6,4*	3,1*	0,14	91	4,3
C1-NP	95	6,9	6,0*	2,9*	0,10	94	4,2
C2-NP	102	6,9	7,0*	3,0*	0,13	92	4,3
C3-NP	87	3,5*	5,7*	2,5*	0,09	93	3,9*
C4-NP	85	13,4	8,0*	3,1*	0,14	91	4,3

* : l'influence du facteur est significative (test F, $p \leq 0,05$).

4.2.1.6 Forme moyenne du mentum

La projection des groupes sur les deux premiers axes de l'Analyse Canonique de la Variance (ACV), permet de mettre en évidence une séparation claire entre les deux sessions d'essais sur l'axe 1 (figure 4.14). En particulier, les groupes témoins, soumis aux mêmes caractéristiques, se séparent. L'effet du toxique est détecté sur l'axe 2.

Pour les essais portant sur le plomb, le premier axe représente 78 % de la variation totale observée (figure 4.14). La superposition des individus extrêmes selon cet axe permet de mettre en évidence des menta plus courbés pour la première session. En ce qui concerne la première session, une différence significative de la forme moyenne est détectée entre le groupe témoin et les groupes C1 (distance procuste=0,01, test de permutation, $p \leq 0,05$) et C3 (distance procuste=0,01, test de permutation, $p \leq 0,05$). Toutefois, cette différence n'est pas perceptible sur les deux premiers axes de l'ACV (figure 4.14). Pour la seconde session, le deuxième axe (8 % de la variance) permet, au contraire, de séparer le groupe témoin du groupe stressé C5 (distance procuste=0,03, test de permutation, $p \leq 0,05$).

Pour les essais portant sur le 4-NP, le premier axe (67 % de la variance) sépare également les deux sessions d'essai (figure 4.14). L'effet du toxique est quant à lui détecté sur l'axe 2, qui représente 17 % de la variance totale observée. Toutefois, cet effet n'est significatif que pour les groupes C2 (distance procuste=0,01, test de permutation, $p \leq 0,05$) et C4 (distance procuste=0,01, test de permutation, $p \leq 0,05$) appartenant à la deuxième session d'essai.

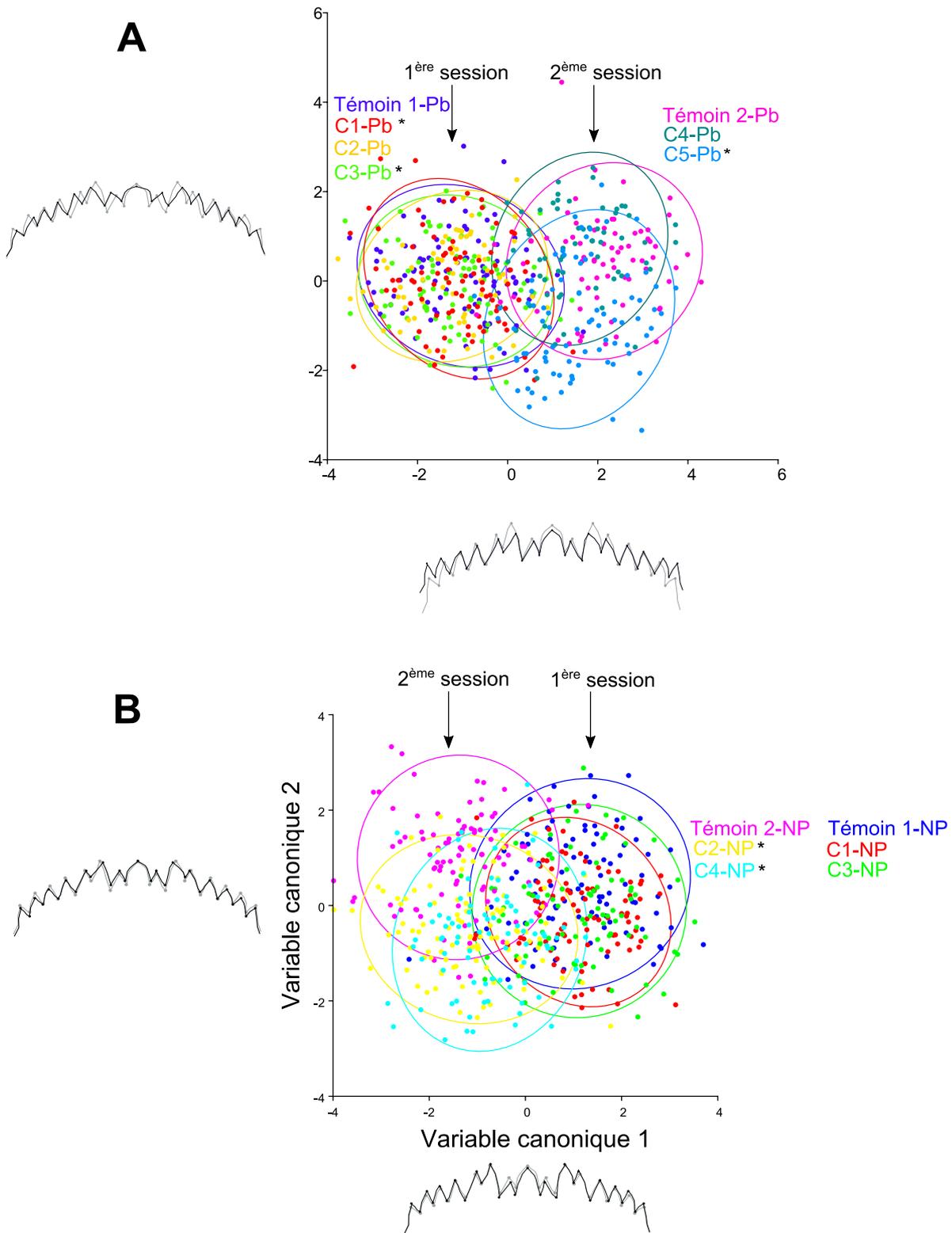


FIGURE 4.14 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé pour les essais au plomb (A) et au 4-NP (B)

Les ellipses représentent les ellipses de confiance à 90 % de chaque groupe. Variations de forme le long de chaque axe par superposition des individus extrêmes : les menta en gris représentent le côté négatif des axes, ceux en noir, le côté positif.* : distance procuste entre groupe témoin et groupe stressé statistiquement significative (test de permutation, $p \leq 0,05$).

L'effet du toxique sur la forme du mentum des organismes appartenant à la seconde session de l'essai au 4-NP est confirmé par une ACV portant uniquement sur cet essai (figure 4.15). Le premier axe met clairement en évidence une séparation entre le groupe témoin et les groupes exposés.

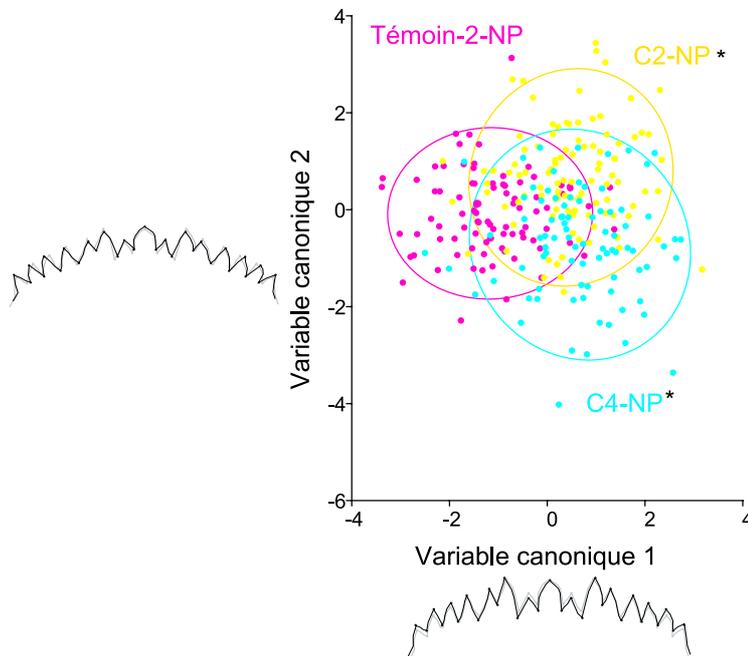


FIGURE 4.15 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé pour la seconde session de l'essai au 4-NP cf. légende précédente.

4.2.2 Discussion

Malgré l'accumulation de toxiques dans le corps des organismes étudiés, nous n'observons **ni de variations significatives du taux de phénodéviation ni du niveau d'AF de longueur**, et ce pour des concentrations d'exposition variant entre 3,3 et 456,9 mg/kg de MS en plomb ou entre 0,5 à 198,8 mg/kg de MS en 4-NP. Ce résultat est surprenant compte tenu des effets biochimiques (augmentation des concentrations en MT, augmentation des dommages cellulaires et diminution du contenu en lipides) mis en évidence dans la partie précédente (cf. partie 1 du chapitre 4), pour cette même gamme de concentrations d'exposition au plomb. En outre, Meregalli *et al.* (2001) relèvent, à la différence de nos travaux, une augmentation statistiquement significative des phénodéviation du mentum chez *Chironomus riparius* exposé à 100 µg/l de nonylphénol. Le fait que nous n'observions pas ce résultat pour une concentration d'exposition de 123 µg/l (C4) pourrait être expliqué d'une part, par l'utilisation d'un composé légèrement différent : du 4-NP et non pas, comme Meregalli *et al.* (2001), du 4n-NP qui est un isomère linéaire. D'autre part, la souche utilisée par Meregalli *et al.* (2001) semble être particulièrement sujette aux phénodéviation ; ils observent, en effet, une fréquence d'anomalies morphologiques de 18 % en moyenne dans le groupe témoin.

Les phénodéviation observées dans ce travail consistent pour l'essentiel en des ajouts et des suppressions de dents dans la zone externe du mentum. Ce type de phénodéviation existe aussi bien dans les groupes témoins que dans les groupes exposés (Janssens de Bisthoven *et al.*, 2001),

ce qui suggère une origine génétique et non environnementale. De plus, le taux de phénodéviants relevé dans les groupes témoins varie entre 2,1 et 7,3 %. Il est supérieur aux taux généralement observés dans les stations de référence du milieu naturel (Wiederholm, 1984 ; Madden *et al.*, 1992 ; Bird, 1994). Ce résultat suggère que notre population de laboratoire est soumise à un stress génétique (consanguinité) (Bird *et al.*, 1995). La fréquence de phénodéviants mesurée dans les groupes témoins est néanmoins inférieure à celles mises en évidence par Vermeulen *et al.* (1998), Meregalli *et al.* (2001) et Langer-Jaesrich *et al.* (2010) sur des souches de *Chironomus riparius* de laboratoire, ce qui nous amène à penser que ce stress demeure relativement limité dans nos expériences.

Nous constatons l'existence de fusion de dents uniquement pour les groupes stressés (ce qu'ont également observé Park et Kwak (2008)), ce qui suggère que l'exposition au plomb ou bien au 4-NP induit ce type de phénodéviations. Par conséquent, il semble important, comme le soulignent Janssens de Bisthoven *et al.* (1998c), de séparer les phénodéviations liées à une exposition toxique de celles constituant le bruit de fond. La diminution du taux de dents fusionnées pour le groupe C4-NP pourrait être le résultat d'une pression de sélection favorisant la survie des individus phénotypiquement plus stables (Dias *et al.*, 2008). En effet, le taux d'émergence décroît pour cette concentration, passant en moyenne de 76 % à 17 % ; diminution qui pourrait être imputée à une mortalité larvaire.

Plusieurs travaux rapportent l'existence d'AF au niveau du pecten (Clarke, 1993a ; Groenendijk *et al.*, 1998), des antennes (Servia *et al.*, 2004) et du mentum (Al-Shami *et al.*, 2011b) chez des organismes appartenant au genre *Chironomus* et provenant de milieux pollués. Dans ce travail, au contraire, aucun effet n'est observé ni sur la fréquence de phénodéviants ni sur le niveau d'AF de longueur du mentum. Cette observation est confirmée par l'étude des AF de forme du mentum qui ne permet de détecter que de faibles variations. Quatre hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la **faible réponse des biomarqueurs de forme étudiés**.

Premièrement, le chironome, et en particulier *Chironomus riparius* pourrait être peu sensible à un stress toxique. En d'autres termes, l'espèce modèle choisie ne serait pas adaptée à la mise en évidence d'une pression toxique. En effet, malgré les avantages importants que présente notre organisme modèle - abondance dans le milieu naturel et facilité d'élevage - celui-ci a développé des mécanismes lui permettant de coloniser des milieux perturbés. Ainsi, il peut survivre dans des environnements fortement contaminés au plomb (Bird *et al.*, 1995 ; Lagrana *et al.*, 2010) grâce, en particulier, au piégeage de ce métal non essentiel dans les métallothionéines. C'est ainsi que nous avons pu constater, dans la partie précédente, l'augmentation de la quantité de métallothionéines en présence de plomb dans la phase sédimentaire. En outre, il est capable de réguler ou bien de contrôler l'absorption de certains métaux lourds tels que le nickel, le zinc, le manganèse et le cuivre (Krantzberg et Stokes, 1989). La larve de chironome pourrait également être capable, comme certains poissons (Thibault *et al.*, 2000 ; Hugues et Gallagher, 2004) ou bien comme la limnée (Thibault *et al.*, 2000), de métaboliser le nonylphénol. En effet, son accumulation ne devient significative qu'à partir de concentrations sédimentaires d'exposition de 184,8 mg/kg de MS. De plus, les concentrations mesurées dans les organismes demeurent inférieures aux concentrations mesurées dans l'eau et la phase sédimentaire. Ce phénomène est également observé par Mäenpää et Kukkonen (2006) chez *Lumbriculus variegatus*, un oligochète, exposé à des concentrations similaires. Toutefois, ces mécanismes de contrôle, de régulation et de résistance que met en place la larve de chironome s'avèrent énergétiquement coûteux (cf. partie 1 du chapitre 4). De plus, ils pourraient ne pas être suffisants pour contenir les effets délétères des composés toxiques sur les mécanismes de contrôle et de régulation du développement. Des variations phénotypiques pourraient alors apparaître. C'est ce que laisse

supposer une revue de la littérature : les variations morphologiques du mentum de *Chironomus riparius* augmentent avec l'exposition toxique (Groenendijk *et al.*, 1998 ; Servia *et al.*, 1998 ; Vermeulen *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la souche étudiée pourrait avoir acquis une certaine tolérance aux polluants étudiés. Néanmoins, nos organismes n'ont pas été exposés au plomb et au 4-NP depuis plusieurs années. Il est ainsi peu probable que cette souche ait conservé des mécanismes de résistance qui lui sont énergétiquement coûteux. De plus, Nowak *et al.* (2007) montrent, au contraire, qu'une population de *Chironomus riparius* maintenue en laboratoire perd en diversité génétique ce qui la rend plus sensible à un stress environnemental que des populations provenant du milieu naturel.

Deuxièmement, le trait étudié - le mentum - pourrait ne pas être sensible à un stress toxique. En effet, la réponse observée est largement dépendante du trait étudié (Clarke, 1998 ; Bonada *et al.*, 2005). Par exemple, dans une rivière polluée par des rejets urbains et industriels, Servia *et al.* (2004) observent une augmentation des AF sur les antennes de *Chironomus riparius* mais pas sur le mentum. En effet, les structures d'un même organisme présentent différents degrés de stabilité de développement (Clarke, 1998). Il se pourrait ainsi que le mentum présente une stabilité supérieure à celle des antennes du fait de son importance pour le maintien de l'espèce (alimentation) et soit, par conséquent, peu sensible aux variations environnementales. Toutefois, en laboratoire, plusieurs travaux ont montré chez la larve de *Chironomus riparius* que le mentum était une des structures les plus sensibles à une exposition toxique (Meregalli *et al.*, 2001 ; Watts *et al.*, 2003).

Troisièmement, le stade étudié pourrait être peu sensible, c'est à dire plus stable en terme de développement, que les stades larvaires précédents ou bien que le stade adulte. Ainsi, l'observation d'un stade de développement inadéquat pourrait expliquer les faibles réponses observées. D'une part, les AF pourraient apparaître après la métamorphose, qui est un mécanisme nécessitant une dépense énergétique importante (Heyland et Moroz, 2006). Toutefois, si Campero *et al.* (2008) observent une augmentation du niveau d'AF chez un odonate après sa métamorphose, ils constatent, en outre, que la différence en terme d'AF entre le groupe témoin et le groupe stressé mise en évidence sur la larve disparaît. Piscart *et al.* (2005) observent, quant à eux, que le niveau d'AF reste constant entre le dernier stade larvaire et le stade adulte dans une population de trichoptères prélevée dans un site soumis à un stress salin. Nous testerons néanmoins cette hypothèse dans la partie 4 du chapitre 4. D'autre part, le 4^{ème} et dernier stade larvaire pourrait être moins sujet aux variations phénotypiques que les stades précédents. Toutefois, Servia *et al.* (2002b) montrent chez *Chironomus riparius* que la différence de longueur entre le côté droit et le côté gauche du mentum augmente entre le 2^{ème} et le 4^{ème} stade larvaire. De plus, Servia *et al.* (2002a) observent que, bien que certaines difformités du mentum disparaissent entre les différentes mues du chironome, la fréquence de phénotypiques tend à augmenter au cours de la croissance larvaire.

Quatrièmement, au contraire de ce qui a été avancé par de nombreux auteurs (Leary et Allendorf, 1989 ; Graham *et al.*, 1993a ; Vermeulen, 1995), **la mesure des variations de forme pourrait ne pas être un indicateur sensible à un stress toxique.** Cette idée a été proposée par Leung *et al.* (2003) pour expliquer les différences importantes entre les résultats relevés dans la littérature.

Toutefois, aucune de ces hypothèses n'apporte de réponse satisfaisante pour expliquer les différences entre variations de forme observées dans le milieu naturel - souvent importantes - et variations de forme observées en laboratoire - souvent faibles. Dans le milieu naturel, à la diffé-

rence des essais en laboratoire, les organismes sont probablement soumis à plusieurs conditions stressantes. Ainsi, il se pourrait que **l'exposition à un seul et unique toxique n'affecte pas la forme de l'organisme ; celle-ci serait uniquement sensible à un stress multiple**. C'est ce que suggèrent les travaux en laboratoire de Langer-Jaesrich *et al.* (2010) sur les effets de pesticides en association sur le chironome ou bien ceux de Campero *et al.* (2008) sur l'effet combiné d'une exposition toxique et d'un stress alimentaire sur un odonate. En outre, ceci pourrait expliquer le fait qu'il ait été observé une relation positive entre concentrations en plomb sédimentaire et difformités du mentum dans le milieu naturel (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b ; Martinez *et al.*, 2002) mais pas en laboratoire (Bird *et al.*, 1995). Afin de tester cette hypothèse, nous avons mené des essais similaires sur deux sédiments provenant du milieu naturel, prélevés dans des stations anthropisées (cf. partie 3 du chapitre 4).

Dans ce travail, le principal effet détecté sur la forme moyenne du mentum est l'effet de la session d'essai. Ce résultat est surprenant car les organismes appartenant aux différents groupes témoins croissent dans des conditions similaires. En revanche, ils proviennent de pontes et donc de femelles différentes. Aussi cette variation de forme constituerait-elle une variation génétique. Quelques variations de la forme moyenne du mentum sont toutefois associées à une exposition toxique au plomb ou au nonylphénol. Ainsi, comme l'ont souligné Hoffmann *et al.* (2005) chez quatre insectes, la forme moyenne serait davantage sensible à une exposition toxique que la symétrie. Néanmoins, la réponse que nous observons sur la forme moyenne du mentum dépend davantage de la session considérée que de la concentration d'exposition. Par conséquent, il semble que **la sensibilité d'une population à un stress toxique dépend étroitement de sa composante génétique**. Nowak *et al.* (2007) ont ainsi montré que les résultats d'essais écotoxicologiques menés sur une même souche de *Chironomus riparius* de laboratoire, diffèrent largement. Selon eux, ceci serait lié à une dérive génétique de la population qui est un phénomène stochastique. Ces éléments soulignent la difficulté d'interprétation des changements de forme observés non seulement dans le milieu naturel mais également en laboratoire avec des organismes provenant du même élevage. En d'autres termes, les variations génétiques affectent la reproductibilité des tests écotoxicologiques.

Ces expériences soulignent :

1. le faible effet du plomb sur la forme du mentum malgré l'existence d'effets au niveau de la biochimie des organismes ;
2. le faible effet du 4-NP sur la forme du mentum ;
3. l'existence d'une différence de sensibilité en fonction de la session d'essai, et donc probablement des caractéristiques génétiques du groupe étudié.

Des essais supplémentaires sont nécessaires pour tester si les faibles effets observés sur la forme sont liés au choix de l'espèce modèle, au type de stress (une seule substance), au trait étudié, aux outils morphométriques utilisés ou bien encore à la combinaison de ces différents facteurs. Afin de tester l'effet d'une exposition multiple, nous avons évalué, dans la partie suivante, les variations de forme du mentum après une exposition des organismes à du sédiment provenant de stations anthropisées.

4.3 La forme du mentum est-elle davantage sensible à une poly-exposition ?

Dans cette partie, nous étudions l'hypothèse selon laquelle les variations de forme du mentum seraient davantage sensibles à une exposition multiple. Pour ce faire, nous avons évalué les effets de deux matrices sédimentaires prélevées dans le milieu naturel, sur la forme du mentum de *Chironomus riparius*. L'un des sédiments provient de la station d'Orcemont, située en milieu péri-urbain. L'autre provient de la station d'Andrésey située en milieu urbain dense.

4.3.1 Résultats

4.3.1.1 Suivi des paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques ne diffèrent pas de façon statistiquement significativement entre les différentes unités expérimentales (test de comparaison de Mann-Whitney-Wilcoxon deux à deux avec ajustement de Holm, tous les $p > 0,05$) (tableau 4.8). Néanmoins, nous notons que la conductivité des bacs contenant le sédiment d'Andrésey est supérieure à celles des autres bacs. En outre, le paramètre conductivité présente un coefficient de variation (CV) élevé, du fait de l'augmentation des valeurs au cours de l'essai. Ceci est probablement lié à l'évaporation de l'eau et/ou à l'augmentation de l'activité biologique et/ou au relargage des éléments adsorbés sur les phases particulaires, au cours du temps.

TABLEAU 4.8 – Moyennes et variations des paramètres physico-chimiques au cours des essais

	Orcemont				Andrésey			
	Témoin artificiel	CV (%)	Sédiment de rivière	CV (%)	Témoin artificiel	CV (%)	Sédiment de rivière	CV (%)
Température (°C)	14,8 ± 0,5	3	14,7 ± 0,6	4	14,9 ± 0,3	2	14,5 ± 0,3	2
pH	8,2 ± 0,2	2	8,1 ± 0,2	2	8,2 ± 0,2	2	8,0 ± 0,1	1
Conductivité (µS/cm)	536 ± 51	9	565 ± 87	16	682 ± 84	13	1044 ± 139	14
Oxygène dissous (mgO ₂ /l)	8,3 ± 0,5	6	7,9 ± 0,6	8	7,5 ± 0,7	10	7,6 ± 0,6	8
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,5 ± 1,0	nd	0,4 ± 0,9	nd	0,8 ± 1,3	nd	0,6 ± 1,4	nd

nd : non déterminé car la plupart des valeurs sont inférieures à la limite de quantification (0,5 mg/l).

4.3.1.2 Caractérisation physico-chimique des sédiments

Le sédiment d'Andrésey présente des taux de matière organique, d'azote et de phosphore élevés par comparaison avec le sédiment témoin et le sédiment d'Orcemont. Pour les sédiments d'Orcemont et d'Andrésey, à la différence du sédiment témoin, le rapport entre la concentration de carbone organique et la concentration d'azote organique est compris entre 8 et 14, ce qui suggère la présence de matière organique utilisable par les organismes pour leur alimentation (Péry, 2006).

De plus, les trois sédiments utilisés (sédiment artificiel, sédiment d'Orcemont et sédiment d'Andrésey) diffèrent par leur granulométrie. La granulométrie influence peu la survie des larves (Bonnet, 2000) et le taux de phénodéviations du mentum (Bird, 1997). Néanmoins, elle joue

un rôle important sur l'usure du mentum (Bird, 1997) ainsi que sur la croissance (Péry, 2003).

TABLEAU 4.9 – Caractéristiques physico-chimiques des sédiments étudiés
Moyenne et écart-type entre trois prises d'essai.

	sédiment témoin	Orcemont	Andrésy
MO (%)	4,9 ± 0,9	1,5 ± 0,2	29,6 ± 0,2
CO (%)	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,00	3,2 ± 0,7
Norg (%)	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,22 ± 0,07
Ptot (%)	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,02
pH	8,9 ± 0,2	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,0
C/N	62	12	9

Le diamètre médian des particules des trois sédiments est compris entre 250 et 500 μm (figure 4.16). Néanmoins, le sédiment artificiel est beaucoup plus homogène : 65 % des particules possèdent un diamètre compris entre 250 et 500 μm (sable). Le sédiment d'Orcemont présente davantage de particules grossières (sable grossier et gravier). Enfin, le sédiment d'Andrésy présente une fraction sableuse importante et une fraction fine (limons et argiles) supérieure à celle des autres sédiments étudiés.

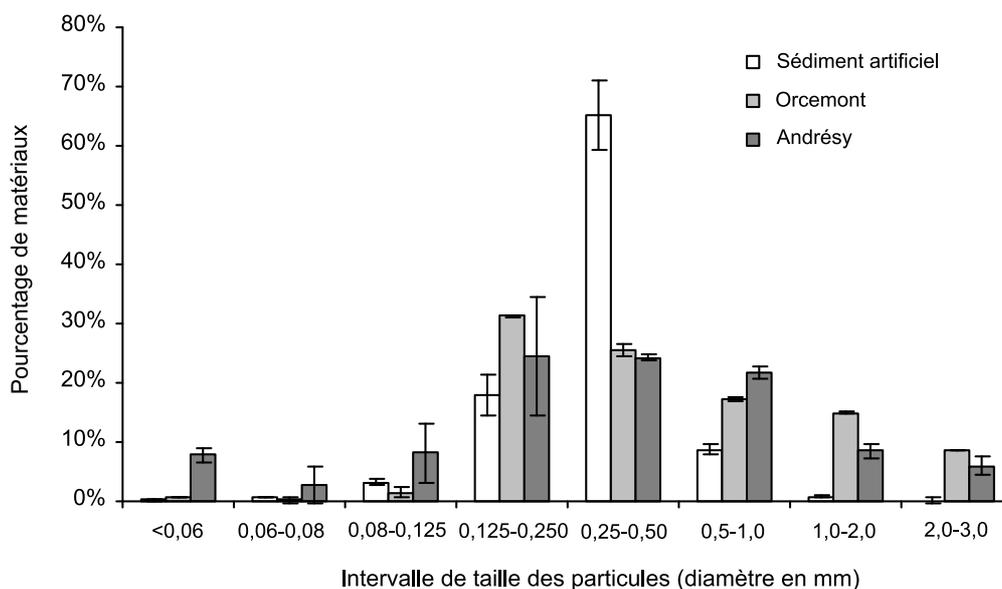


FIGURE 4.16 – Distribution granulométrique des trois sédiments étudiés
Moyenne et écart-type entre trois prises d'essai.

4.3.1.3 Concentrations d'exposition

Seuls certains métaux lourds ainsi que les HAP, les Hct, le NP et l'OP ont été dosés dans le sédiment et l'eau surnageante. Aussi, la liste présentée ne se veut en aucun cas être une liste exhaustive des polluants présents dans les matrices d'essais.

TABLEAU 4.10 – Concentrations mesurées dans les sédiments en début d’essai en mg/kg de MS
Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats.

type de composé	paramètre	témoin Orcemont	Orcemont	témoin Andrésey	Andrésey	niveau moyen bruit de fond ¹	ERM ²
minéral	Pb	1,6 ± 0,1	19,4 ± 1,0	2,4 ± 0,2	195,5 ± 4,9	20	396
	Cu	3,1 ± 0,4	18,0 ± 2,0	2,5 ± 0,2	210,5 ± 11,0	15	206,5
	Zn	<10	75,8 ± 9,3	<10	809,5 ± 16,4	60	2750
	Cr	0,7 ± 0,2	6,2 ± 2,0	0,2 ± 0,0	97,1 ± 4,0	40	363
	Ni	0,7 ± 0,2	14,0 ± 3,0	0,2 ± 0,0	63,4 ± 7,8	16	47,5
	Cd	<0,04	0,2 ± 0,0	<0,04	14,0 ± 0,6	0,22	11,7
	Mn	2,7 ± 0,1	107,5 ± 20,2	3,0 ± 0,2	391,6 ± 18,3	–	2410
	Ba	13,2 ± 1,2	35,7 ± 5,9	21,0 ± 1,0	1257,6 ± 21,2	–	–
	As	0,9 ± 1,0	6,0 ± 2,0	1,0 ± 0,0	7,6 ± 0,3	–	57
	Se	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	–	–
	Hg	<0,2	1,0 ± 0,8	<0,2	1,0 ± 0,1	–	–
	Fe	173,5 ± 10,8	13875,8 ± 4151,9	279,9 ± 48,2	19990,5 ± 1465,6	–	–
	Al	901,5 ± 41,7	2755,3 ± 883,8	nd	14623,3 ± 800,7	33000	–
	Mg	67,5 ± 6,6	1892,8 ± 267,7	97,0 ± 5,0	4133,5 ± 71,7	–	–
	K	346,0 ± 17,7	520,5 ± 105,6	428,5 ± 20,0	2255,5 ± 43,3	–	–
organique	4t-OP	<0,02	0,10 ± 0,13	<0,02	0,62 ± 0,12	–	–
	4-NP	<0,02	0,05 ± 0,01	<0,02	0,32 ± 0,26	–	–
	Hct	<100	<100	155,0 ± 17,4	2528,0 ± 120,7	–	–
	∑ 15HAP	0,01 ± 0,01	1,24 ± 0,46	0,01 ± 0,01	17,19 ± 3,41	–	33,189

1 : d’après Thévenot *et al.* (2002)

2 : seuil d’effet médian sur *Chironomus riparius*, d’après Ingersoll *et al.* (1996).

En gris : valeur supérieure au seuil d’effet médian sur *Chironomus riparius*.

nd : non déterminé.

Les concentrations en polluants métalliques du sédiment provenant de la station d'Orcemont sont supérieures à celles du sédiment témoin (tableau 4.10). Elles demeurent néanmoins faibles et sont inférieures aux seuils d'effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996). En outre, elles correspondent aux valeurs du bruit de fond des sédiments du bassin de la Seine (Thévenot *et al.*, 2002).

Les concentrations en polluants métalliques du sédiment provenant de la station d'Andrésey sont élevées. Elles sont, pour le plomb, le cuivre, le zinc, le chrome, le nickel, le cadmium et l'aluminium, supérieures au bruit de fond du bassin de la Seine. Le seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996) est, en outre, dépassé pour le cuivre (210,5 mg/kg de MS), le nickel (63,4 mg/kg de MS) et le cadmium (14,0 mg/kg de MS).

Les concentrations mesurées en polluants organiques (HAP, Hct, OP et NP) dans le sédiment d'Orcemont sont faibles. Dans le sédiment témoin seuls deux HAP légers³, le naphthalène et le phénanthrène, sont détectés. Dans le sédiment d'Orcemont, en plus de ces deux composés, le pyrène, un composé lourd⁴ est mesuré. Ce composé est caractéristique des environnements urbains, il possède une origine pyrolytique (Azimi *et al.*, 2003). Les hydrocarbures aliphatiques (Hct) sont détectés dans le sédiment d'Orcemont mais en faible quantité (non quantifiable). La majorité de ces hydrocarbures présente un nombre de carbones impairs ce qui est caractéristique d'une origine végétale (Bomboi et Hernandez, 1990).

La concentration moyenne en HAP dans le sédiment d'Andrésey s'élève à 17,9 mg/kg de MS. Bien que cette concentrations soit élevée, le seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius* est uniquement dépassé pour le fluoranthène (Ingersoll *et al.*, 1996). Les composés lourds sont prédominants ce qui indique une source pyrolytique (Azimi *et al.*, 2003). Le chrysène et le benzo(a)anthracène, présents en quantité importante, sont également des résidus caractéristiques des processus de combustion (Moreda *et al.*, 1998). La concentration moyenne en hydrocarbures aliphatiques (Hct) atteint, de plus, 2528 mg/kg de MS. Le ratio des hydrocarbures aliphatiques à nombre de carbones impairs sur ceux à nombre de carbones pairs s'élève à 0,9. Ce ratio proche de 1 suggère une origine pétrolière de ces composés (Bomboi et Hernandez, 1990). Il est à noter que les AP (NP et OP) sont mesurés en concentrations non négligeables dans le sédiment d'Andrésey. Ainsi, la valeur de 4-NP s'élève à 0,32 mg/kg de MS. A titre d'élément de comparaison, la valeur médiane de ce composé relevée dans la base de données 2008 de l'AESN est inférieure à 0,02 mg/kg de MS. De plus, dans le sédiment d'Andrésey, la valeur mesurée de 4t-OP est de 0,62 mg/kg de MS. Bennie *et al.* (1997) mesurent, dans des sédiments à l'aval de rejets industriels, des concentrations moyennes de 4t-OP de 0,41 mg/kg de MS, ce qui correspond à 34 % de moins que la valeur que nous mesurons dans le sédiment d'Andrésey. Par ailleurs, la concentration de PCB mesurée est importante : elle s'élève pour la somme des sept congénères dosés à 1,24 mg/kg de MS (données non publiées, VNF 2012). Elle dépasse ainsi le seuil fixé par l'arrêté du 9 août 2006 relatif à la qualité des sédiments de rivière.

Le sédiment d'Andrésey dépasse, en outre, l'indice de contamination (QSm) établi par VNF (guide de dragage, VNF 2008). Néanmoins, la CE₅₀ (inhibition de la croissance) sur *Brachionus calyciflorus* à 48 h s'élève à 27 % de lixiviats, et la CE₂₀ à 8 % (données non publiées, VNF 2012), ce qui suggère une toxicité limitée du sédiment selon les seuils établis par VNF (schéma directeur régional des terrains de dépôt, VNF 2006).

3. Composés présentant moins de 3 cycles aromatiques.

4. Composés présentant entre 4 et 6 cycles aromatiques.

TABLEAU 4.11 – Concentrations mesurées dans l'eau surnageante en début d'essai en $\mu\text{g/l}$
Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats.

type de composés	paramètre	témoin Orcemont	Orcemont	témoin Andrésey	Andrésey	ERM ¹
minéral	Pb	< 1	< 1	< 1	< 1	62,85
	Cu	0,6 ± 0,6	7,5 ± 6,8	< 0,5	131,7 ± 16,1	20,6
	Zn	< 50	< 50	< 50	59,9 ± 5,7	55,2
	Cr	< 1	< 1	< 1	1,6 ± 0,4	18,8
	Ni	< 2	2,4 ± 0,1	< 2	28,6 ± 3,0	10,4
	Cd	< 0,2	< 0,2	< 0,2	1,0 ± 0,1	1,05
	Mn	12,6 ± 6,3	10,2 ± 9,9	17,0 ± 3,1	14,5 ± 1,2	–
	Ba	12,4 ± 1,3	28,7 ± 2,0	20,3 ± 1,1	21,7 ± 1,5	–
	As	8,8 ± 1,0	3,6 ± 0,8	2,9 ± 0,3	9,5 ± 0,9	–
	Se	< 2	7,7 ± 0,5	< 2	4,5 ± 0,3	–
	Fe	< 100	< 100	< 100	< 100	–
	Al	48,6 ± 34,7	14,8 ± 3,9	74,5 ± 15,5	389,7 ± 141,2	–
	Mg	7702,5 ± 494,5	5495,0 ± 60,3	7517,5 ± 33,0	3340,0 ± 132,4	–
	organique	4t-OP	< 0,2	0,2 ± 0,0	< 0,2	< 0,2
4-NP		0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	< 0,2	0,7 ± 0,4	–
Hct		308 ± 72	355 ± 209	< 200	< 200	–
\sum 15HAP		0,13 ± 0,04	0,06 ± 0,04	0,36 ± 0,05	0,60 ± 0,24	–

1 : seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius*, d'après Ingersoll *et al.* (1996).

En gris : valeur supérieure au seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius*.

Les concentrations en composés minéraux mesurées dans les eaux surnageantes des essais d’Orcemont sont faibles (tableau 4.11). Par comparaison avec les eaux surnageantes du groupe témoin, seules les concentrations en cuivre, nickel, sélénium et baryum sont supérieures. Les concentrations en polluants organiques ne diffèrent pas entre l’eau surnageante du sédiment témoin et celle d’Orcemont.

Les concentrations en cuivre, zinc, nickel et cadmium sont élevées dans les eaux d’Andrésey. En particulier, les valeurs mesurées dépassent le seuil d’effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996) pour le cuivre (131,7 µg/l), le zinc (59,9 µg/l) et le nickel (28,6 µg/l). Au contraire, les concentrations en polluants organiques demeurent relativement faibles.

Dans les eaux interstitielles, analysées *via* les membranes DGT pour les éléments minéraux et *via* les membranes SPMD pour les éléments organiques (tableau 4.12), les concentrations dissoutes en polluants organiques sont faibles. De même, les concentrations labiles en métaux lourds sont faibles pour les deux sédiments considérés, excepté pour le nickel. La concentration moyenne labile en nickel dans l’eau interstitielle provenant du sédiment d’Andrésey atteint 21,6 µg/l; elle dépasse ainsi la valeur seuil d’effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996).

TABLEAU 4.12 – Concentrations mesurées dans l’eau interstitielle (µg/l) intégrées sur la durée de l’essai (20 jours)

Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats.

	Témoin Orcemont	Orcemont	Témoin Andrésey	Andrésey
Pb	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
Cu	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,4 ± 1,7
Cr	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Ni	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,7	0,0 ± 0,0	21,6 ± 6,5
Cd	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1
HAP	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2
NP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,2
OP	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0

En gris : valeur supérieure au seuil d’effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996).

4.3.1.4 Bioaccumulation

Dans les groupes témoins, le plomb est détecté en très faible quantité dans les corps des organismes (tableau 4.13 et figure 4.17). De plus, le nickel, le cadmium et le chrome ne sont pas quantifiables. Nous notons des concentrations plus élevées pour les deux métaux essentiels dosés : le cuivre et le zinc.

L’accumulation de métaux lourds, par comparaison avec le groupe témoin, est faible pour les larves ayant crû dans le sédiment d’Orcemont. Nous notons néanmoins, la présence de nickel dans le groupe d’Orcemont (non quantifiable dans le groupe témoin) et de cuivre en quantité deux fois plus importante (figure 4.17). Il est à noter que le facteur de bioaccumulation est supérieur à 1 uniquement pour les deux métaux essentiels dosés : le cuivre et le zinc (tableau 4.13).

Par rapport au groupe témoin, la concentration dans les larves d’Andrésey est 27 fois plus importante en plomb, 8 fois plus importante en cuivre et 5 fois plus importante en zinc. En outre,

18,7 mg/kg de MS de chrome, 29,1 mg/kg de MS de nickel et 8,1 mg/kg de MS de cadmium sont mesurés dans le corps des organismes. Le facteur de bioaccumulation, correspondant au rapport entre la concentration mesurée dans les larves et la concentration mesurée dans le sédiment, est inférieur à 1 pour tous les éléments métalliques considérés (tableau 4.13).

TABLEAU 4.13 – Concentrations mesurées dans les chironomes (mg/kg de MS) et facteurs de bioaccumulation correspondants

	Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats.					
	Témoin Orcemont	Orcemont	FBC Orcemont	Témoin Andrésey	Andrésey	FBC Andrésey
Pb	2,8 ± 0,7	5,2 ± 3,6	0,3	4,6 ± 0,4	125,9 ± 3,8	0,6
Cu	13,5 ± 0,5	25,2 ± 8,1	1,4	15,0 ± 1,2	116,9 ± 12,0	0,6
Zn	120,7 ± 8,9	129,2 ± 26,7	1,7	99,5 ± 11,0	488,0 ± 52,1	0,6
Cr	< 1,3	< 1,3	–	< 1,3	18,7 ± 1,5	0,2
Ni	< 2,7	4,0 ± 3,4	0,3	< 2,7	29,1 ± 4,6	0,5
Cd	< 0,3	< 0,3	–	< 0,3	8,1 ± 1,3	0,6
HAP	4,2 ± 1,3	2,8 ± 0,5	2	1,4 ± 1,1	3,8 ± 0,4	0,2
NP	< 0,4	< 0,4	–	< 0,4	< 0,4	–
OP	0,5 ± 0,0	< 0,4	–	< 0,4	< 0,4	–

Nous ne remarquons aucune variation des concentrations en polluants organiques entre les groupes témoins et les groupes exposés aux deux sédiments étudiés (tableau 4.13).

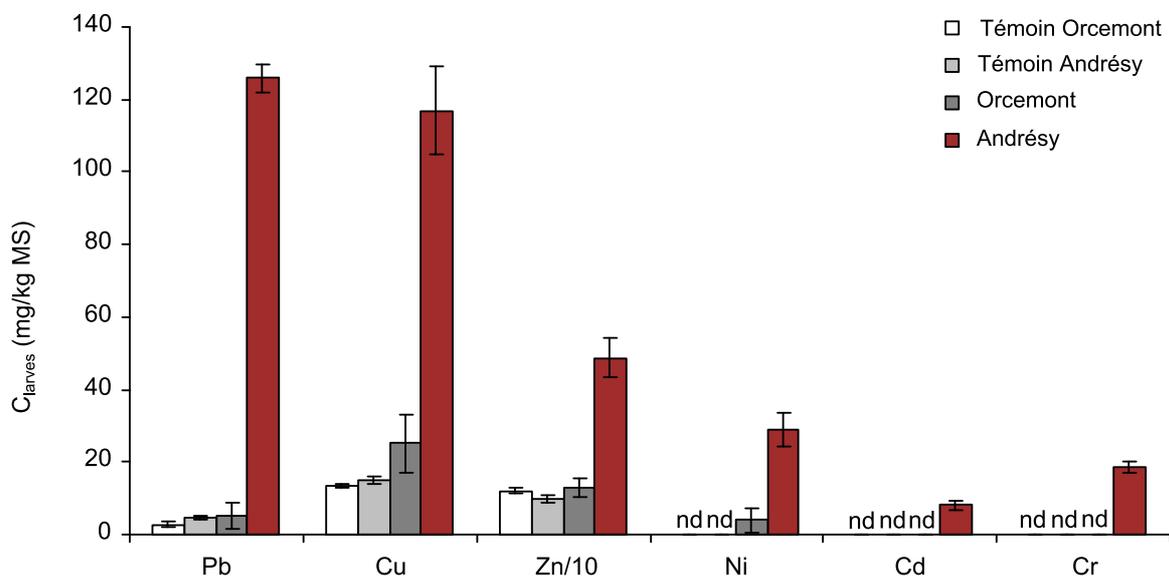


FIGURE 4.17 – Concentrations en métaux mesurées dans les larves

Les concentrations en zinc ont été divisées par 10 pour plus de lisibilité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les quatre réplicats. nd : non détecté.

4.3.1.5 Émergence

Le pourcentage d'émergence (tableau 4.14) ne varie pas de façon statistiquement significative entre le groupe témoin et le groupe exposé au sédiment d'Orcemont (test des proportions, $\chi^2=0,8$, $p>0,05$). La durée d'émergence diffère néanmoins (test de Mann-Whitney-Wilcoxon,

$W=19$, $p \leq 0,05$); elle est plus courte pour le groupe provenant du sédiment d'Orcemont. Par rapport au groupe témoin, le taux d'émergence (test des proportions, $\chi^2=7,8$, $p \leq 0,05$) ainsi que le temps d'émergence (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=1$, $p \leq 0,05$) diffèrent significativement pour le groupe ayant crû dans le sédiment d'Andrésy. Nous observons, en effet, une légère diminution du taux d'émergence ainsi qu'un allongement de la durée avant l'émergence.

TABLEAU 4.14 – Caractéristiques de l'émergence chez les groupes témoins et exposés
Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats.

	émergence (%)	nombre de jours avant la 1 ^{ère} émergence
Témoin-Orcemont	92 ± 4	25 ± 1
Orcemont	88 ± 6	$23 \pm 1^*$
Témoin-Andrésy	87 ± 9	26 ± 1
Andrésy	$75 \pm 16^*$	$28 \pm 1^*$

* : différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin ($p \leq 0,05$)

Les masses des larves provenant des sédiments d'Orcemont ou d'Andrésy diffèrent significativement de celles des groupes témoins (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, Orcemont : $W=0$; Andrésy : $W=36$, $p \leq 0,05$). Nous observons ainsi une augmentation de la masse des larves ayant cru dans le sédiment d'Orcemont ainsi qu'une diminution de celle des larves ayant crû dans le sédiment d'Andrésy (figure 4.18).

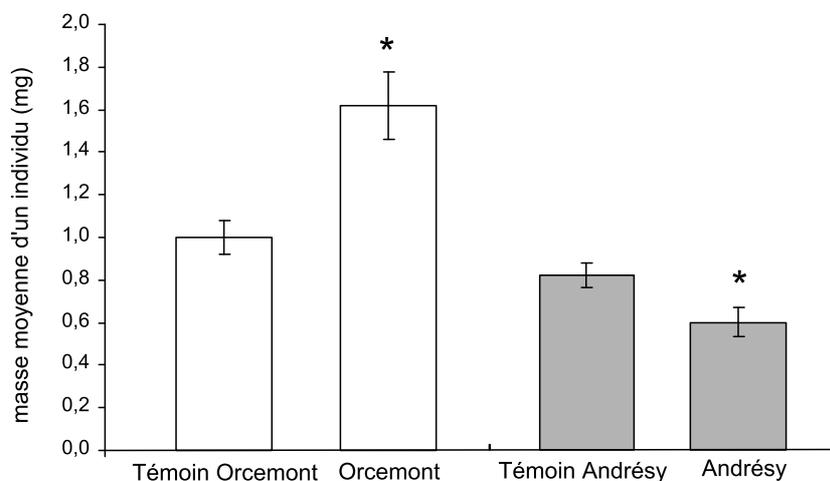


FIGURE 4.18 – Masse moyenne (mg) d'une larve au stade 4 en fonction du sédiment étudié
Moyenne et écart-type entre les 4 réplicats. * : valeur significativement différente de celle du groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

4.3.1.6 Taux de phénodéviations du mentum

Le taux de phénodéviants (figure 4.19) est significativement supérieur chez les organismes exposés au sédiment provenant de la station d'Orcemont (test des proportions unilatéral, $\chi^2=4,0$, $p \leq 0,05$) : il s'élève en moyenne à 3,7 % pour le groupe témoin et à 9,4 % pour le groupe exposé. En revanche, il n'existe aucune différence statistiquement significative entre le groupe témoin de l'essai d'Andrésy et le groupe ayant crû dans le sédiment d'Andrésy (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,1$, $p > 0,05$). La fréquence de phénodéviants s'élève à 7,9 et 6,8 %, respectivement.

La valeur mesurée dans le groupe témoin du sédiment d'Andrésey est élevée par comparaison à celle mesurée dans le groupe témoin de l'essai d'Orcemont, mais la différence demeure non statistiquement significative (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,2$, $p>0,05$).

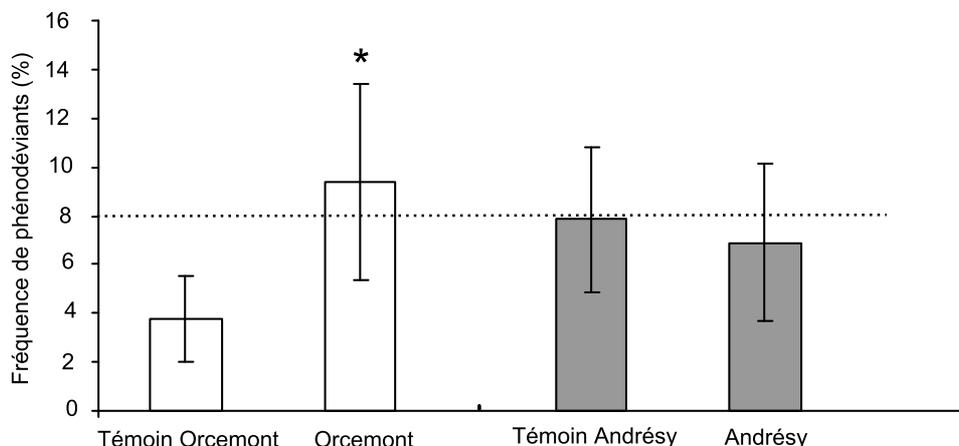


FIGURE 4.19 – Fréquence de phénodéviantes en fonction du sédiment étudié
Moyenne et écart-type entre les quatre réplicats. * : fréquence significativement supérieure à celle du groupe témoin (test des proportions unilatéral, $p\leq 0,05$). La ligne en pointillés indique la valeur seuil établie par Vermeulen *et al.* (1998) qui sépare un sédiment très faiblement contaminé d'un sédiment faiblement contaminé.

Alors qu'aucun phénomène de fusion de dents n'avait été relevé dans les groupes témoins des essais au plomb et au nonylphénol (cf. partie 2 du chapitre 4), nous voyons apparaître ce type d'anomalie morphologique chez le groupe témoin de l'essai d'Andrésey (tableau 4.15). En outre, alors que nous n'avions jamais observé de Khön gap dans les essais au plomb ou au nonylphénol, nous notons ce type de difformité chez le groupe exposé au sédiment d'Andrésey.

TABLEAU 4.15 – Pourcentage moyen de phénodéviantes et type de phénodéviantes observées

	effectif total	phénodéviantes (%)	ajout dent (%)	absence dent (%)	fusion dents (%)	Khön gap (%)	double fente (%)	score ¹
Témoin-Orcemont	187	3,7	1,0	3,6	0,0	0,0	0,0	37
Orcemont	192	9,4	4,1	3,6	1,5	0,0	0,0	110
Témoin-Andrésey	191	7,9	5,2	1,0	1,0	0,0	0,5	129
Andrésey	205	6,8	3,4	1,5	1,0	1,0	0,0	92

1 : d'après Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b)

Nous avons calculé le score établi par Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) afin de donner un poids aux phénodéviantes observées (annexe 1). Ce score s'élève à 37 pour le groupe témoin d'Orcemont et à 110 pour le groupe d'Orcemont, ce qui confirme l'effet du sédiment d'Orcemont sur les phénodéviantes du mentum. En revanche, nous observons un score élevé pour le groupe témoin d'Andrésey, qui dépasse celui du groupe d'Orcemont (tableau 4.15).

4.3.1.7 Niveaux d'AF de forme du mentum

Nous n'observons pas de différence statistiquement significative entre la taille centroïde du mentum du groupe témoin d'Orcemont et celle du groupe exposé au sédiment d'Orcemont (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=10741$, $p>0,05$). En revanche, la taille centroïde est statistiquement différente entre le groupe témoin de l'essai d'Andrésy et le groupe provenant du sédiment d'Andrésy (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=15760$, $p\leq 0,05$) (figure 4.20).

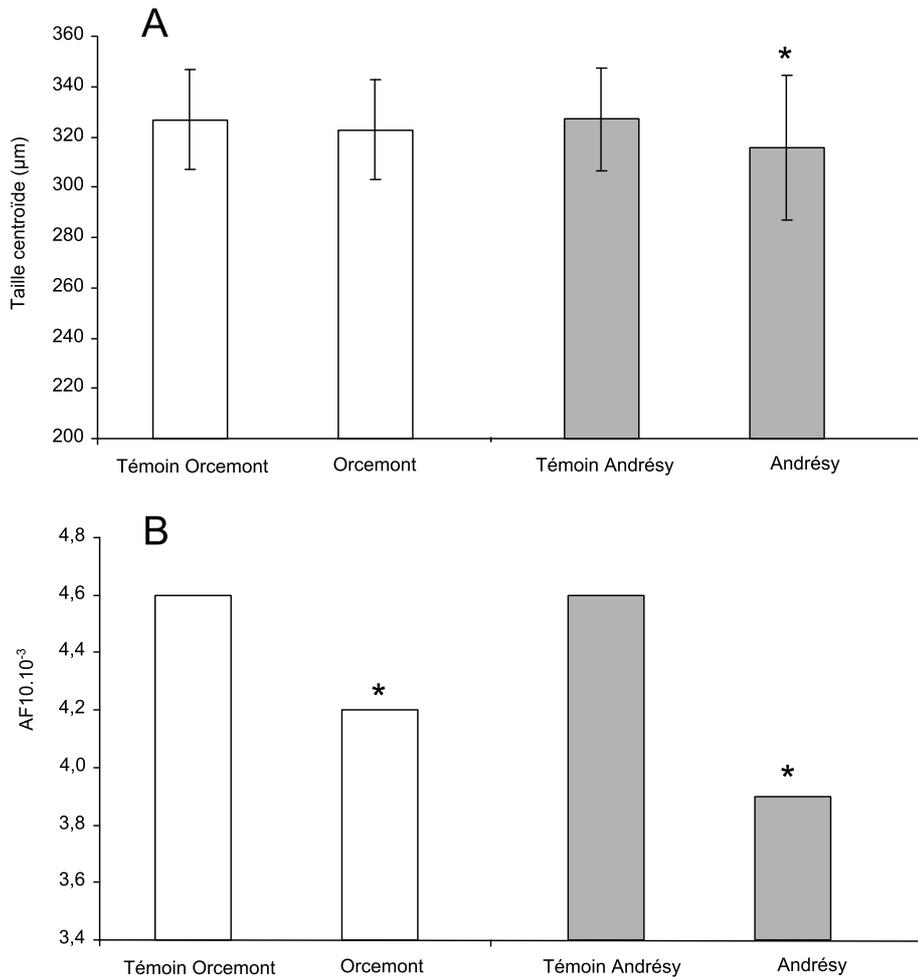


FIGURE 4.20 – Taille centroïde et AF de forme du mentum en fonction du sédiment étudié
A : taille centroïde en μm , moyenne et écart-type entre les individus, et B : AF de forme. * : niveau significativement différent de celui du groupe témoin ($p\leq 0,05$).

L'effet de l'asymétrie (interaction côté x individu) est supérieur à l'erreur de mesure (tableau 4.16). La projection des vecteurs d'asymétrie de forme ne révèle pas d'AA. En revanche, l'effet côté est statistiquement significatif pour tous les groupes étudiés (MANOVA, tous les $p\leq 0,05$) ce qui suggère l'existence d'AD, phénomène largement observé chez les insectes (Pelabon et Hansen, 2008). Aussi, nous ne pouvons pas conclure que les asymétries observées sont uniquement des AF. Une régression entre les tailles centroïdes et les vecteurs d'asymétrie de forme met en évidence l'absence d'effet significatif d'allométrie (test de permutation, tous les $p>0,05$). Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableau 4.45).

Le niveau d'asymétrie diminue de façon statistiquement significative entre les groupes témoins

et les groupes exposés (tableau 4.16), qu'il s'agisse de l'essai d'Orcemont (test F, $F_{3636,3244}=1,10$, $p \leq 0,05$) ou bien de l'essai d'Andrésey (test F, $F_{3934,4018}=1,17$, $p \leq 0,05$).

TABLEAU 4.16 – Résultats de l'ANOVA mixte sur la forme du mentum
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	côté x individu (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	AF10.10 ⁻³
Témoin- Orcemont	150	3,1*	6,2*	3,5*	0,17	91	4,6
Orcemont	130	5,4*	5,9*	2,8*	0,10	93	4,2*
Témoin- Andrésey	155	5,8*	6,1*	3,4*	0,09	95	4,6
Andrésey	163	6,9*	5,9*	2,5*	0,10	92	3,9*

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$)

4.3.1.8 Forme moyenne du mentum

Une ACV réalisée sur les essais portant sur les matrices sédimentaires d'Orcemont et d'Andrésey (figure 4.21) montre une séparation selon l'axe 1 (représentant 50 % de la variance totale) entre les organismes exposés au sédiment d'Orcemont du côté négatif et le groupe témoin de cet essai du côté positif. La variation de la forme moyenne selon cet axe consiste en une diminution de la taille des dents.

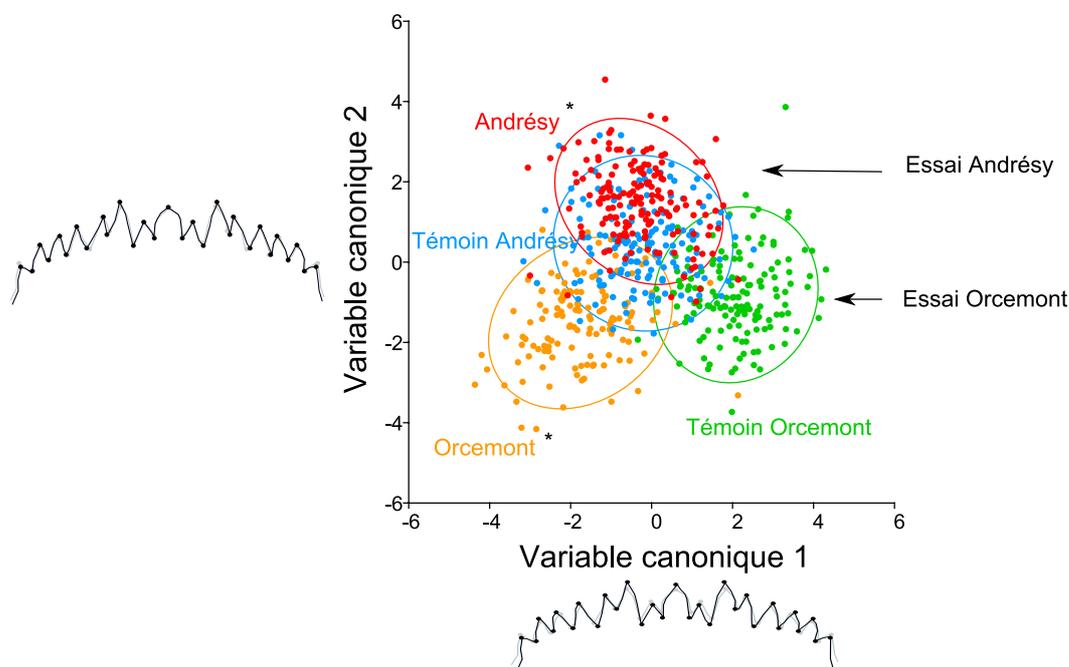


FIGURE 4.21 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé pour les essais sur sédiments naturels

Les ellipses représentent les ellipses de confiance à 90 % de chaque groupe. Variations de forme le long de chaque axe par superposition des individus extrêmes : les menta en gris représentent le côté négatif des axes, ceux en noir, le côté positif.* : distance procuste entre groupe témoin et groupe stressé statistiquement significative (test de permutation, $p \leq 0,05$).

Sur l'axe 2, représentant 38 % de la variance totale, l'essai d'Andrésy, préférentiellement du côté positif, se détache de l'essai d'Orcemont, préférentiellement du côté négatif. Cet axe pourrait ainsi représenter les différences génétiques.

L'analyse canonique entre les groupes témoins et les groupes exposés au sédiment de la station d'Orcemont d'une part, et au sédiment de la station d'Andrésy d'autre part, met en évidence une différence significative de la forme moyenne des menta (distance procruste Orcemont = 0,02, test de permutation, $p \leq 0,05$; distance procruste Andrésy = 0,01, test de permutation, $p \leq 0,05$). Cette différence se caractérise par une diminution de la taille des dents pour les larves en contact avec le sédiment d'Orcemont (figure 4.22). De plus, nous constatons chez les deux groupes stressés, une augmentation de l'angle entre la zone latérale et la zone externe (indiquée par les flèches sur la figure 4.22).

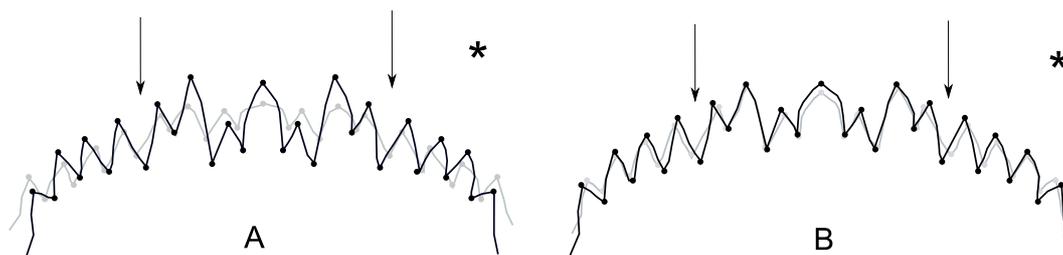


FIGURE 4.22 – Superposition de la forme moyenne du mentum du groupe témoin (en noir) et du groupe stressé (en gris)

A : essai Orcemont et B : essai Andrésy. Facteur d'Amplification : 5. * : différence significative par rapport au groupe témoin. Les flèches indiquent une zone de variation importante.

4.3.2 Discussion

Le sédiment d'Orcemont présente une faible contamination en métaux lourds et en polluants organiques. Les valeurs mesurées correspondent au bruit de fond moyen du bassin de la Seine. Les HAP et Hct détectés présentent une signature caractéristique d'une origine végétale. En d'autres termes, ce sédiment présente une faible contamination caractéristique d'un environnement péri-urbain. La mesure de la fraction labile, *via* des membranes passives, suggère une faible biodisponibilité des toxiques étudiés. Ce résultat est conforté par les faibles quantités de métaux mesurées dans les corps des organismes exposés.

Le sédiment d'Andrésy présente des concentrations en métaux lourds (Pb, Cu, Zn, Ni, Cd) qui dépassent le niveau moyen du bruit de fond du bassin de la Seine. En outre, le seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius* est dépassé pour le Cu, le Ni et le Cd (Ingersoll *et al.*, 1996). **La concentration en HAP est également relativement élevée** et sa signature est caractéristique des processus de combustions (chauffage urbain, trafic automobile et fluvial...). De même, les hydrocarbures aliphatiques détectés présentent une signature caractéristique d'une origine pétrolière. De plus, la concentration en PCB s'élève, pour la somme des sept congénères dosés, à 1,24 mg/kg de MS, ce qui est supérieur aux concentrations usuellement mesurées dans les sédiments de rivière (Bettinetti *et al.*, 2003). En conclusion, le sédiment d'Andrésy présente **une forte contamination caractéristique d'une origine urbaine et industrielle**. Néanmoins, dans l'eau interstitielle, seule la concentration en nickel dépasse le seuil d'effet médian sur *Chironomus riparius* (Ingersoll *et al.*, 1996), ce qui suggère que **les polluants organiques et minéraux dosés dans ce sédiment sont faiblement biodisponibles**. Ce résultat est confirmé par le calcul du facteur de bioaccumulation qui demeure inférieure à

0,6 pour les polluants étudiés, et ce même pour le plomb et le cadmium, qui ne sont pas régulés par *Chironomus riparius* (Krantzberg et Stockes, 1989).

Néanmoins, *Chironomus riparius* est une espèce limivore qui ingère des particules. C'est probablement pour cela, que l'on trouve des **quantités relativement élevées de métaux lourds** (en particulier de Pb, Cu, Zn, Cr, Ni et Cd) **dans le corps des organismes** provenant du sédiment d'Andrésey. Ces concentrations correspondent à celles mesurées par Krantzberg et Stockes (1989) et par Roulier *et al.* (2008) dans le corps de larves appartenant au genre *Chironomus* et ayant crû dans du sédiment naturel contaminé en métaux lourds. En revanche, de faibles concentrations en HAP, correspondant à celles mesurées dans les groupes témoins, sont mesurées dans le corps des organismes en contact avec le sédiment d'Andrésey. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que certains HAP, tel que le Benzo(a)pyrène ou bien le pyrène, sont métabolisables par *Chironomus riparius* (Leversee *et al.*, 1982 ; Wildi *et al.*, 1994).

Les larves ayant crû dans le sédiment d'Orcemont présentent une masse significativement plus élevée que celle des larves provenant du sédiment témoin. Cette masse supérieure est probablement liée à la **quantité de matière organique disponible pour l'alimentation du chironome plus importante dans le sédiment d'Orcemont**. En effet, alors que le rapport carbone organique sur azote organique est supérieur à 17 pour le sédiment témoin, ce qui indique la non biodisponibilité de la matière organique, il s'élève à 12 pour le sédiment d'Orcemont ce qui suggère qu'une partie de la matière organique présente est mobilisable par la larve pour son alimentation (Péry, 2006). Ceci pourrait également expliquer la réduction du temps d'émergence observée dans le groupe d'Orcemont. Ces résultats de croissance dans le sédiment d'Orcemont nous amènent à penser que la quantité d'aliment distribuée dans le sédiment témoin est limitante. Comme l'ont préconisé Péry *et al.* (2002), il aurait été probablement préférable dans nos essais, d'adapter la quantité de nourriture délivrée au stade larvaire des organismes.

Les larves ayant crû dans le sédiment d'Andrésey présentent une masse larvaire significativement inférieure à celle du groupe témoin et ce en dépit de la présence de matière organique mobilisable par la larve pour son alimentation (Péry, 2006). Dans la littérature, une diminution de la masse larvaire chez le genre *Chironomus* a été observée en présence de métaux lourds dans la phase aqueuse tels que le cadmium (Pascoe *et al.*, 1989 ; Timmermans *et al.*, 1992 ; Postma *et al.*, 1995a), le zinc (Timmermans *et al.*, 1992 ; Postma *et al.*, 1995a), le cuivre (Timmermans *et al.*, 1992 ; Karouna-Renier et Zehr, 2003), le fer (Postma *et al.*, 1995a) ou bien le plomb (Timmermans *et al.*, 1992). Les molécules organiques peuvent également participer à une diminution de la croissance larvaire. C'est ainsi que Watts *et al.* (2003) mettent en évidence une diminution significative de la masse des larves de *Chironomus riparius* en présence de bisphénol A ou de 17 α -ethinylestradiol dans la phase aqueuse. Ainsi, **la faible masse larvaire observée dans le sédiment d'Andrésey est probablement liée à la présence de toxiques**. Nous pouvons penser que la consommation d'énergie nécessaire au processus de détoxification (Choi *et al.*, 2001) se fait au détriment de celle nécessaire à la croissance des organismes. Ceci pourrait également expliquer le retard à l'émergence observé dans le groupe d'Andrésey, phénomène qu'ont également relevé Servia *et al.* (2006) chez cette même espèce en présence de cuivre. La diminution du taux d'émergence que nous observons chez les organismes exposés au sédiment d'Andrésey est probablement liée à une mortalité larvaire accrue. Comme l'a souligné Dias (2010) chez *Chironomus riparius* exposé à de l'uranium, cette mortalité survient probablement au cours des premiers stades larvaires qui sont les plus sensibles. Aussi la quantité de nourriture disponible par individu doit-elle être plus importante dans le sédiment d'Andrésey. Postma *et al.* (1994) ont montré chez *Chironomus riparius* exposé à du cadmium,

que ce phénomène permettait, jusqu'à une certaine concentration d'exposition, de compenser les effets du stress toxique. Dans notre expérience, cet apport supplémentaire de nourriture ne semble pas permettre de compenser les effets toxiques inhérents à la matrice d'essai.

En outre, la réduction de la croissance observée dans le sédiment d'Andrésey pourrait être liée à la nature particulière de cette matrice sédimentaire. En effet, bien qu'elle présente une granulométrie la caractérisant comme un sable, sa couleur noire (annexe 5) nous indique qu'il ne s'agit pas d'un substrat silicateux. Or Péry *et al.* (2003) montrent que la croissance de *Chironomus riparius* est retardée dans des sédiments non silicateux.

Les organismes exposés au sédiment provenant de la station d'Orcemont présentent une fréquence de phénodéviants significativement supérieure à celle du groupe témoin. Ce résultat est en accord avec les observations dans le milieu naturel soulignant une augmentation des anomalies morphologiques affectant le mentum du chironome dans des stations soumises à une pollution urbaine (Bird, 1994 ; Servia *et al.*, 1998 ; Vermeulen *et al.*, 1998 ; Al-Shami *et al.*, 2011a). Ainsi, alors que l'exposition à un seul polluant (cf. partie 2 du chapitre 4) n'entraîne pas d'augmentation significative du taux de phénodéviants et ce même pour des concentrations élevées en plomb ou en 4-NP, **l'exposition à une pollution multiple, même si elle reste relativement limitée comme dans notre cas, aurait un effet tératogène**⁵. Vermeulen *et al.* (1998) ont établi une classification de la toxicité d'un sédiment en fonction du taux de phénodéviants observé sur le 4^{ème} stade larvaire de *Chironomus riparius*. En dessous de 8 %, comme c'est le cas pour les sédiments témoins, la contamination du sédiment est considérée comme très faible. Entre 8 et 18 %, comme c'est le cas pour le sédiment d'Orcemont, le sédiment est qualifié de faiblement contaminé, ce qui semble en accord avec nos résultats d'analyses physico-chimiques. L'augmentation du taux de phénodéviations du mentum pourrait affecter, comme l'ont proposé Cushman (1984) ou bien Martinez *et al.* (2001), l'alimentation du chironome. Néanmoins, la masse larvaire est élevée dans le sédiment d'Orcemont, ce qui suggère un effet limité des difformités du mentum sur l'alimentation des larves.

Les organismes exposés au sédiment provenant de la station d'Andrésey présentent un taux de phénodéviants comparable à celui du groupe témoin. Ce résultat est surprenant compte tenu non seulement des fortes concentrations en métaux, HAP et hydrocarbures aliphatiques mesurées dans le sédiment mais également des fortes concentrations en métaux essentiels (Zn et Cu) et non essentiels (Pb, Ni, Cd et Cr) détectées dans le corps des organismes. En effet, de nombreux travaux rapportent une corrélation entre présence de métaux lourds et taux de phénodéviations. C'est ainsi que Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) observent une corrélation chez le genre *Chironomus* entre présence de plomb et de cuivre dans les sédiments et difformités du mentum, et ce pour des concentrations sédimentaires supérieures à 120 et 15 mg/kg de MS, respectivement, ce qui correspond aux concentrations mesurées dans le sédiment d'Andrésey. De même, alors que Martinez *et al.* (2002) n'observent pas de lien entre présence de nickel et taux de phénodéviations chez la famille des Chironomidae, ils mettent en évidence une forte corrélation entre présence d'arsenic, de cadmium, de cuivre, de plomb et de zinc dans les sédiments et niveau de difformités du mentum. **L'absence d'augmentation du taux de phénodéviations chez le groupe exposé au sédiment d'Andrésey pourrait être expliquée par la sélection, au cours du développement, des larves les moins difformes.** En d'autres termes, la baisse du taux d'émergence observée dans le groupe d'Andrésey serait liée à une mortalité accrue au cours des premiers stades larvaires des individus présentant un taux

5. Le terme tératogène est utilisé pour définir un agent qui affecte physiquement ou bien chimiquement les mécanismes de développement d'un organisme et qui produit des difformités structurales (Jørgensen, 2010).

élevé de phénodéviation (Dias, 2010). C'est ce que constatent également Dias *et al.* (2008) chez *Chironomus riparius* en présence d'uranium dans la phase sédimentaire. Il est à noter que nous observons un fort taux de difformités du mentum dans le groupe témoin de l'essai d'Andrésey. Ceci pourrait être lié à une dérive génétique (consanguinité) de la population de l'essai d'Andrésey (Bird *et al.*, 1995), qui est, comme le soulignent Nowak *et al.* (2007), un phénomène stochastique.

Nous notons l'**apparition de Khön gap du mentum chez le groupe exposé au sédiment d'Andrésey**. Ce résultat nous amène à penser que ce type de phénodéviation est caractéristique d'un stress environnemental élevé. Cette observation a également été faite par Janssens de Bisthoven *et al.* (1998c) chez *Chironomus riparius* exposé à du cuivre ou à du plomb ou bien par Groenendijk *et al.* (1998) chez cette même espèce provenant de sites très contaminés par des métaux lourds. En revanche, alors que la phénodéviation consistant en une fusion de dents était inexistante chez les groupes témoins des essais au plomb et au nonylphénol, nous voyons apparaître ce type de phénodéviation chez l'un des groupes témoins, ce qui suggère que l'apparition de cette anomalie n'est pas caractéristique d'une exposition toxique.

Les AF diminuent significativement entre le groupe témoin et le groupe exposé au sédiment d'Orcemont. Aucune mortalité n'ayant été constatée, cette diminution ne peut pas être imputée au phénomène de sélection. Elle pourrait être, en revanche, **expliquée par un stress alimentaire supérieur pour le groupe témoin**. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, le sédiment d'Orcemont présente, à la différence du sédiment témoin artificiel, une part de matière organique disponible pour l'alimentation du chironome. Or certains travaux ont mis en évidence chez *Onthophagus taurus* (coléoptère) ou bien chez *Lestes sponsa* (odonate), un lien entre le niveau d'AF et la quantité de nourriture disponible (Hunt et Simmons, 1997 ; Stoks, 2001). Il est à noter qu'au contraire, Stige *et al.* (2004) ou bien Campero *et al.* (2008) ont montré chez *Daphnia magna* (crustacé) et chez *Coenagrion puella* (odonate) respectivement, qu'un stress alimentaire n'avait aucun effet sur le niveau d'AF.

Les AF diminuent également significativement entre le groupe témoin et le groupe exposé au sédiment d'Andrésey. Comme nous l'avons évoqué pour expliquer la non augmentation des phénodéviation entre le groupe témoin et le groupe exposé, la **pression de sélection** pourrait favoriser la disparition des individus les moins stables en terme de développement, ce qui expliquerait la baisse du niveau d'AF. C'est ce que constatent également Polak *et al.* (2002) chez *Drosophila melanogaster* exposée à de l'arsenic.

Nous remarquons une **variation de la forme moyenne du mentum significative entre le groupe témoin et le groupe d'Orcemont**. Néanmoins, nous ne pouvons conclure, en l'état actuel des connaissances, qu'il s'agit là d'un effet toxique. En effet, d'autres paramètres, tels que la quantité de matière organique disponible ou bien encore la granulométrie, diffèrent entre les deux groupes. Le sédiment d'Orcemont possède ainsi une fraction de sable grossier supérieure à celle du sédiment témoin. En outre, nous remarquons que les dents du mentum des organismes provenant du sédiment d'Orcemont sont émoussées, ce qui laisse supposer que cette diminution de taille serait davantage liée à un **effet mécanique** (abrasion) qu'à un effet toxique. L'influence de la granulométrie du substrat sur l'usure des dents du mentum a également été observée par Bird (1997) et Jeyasingham et Ling (1997).

De même, nous observons un **changement de la forme moyenne ainsi qu'une diminution de la taille centroïde du mentum statistiquement significatifs entre le groupe témoin et le groupe exposé au sédiment d'Andrésey**. Cette variation de la forme moyenne

pourrait être expliquée non seulement par les différences physico-chimiques entre les deux sédiments mais également par la présence de toxiques dans la matrice d'Andrésey. En effet, dans ce sédiment l'usure du mentum semble relativement limitée ; la taille des dents ne diminuant pas entre le groupe témoin et le groupe exposé.

À la différence des essais portant sur les sédiments artificiels dopés au plomb ou bien au 4-NP (cf. partie 2 du chapitre 4), la séparation entre l'essai d'Orcemont et l'essai d'Andrésey est visible sur l'axe 2 et non sur l'axe 1 de l'ACV, ce qui suggère que le facteur génétique possède un rôle secondaire. La variation de la forme moyenne observée la plus importante consiste, en effet, en une diminution de la taille des dents dans l'essai d'Orcemont qui est probablement liée à un phénomène d'abrasion.

Les principaux résultats obtenus sur l'essai d'Orcemont sont les suivants :

1. le sédiment d'Orcemont présente une faible contamination en métaux lourds et en hydrocarbures ;
2. la croissance larvaire est plus rapide dans ce sédiment, phénomène qui pourrait être expliqué par la présence, dans cette matrice, de matière organique disponible pour l'alimentation de la larve ;
3. le taux de phénotypiques augmente de façon statistiquement significative chez les larves exposées ce qui suggère un effet toxique ;
4. néanmoins, le niveau d'AF diminue significativement, ce qui suggère que la différence d'alimentation constitue un stress pour les larves ;
5. la forme moyenne du mentum est affectée par l'exposition au sédiment d'Orcemont. Toutefois, compte tenu de la granulométrie relativement grossière de ce sédiment, cette variation de forme, consistant en une diminution de la taille des dents, pourrait être liée à un phénomène d'abrasion.

Les principaux résultats obtenus sur l'essai d'Andrésey sont les suivants :

1. le sédiment d'Andrésey présente une contamination élevée, en métaux lourds et en hydrocarbures, d'origine anthropique ;
2. les métaux lourds essentiels (Cu et Zn) et non essentiels (Pb, Ni, Cd et Cr) dosés sont détectés en concentrations élevées dans le corps des organismes ;
3. la croissance ainsi que l'émergence diminuent de façon statistiquement significative chez les organismes ayant crû dans ce sédiment, ce qui suggère un stress environnemental dans cette matrice ;
4. nous notons, en outre, une variation de la forme moyenne significative entre le groupe témoin et le groupe exposé, variation qui pourrait également être liée à un stress environnemental ;
5. toutefois, nous n'observons pas d'augmentation statistiquement significative du taux de phénotypiques. De plus, le niveau d'AF diminue significativement chez les larves exposées. Ces résultats pourraient être expliqués par la sélection des individus les plus stables en terme de développement au cours de la croissance larvaire.

4.4 La métamorphose amplifie t-elle les variations de forme ?

Il s'agit, dans cette partie, d'étudier l'hypothèse selon laquelle les variations de forme sont amplifiées après la métamorphose. Aussi, nous avons mesuré les variations de forme affectant les ailes des adultes provenant de larves ayant été exposées à deux matrices sédimentaires provenant du milieu naturel : l'une caractérisée par une faible pollution d'origine péri-urbaine (station d'Orcemont), l'autre par une forte pollution d'origine urbaine et industrielle (station d'Andrésy) (cf. partie 3 du chapitre 4).

4.4.1 Résultats

4.4.1.1 Taille centroïde des ailes

La taille centroïde diffère de façon statistiquement significative pour les organismes ayant crû dans le sédiment d'Orcemont (figure 4.23), et ce quel que soit le sexe considéré (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W_{\text{femelle}}=4630$ et $W_{\text{mâle}}=2339$, $p \leq 0,05$). Elle est plus grande chez les organismes provenant du sédiment d'Orcemont. Au contraire, la taille centroïde des femelles provenant du sédiment d'Andrésy est plus faible que celle du groupe témoin. Elles diffèrent, en outre, de façon statistiquement significative (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W_{\text{femelle}}=3242$, $p \leq 0,05$).

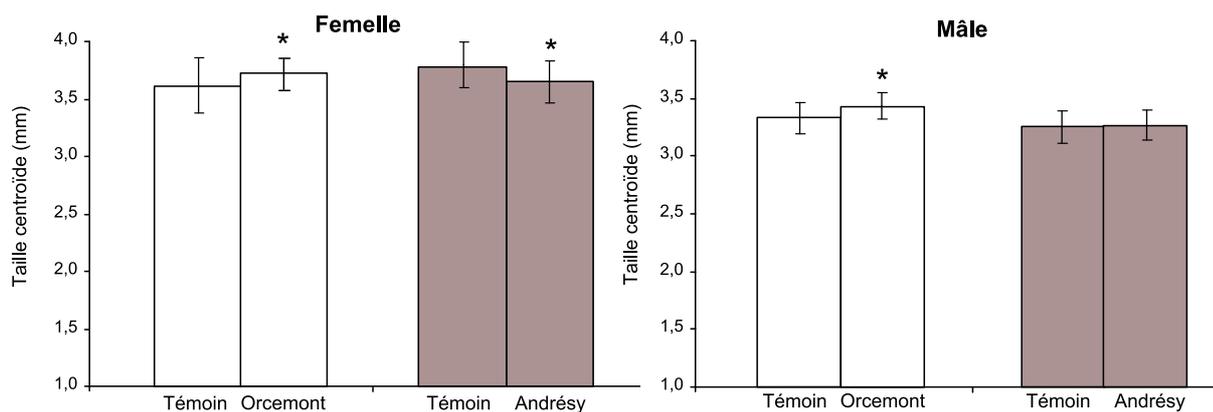


FIGURE 4.23 – Taille centroïde moyenne des ailes des femelles et des mâles en fonction du sédiment étudié

Les barres d'erreur indiquent l'écart-type entre les individus. * : différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

4.4.1.2 Niveaux d'AF de forme des ailes

La représentation graphique des vecteurs d'asymétrie met en évidence l'absence de phénomène d'AA. En outre, aucune AD n'a pu être détectée chez les femelles (tableau 4.17). Chez les mâles, seul le groupe témoin de l'essai d'Andrésy (tableau 4.18) présente un niveau d'AD statistiquement significatif (MANOVA, Tr. Pillai=0,60, $p \leq 0,05$). Aucun effet allométrique significatif n'a, en outre, pu être observé (test de permutation, tous les $p > 0,05$). La répétabilité est supérieure à 82 % ce qui suggère que l'erreur de mesure est faible par comparaison au phénomène d'AF. Ainsi, les asymétries observées consistent en des AF, excepté pour le groupe témoin mâle de l'essai d'Andrésy où de l'AD existe en quantité significative. Les résultats détaillés des ANOVA

sont donnés dans l'annexe 6 (tableaux 4.46 et 4.47).

Pour les femelles et les mâles (tableau 4.17 et tableau 4.18), les effets individu et individu x côté sont statistiquement significatifs pour tous les groupes testés (test F, tous les $p \leq 0,05$). Il n'existe aucune différence statistiquement significative en terme d'AF de forme entre les groupes témoins et les groupes exposés (figure 4.24) aux sédiments d'Orcemont ou bien d'Andrésey, ni pour les femelles ni pour les mâles (test F, tous les $p > 0,05$).

TABLEAU 4.17 – Résultat de l'ANOVA mixte sur la forme des ailes des femelles
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	individu x côté (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	AF10 (10^{-3})
Témoin Orcemont	65	0,9	12,9*	3,0*	0,20	88	4,3
Orcemont	50	4,9	9,7*	3,5*	0,23	88	4,6
Témoin Andrésey	37	3,3	10,7*	2,3*	0,23	82	3,7
Andrésey	30	4,1	9,7*	2,5*	0,23	83	3,8

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$).

TABLEAU 4.18 – Résultat de l'ANOVA mixte sur la forme des ailes des mâles
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	individu x côté (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	AF10 (10^{-3})
Témoin Orcemont	55	1,9	15,6*	3,5*	0,29	84	4,5
Orcemont	40	1,9	9,8*	3,6*	0,20	90	4,6
Témoin Andrésey	35	6,9*	9,2*	2,6*	0,18	87	3,9
Andrésey	30	3,0	12,5*	2,9*	0,28	82	4,1

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$).

La différence du niveau d'AF de forme n'est pas statistiquement significative entre le groupe témoin de l'essai d'Andrésey et le groupe témoin de l'essai d'Orcemont, ni pour les femelles (test F, $F_{670, 329} = 1,16$, $p > 0,05$) ni pour les mâles (test F, $F_{541, 351} = 1,16$, $p > 0,05$).

4.4.1.3 Niveaux d'AF de taille centroïde des ailes

La représentation de la distribution de la différence de la taille centroïde entre l'aile gauche et l'aile droite met en évidence l'absence d'AA pour les mâles et les femelles. Seul le groupe des femelles ayant crû dans le sédiment d'Andrésey (tableau 4.19) présente une AD statistiquement significative (test F, $F_{1, 29} = 4,62$, $p \leq 0,05$). Aucun phénomène significatif d'allométrie n'a pu être observé (test de Spearman, tous les $p > 0,05$). La répétabilité est supérieure à 86 % ce qui suggère que l'erreur de mesure est faible par comparaison au phénomène d'AF. Ainsi, les asymétries observées consistent en des AF, excepté pour le groupe des femelles provenant du sédiment d'Andrésey pour lequel nous observons de l'AD. Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableaux 4.48 et 4.49).

Les effets individu et individu x côté sont statistiquement significatifs pour tous les groupes étudiés (test F, tous les $p > 0,05$). En revanche, il n'existe aucune différence statistiquement significative en terme d'AF de taille centroïde (figure 4.24) entre les groupes témoins et les groupes exposés, ni pour les mâles ni pour les femelles (test F, tous les $p > 0,05$). De même, nous n'observons aucune différence statistiquement significative d'AF de taille centroïde entre les groupes témoins des deux essais écotoxicologiques menés, ni pour les mâles (test F, $F_{47, 30} = 1,33$, $p > 0,05$) ni pour les femelles (test F, $F_{60, 29} = 1,25$, $p > 0,05$).

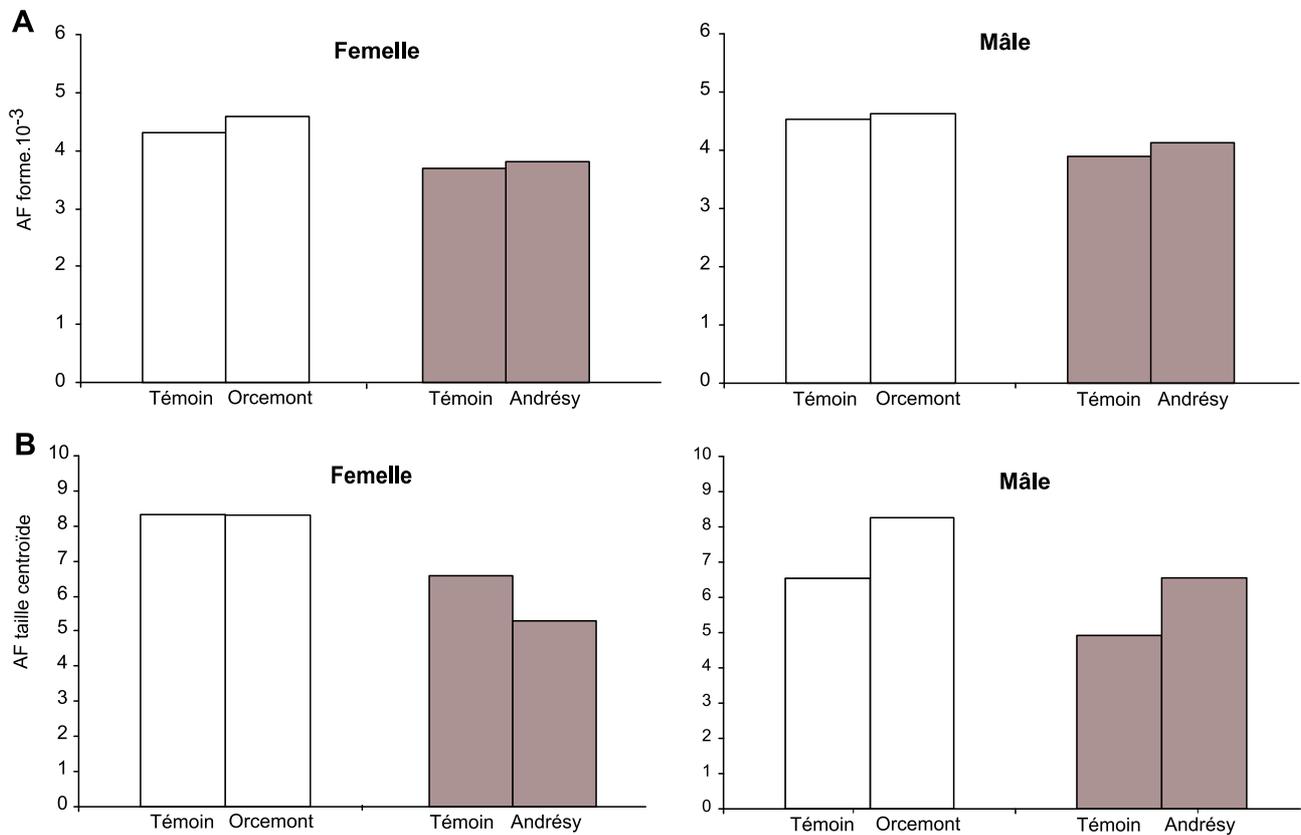


FIGURE 4.24 – AF de forme et de taille centroïde des ailes des femelles et des mâles en fonction du sédiment étudié

A : AF de forme, B : AF de taille centroïde.

TABLEAU 4.19 – Résultat de l'ANOVA mixte sur la taille centroïde des ailes des femelles
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

carré moyen :	effectif	côté	individu	individu x côté	erreur de mesure	ME5 (%)	AF10
Témoin Orcemont	65	5	18627*	111*	3	94	8,3
Orcemont	50	34	6287*	111*	2	96	8,3
Témoin Andrésey	37	79	13215*	74*	6	86	6,6
Andrésey	30	215*	10724*	47*	3	88	5,3

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$)

TABLEAU 4.20 – Résultat de l'ANOVA mixte sur la taille centroïde des ailes des mâles
ME5 : descripteur de l'erreur de mesure, AF10 : indice d'asymétrie fluctuante.

Carré moyen :	effectif	côté	individu	individu x côté	erreur de mesure	ME5 (%)	AF10
Témoin Orcemont	55	56	5785*	72*	5	87	6,5
Orcemont	40	182	4134*	111*	4	94	8,2
Témoin Andrésey	35	24	6634*	41*	2	89	4,9
Andrésey	30	16	3487*	68*	3	93	6,5

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$)

4.4.1.4 Forme moyenne des ailes

Une ACV (figure 4.25) permet de mettre en évidence une séparation selon le premier axe (représentant 68 % de la variance pour le groupe femelle et 52 % pour le groupe mâle) entre les deux sessions d'essai. En particulier, les groupes témoins ayant crû dans les mêmes conditions se séparent qu'il s'agisse des mâles (distance procuste=0,01, $p \leq 0,05$) ou bien des femelles (distance procuste=0,01, $p \leq 0,05$). Ce résultat suggère que la composante génétique possède un rôle non négligeable dans la variation de la forme moyenne de l'aile chez le chironome.

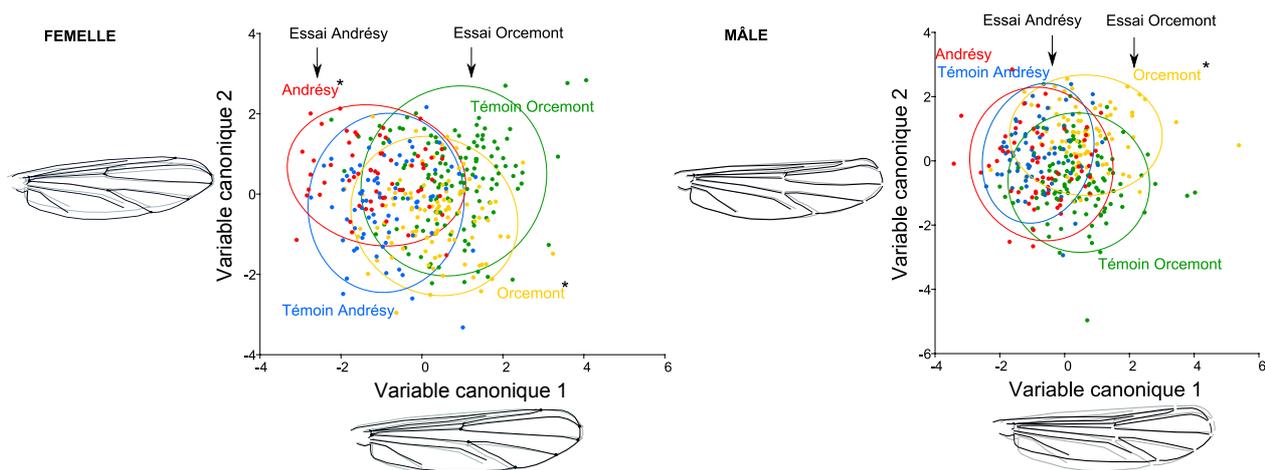


FIGURE 4.25 – Représentation des individus femelles et mâles projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé pour les essais d'Orcemont et d'Andrésey

Les ellipses représentent les ellipses de confiance à 90 % de chaque groupe. Variations de forme le long de chaque axe par superposition des individus extrêmes : les ailes en gris représentent le côté négatif des axes, celles en noir, le côté positif.* : distance procuste entre groupe témoin et groupe stressé statistiquement significative (test de permutation, $p \leq 0,05$).

Sur le deuxième axe (18 % de la variance pour le groupe femelle et 42 % de la variance pour le groupe mâle), nous voyons apparaître des différences entre les groupes témoins et les groupes exposés. En revanche, alors que le groupe témoin femelle de l'essai d'Orcemont est du côté positif, le groupe témoin femelle de l'essai d'Andrésey est du côté négatif. Cette séparation correspond davantage à une séparation, au sein de chaque essai, selon la masse des larves au dernier stade : les groupes présentant les masses larvaires les plus faibles étant du côté positif, ceux présentant les masses les plus élevées du côté négatif.

La variation de la forme moyenne entre le groupe témoin et le groupe exposé (figure 4.26) est significative pour les femelles des essais d’Orcemont et d’Andrésy (Orcemont : distance procuste=0,01, test de permutation, $p < 0,05$; Andrésy : distance procuste=0,009, test de permutation, $p \leq 0,05$). Elles consistent en une diminution de la largeur des ailes chez les individus exposés au sédiment d’Orcemont et en une augmentation chez ceux exposés au sédiment d’Andrésy. Chez les mâles, les variations sont plus faibles. Elles sont non significatives pour l’essai d’Andrésy (distance procuste=0,004, test de permutation, $p > 0,05$) et significatives pour l’essai d’Orcemont (distance procuste=0,007, test de permutation, $p \leq 0,05$).

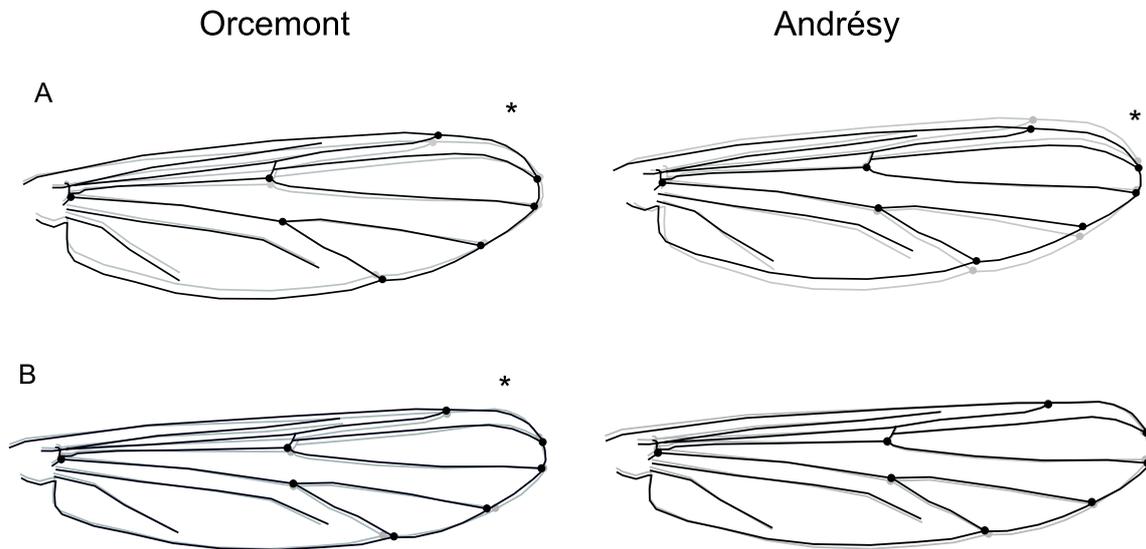


FIGURE 4.26 – Variation de la forme moyenne des ailes des femelles et des mâles
Facteur d’amplification : 5. A : ailes des femelles, B : ailes des mâles. En noir groupes témoins, en gris groupes stressés. * : différence statistiquement significative entre le groupe témoin et le groupe exposé (test de permutation, $p \leq 0,05$).

4.4.2 Discussion

Nous n’observons **pas de variation statistiquement significative d’AF de taille centroïde des ailes entre les adultes** provenant de larves ayant crû dans un sédiment témoin et ceux provenant de larves ayant crû dans le sédiment faiblement contaminé de la station d’Orcemont ou bien dans le sédiment fortement contaminé de la station d’Andrésy. De même, **aucune variation statistiquement significative de l’AF de forme des ailes** n’est relevée. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus sur les adultes de *Chironomus tepperi* (Diptère), de *Lucilia cuprina* (Diptère), d’*Epiphyas postvittana* (Lépidoptère) (Hoffmann *et al.*, 2005), de *Coenegrion puella* (Odonate) (Campero *et al.*, 2008) et d’*Haemotobia irritans* (Diptère) (da Silva *et al.*, 2004) après une exposition des larves à un insecticide. Campero *et al.* (2008) expliquent ce résultat par l’hypothèse du découplage (Moran, 1994) selon laquelle les différents stades de développement (larvaire et adulte) sont indépendants, permettant ainsi l’adaptation de chaque phénotype à son environnement. Ainsi, les variations d’AF observées chez les larves disparaîtraient chez l’adulte grâce à la réorganisation complète se produisant au cours de la métamorphose. En outre, les ailes pourraient présenter une valeur adaptative élevée (Clarke, 1998). Elles seraient, par conséquent, relativement préservées de toutes anomalies morphologiques. Néanmoins, d’autres travaux mettent en évidence une augmentation significative des AF des ailes après une exposition des larves à un stress toxique. C’est ainsi

qu'Hardersen et Frampton (1999) relèvent une augmentation significative des AF de longueur des ailes chez un odonate après une courte exposition de la larve à un insecticide. De même, Dias (2010) montre chez *Chironomus riparius* exposé au cours de son stade larvaire à de l'uranium, qu'à la différence des pattes, les ailes sont particulièrement sujettes aux AF. **Pour le groupe d'Andrésy**, comme l'ont observé Polak *et al.* (2002) sur les soies de *Drosophila melanogaster* exposée pendant son développement larvaire à de l'arsenic, **l'absence d'augmentation du niveau AF de façon statistiquement significative pourrait être liée à une sélection des individus les plus symétriques**; une part significative des organismes provenant de ce sédiment n'ayant pas atteint le stade adulte.

De plus, à la différence de Campero *et al.* (2008) qui observent chez un odonate des niveaux d'AF des pattes et des ailes des adultes supérieurs à ceux mesurés sur les pattes de la larve, nous remarquons que les niveaux d'AF de forme des ailes correspondent à ceux observés sur le mentum des larves (cf. partie 3 du chapitre 4). Piscart *et al.* (2005) remarquent également que le niveau d'AF sur les pattes d'un trichoptère reste constant entre le stade larvaire et le stade adulte. L'hypothèse selon laquelle la métamorphose est un phénomène stressant qui pourrait amplifier l'AF (Campero *et al.*, 2008), n'est, par conséquent, pas validée sur les ailes.

Pour l'essai d'Orcemont, **les variations de la forme moyenne et de la taille centroïde entre le groupe témoin et le groupe exposé sont significatives pour les mâles et les femelles**. Comme nous l'avons évoqué précédemment (cf. partie 3 du chapitre 4), ces variations de forme pourraient être liées non pas au stress toxique mais à la quantité de matière organique disponible pour l'alimentation de la larve supérieure dans le sédiment d'Orcemont. En effet, plus les larves présentent une masse élevée avant la métamorphose, plus les ailes possèdent une taille centroïde importante.

De même, nous observons des **variations de la forme moyenne et de la taille centroïde significatives entre le groupe témoin et le groupe exposé au sédiment d'Andrésy mais uniquement pour les femelles**. Ainsi, comme l'ont relevé Mpho *et al.* (2001) chez un moustique, Servia *et al.* (2006) chez un chironome, Schill *et al.* (2003) chez un gammare ou bien encore Rasmuson (1960) chez une daphnie, **l'effet observé semble être dépendant du sexe étudié**. Cette variation de la forme moyenne pourrait être inhérente à la **présence de toxiques métalliques et organiques** dans la matrice sédimentaire provenant de la station d'Andrésy. En effet, la faible masse des larves ayant crû dans le sédiment d'Andrésy est probablement liée à une consommation d'énergie accrue pour les processus de détoxification (cf. partie 3 du chapitre 4). Comme l'ont observé Servia *et al.* (2006) chez la larve de *Chironomus riparius* exposée à du cuivre, les réserves énergétiques sous forme de lipides des larves femelles pourraient être davantage affectées que celles des mâles. Cette diminution de la quantité d'énergie chez les organismes femelles pourrait alors se traduire par une diminution de la taille centroïde de l'aile des adultes ainsi que par une variation significative de la forme moyenne. Cette hypothèse est confirmée par une ACV sur **la forme moyenne de l'aile des femelles** qui met en évidence, pour les essais d'Andrésy et d'Orcemont, une **séparation** sur le deuxième axe **entre les groupes selon la masse des larves avant la métamorphose**.

Comme l'ont souligné Hoffmann *et al.* (2005), ces résultats nous amènent à penser que **l'étude de la variation de la forme moyenne permet de mettre en évidence un effet toxique sur le phénotype qu'une analyse des AF n'a pas révélé**.

Finalement, grâce aux résultats obtenus sur les essais portant sur l'exposition de larves de *Chironomus riparius* à deux matrices sédimentaires provenant de milieux anthropisés, nous

pouvons résumer les évolutions des niveaux d'AF au cours du cycle de vie du chironome par la figure 4.27 :

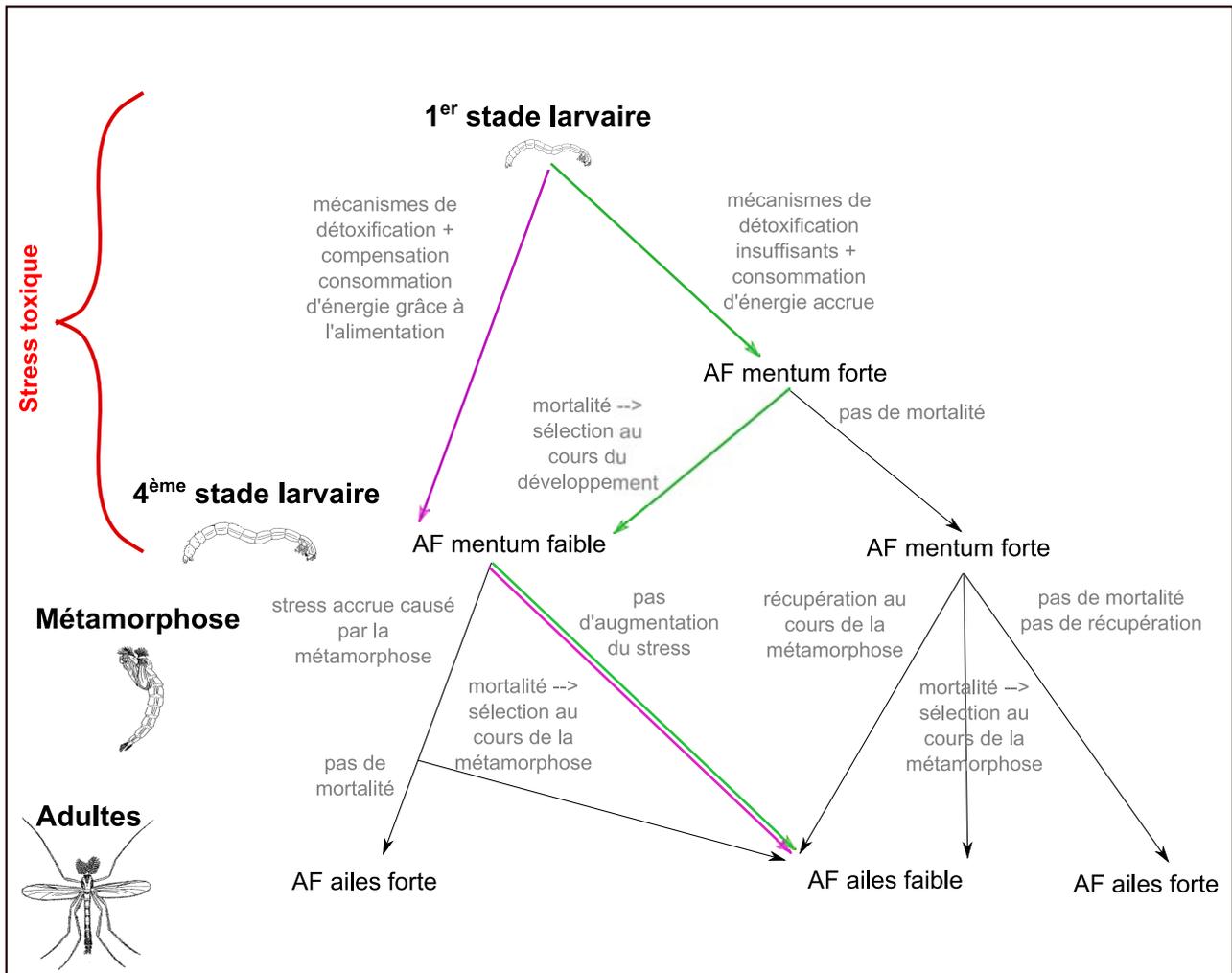


FIGURE 4.27 – Schéma représentant les différentes évolutions du niveau d'AF chez *Chironomus riparius* au cours de son cycle de vie

En violet : évolution proposée pour expliquer les niveaux d'AF observés dans l'essai d'Orcemont. En vert : évolution proposée pour expliquer les niveaux d'AF observés dans l'essai d'Andrésy.

L'analyse des variations de forme des ailes des adultes provenant de larves ayant crû dans deux sédiments prélevés dans le milieu naturel, l'un caractérisé par une faible pollution d'origine péri-urbaine (Orcemont), l'autre par une forte pollution d'origine urbaine et industrielle (Andrésey), révèle :

1. une taille centroïde pour le groupe d'Orcemont significativement supérieure à celle du groupe témoin et une forme moyenne qui diffère significativement, et ce pour les mâles ainsi que pour les femelles. Ce résultat est probablement lié à l'alimentation supérieure dans le sédiment d'Orcemont ;
2. une diminution significative de la taille centroïde des ailes des femelles ayant crû dans le sédiment d'Andrésey qui s'accompagne d'une variation significative de la forme moyenne des ailes. Ainsi, la matrice d'Andrésey pourrait avoir un effet toxique sur les organismes, effet uniquement visible chez les femelles ;
3. Aucune variation statistiquement significative du niveau d'AF entre les groupes témoins et les groupes exposés. Pour le sédiment d'Orcemont, les toxiques ne seraient pas en concentration suffisante pour induire un tel effet. De plus, la présence de nourriture en quantité élevée pourrait permettre aux organismes de lutter contre les effets de la faible pollution présente dans cette matrice. Pour le sédiment d'Andrésey, les individus qui présentent le plus de variations phénotypiques auraient pu disparaître avant leur émergence (hypothèse de la sélection développementale).

Par la suite, nous avons quantifié les variations morphologiques affectant les larves de la génération F1 issue des adultes étudiés dans cette partie.

4.5 Les variations de forme sont-elles transmises ?

Dans cette partie, nous considérons l'hypothèse selon laquelle les variations de forme sont peu transmises à la génération suivante. Pour ce faire, nous avons évalué les variations de forme du mentum affectant la génération F1 issue d'individus dont les larves ont crû dans deux matrices provenant du milieu naturel ; l'une caractérisée par une faible pollution d'origine péri-urbaine (station d'Orcemont), l'autre par une forte pollution d'origine urbaine et industrielle (station d'Andrésey) (cf. partie 3 et 4 du chapitre 4). Pour avoir un aperçu des plans d'expérience, se reporter à la figure 4.28.

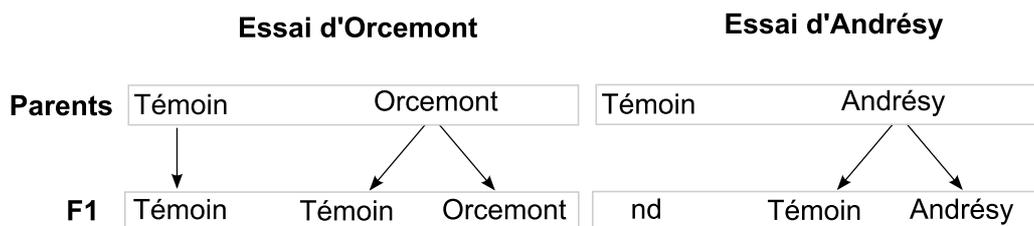


FIGURE 4.28 – Plan d'expérience sur la génération F1 issue de parents exposés aux matrices d'Orcemont ou d'Andrésey
nd : non déterminé car pas d'éclosion des pontes.

Il est à noter que les œufs du groupe témoin de l'essai d'Andrésey n'ont pas éclos. Nous n'avons donc pas pu évaluer les variations de forme affectant la génération F1. Nous n'avons pas d'explication quant à ce problème d'éclosion. Néanmoins, nous avons noté des niveaux de phéno-déviation du mentum anormalement élevés chez les larves de ce groupe.

4.5.1 Résultats

4.5.1.1 Suivi des paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques ont peu varié au cours des essais (tableau 4.21). Les unités expérimentales contenant le sédiment d'Andrésey présentent des conductivités significativement supérieures à celles du groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, $W=1$, $p \leq 0,05$) probablement du fait de la forte minéralisation de ce sédiment (tableau 4.10). En outre, le paramètre conductivité présente un coefficient de variation (CV) élevé, du fait de l'augmentation des valeurs de ce paramètre au cours de l'essai. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ceci est probablement lié à l'évaporation de l'eau et/ou à l'augmentation de l'activité biologique et/ou au relargage des éléments adsorbés sur la phase particulaire au cours du temps.

Concernant l'essai d'Orcemont, aucune variation statistiquement significative du taux d'émergence n'est à relever entre les trois groupes de la génération F1 étudiés (test des proportions unilatéral deux à deux, tous les $p > 0,05$). En revanche, nous notons une légère diminution, mais significative, du taux d'émergence entre le groupe témoin F1 et le groupe Andrésey F1 de l'essai d'Andrésey : il passe en effet de 94 à 87 % (test des proportions, $\chi^2=3,82$, $p \leq 0,05$).

4.5.1.2 Bioaccumulation

Les concentrations en métaux non essentiels (Pb, Ni, Cd et Cr) sont faibles (figure 4.29) dans les groupes F1 ayant crû dans un sédiment témoin et ce quel que soit le groupe parent d'origine

TABLEAU 4.21 – Moyennes et variations des paramètres physico-chimiques au cours des essais
 Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

	Orcemont				Andrésey					
	Témoin- Témoin	CV (%)	Orcemont- Témoin	CV (%)	Orcemont- Orcemont	CV (%)	Andrésey- Témoin	CV (%)	Andrésey- Andrésey	CV (%)
Température (°C)	14,9 ± 0,4	3	14,6 ± 0,5	4	14,6 ± 0,5	4	15,4 ± 0,5	4	15,2 ± 0,5	3
pH	8,2 ± 0,3	5	8,3 ± 0,1	1	8,1 ± 0,2	3	8,1 ± 0,1	1	7,6 ± 0,1	1
Conductivité (µS/cm)	587 ± 64	11	622 ± 99	16	544 ± 70	13	660 ± 160	25	1444 ± 408*	28
Oxygène dissous (mgO ₂ /l)	8,1 ± 0,5	7	8,0 ± 0,5	7	8,0 ± 0,5	7	7,7 ± 0,6	8	7,6 ± 0,6	9
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,8 ± 1,2	nd	0,4 ± 0,7	nd	0,2 ± 0,5	nd	0,9 ± 1,9	nd	0,5 ± 0,9	nd

* : significativement supérieure à la valeur du groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, p≤0,05).

nd : non déterminé car la plupart des valeurs sont inférieures à la limite de quantification (0,5 mg/l).

(témoin ou Orcemont ou Andrésy).

Les larves ayant crû dans le sédiment d'Orcemont et provenant de parents appartenant au groupe d'Orcemont présentent également de faibles quantités de métaux lourds. Cependant, comme nous l'avons observé pour le groupe parent, du nickel est détecté dans leurs corps.

Comme nous avons pu l'observer pour les larves parents ayant crû dans le sédiment d'Andrésy, les larves de la génération F1 élevées dans ce même sédiment présentent des concentrations relativement importantes dans leurs corps en métaux essentiels et non essentiels.

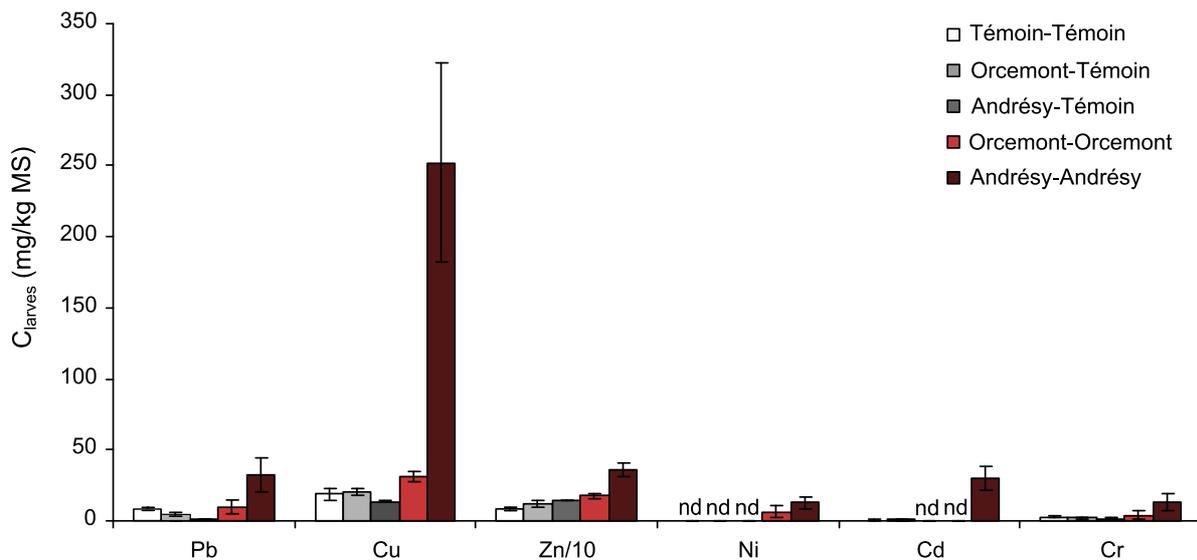


FIGURE 4.29 – Concentrations en métaux mesurées dans les larves de la génération F1 (mg/kg de MS)

Les concentrations en zinc ont été divisées par 10 pour plus de lisibilité. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les trois réplicats. Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

Nous avons effectué le rapport des concentrations mesurées dans le corps des larves de la génération F1 sur celles mesurées dans le corps des larves parents (tableau 4.22). Un rapport proche de 1 indique des concentrations similaires, un rapport supérieur à 1 suggère une accumulation supérieure et un rapport inférieur à 1 reflète une diminution des concentrations en métaux lourds entre les larves F1 et les larves parents.

Un groupe se détache des autres : le groupe Témoin provenant de parents ayant crû dans le sédiment d'Andrésy (noté Témoin/Andrésy dans le tableau 4.22). En effet, les ratios obtenus sont proches de 0. En outre, pour le groupe d'Andrésy provenant de parents appartenant au groupe d'Andrésy, nous notons, par rapport au groupe parent, une concentration moyenne en cadmium 3,7 fois plus importante, une concentration en cuivre 2,2 fois plus élevée et une concentration en plomb 3,9 fois moindre.

TABLEAU 4.22 – Rapport des concentrations moyennes en métaux lourds mesurées dans les larves de la génération F1 sur celles mesurées dans les larves parents

Le premier nom indique le sédiment dans lequel a crû la génération F1, le deuxième celui du groupe parent.

F1/Parents	Pb	Cu	Zn	Ni	Cd	Cr
Témoin/Témoin	2,5	1,4	0,7	nd	nd	nd
Témoin/Orcemont	0,7	0,8	0,9	0,0	nd	nd
Témoin/Andrésey	0,0	0,1	0,3	0,0	0,0	0,1
Orcemont/Orcemont	1,6	1,2	1,4	1,6	nd	nd
Andrésey/Andrésey	0,3	2,2	0,7	0,4	3,7	0,7

nd : non détecté dans le groupe parent.

4.5.1.3 Taux de phénodéviations du mentum

Pour la génération F1 de l'essai d'Orcemont, aucune variation statistiquement significative du taux de phénodéviations entre les trois groupes n'est détectée (test des proportions, $\chi^2=1,39$, $p>0,05$). Ce taux varie entre 5,2 % et 9,6 % (tableau 4.23).

De même, pour la génération F1 de l'essai d'Andrésey, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes étudiés (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,58$, $p>0,05$). Le taux de phénodéviations des organismes provenant du sédiment témoin s'élève à 7,8 % et celui des organismes provenant du groupe d'Andrésey à 4,9 %.

Pour l'essai d'Orcemont, nous observons, par rapport à la génération des parents (figure 4.30) :

- une faible augmentation du taux de phénodéviants chez la génération F1 ayant cru dans un sédiment témoin et provenant de parents non exposés. Cette augmentation demeure, néanmoins, non significative (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,95$, $p>0,05$) ;
- une légère diminution du taux de phénodéviants chez la génération F1 ayant cru dans du sédiment témoin et dont les parents ont été exposés. Cette diminution demeure, néanmoins, non significative (test des proportions unilatéral, $\chi^2=1,04$, $p>0,05$) ;
- un taux de phénodéviants égal chez la génération F1 ayant cru dans le sédiment d'Orcemont et dont les parents ont également été exposés (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0$, $p>0,05$).

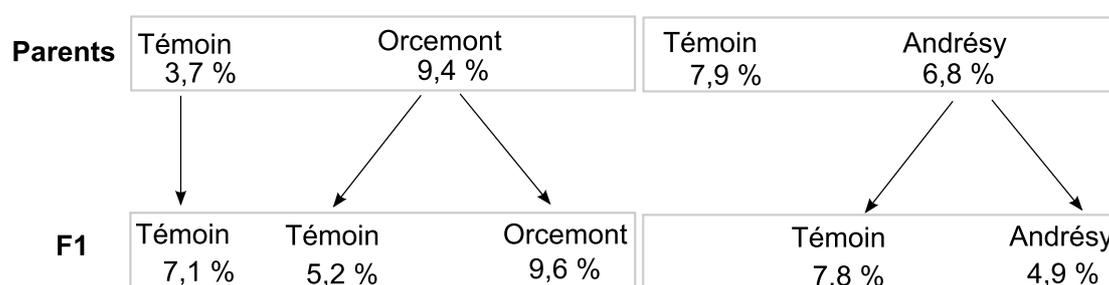


FIGURE 4.30 – Fréquence de phénodéviants chez les groupes parents et la génération F1
A gauche : essai d'Orcemont et à droite : essai d'Andrésey.

Pour l'essai d'Andrésey, nous observons, par rapport à la génération des parents (figure 4.30) :

- une légère augmentation du taux de phénodéviants chez la génération F1 ayant cru dans un sédiment témoin et provenant de parents exposés. Cette augmentation demeure, néanmoins, non significative (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,02$, $p>0,05$) ;

- une légère diminution du taux de phénodéviantes chez la génération F1 ayant cru dans le sédiment d'Andrésy et provenant de parents exposés. Cette diminution demeure, néanmoins, non significative (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,27$, $p>0,05$).

Le groupe témoin provenant de parents ayant crû dans le sédiment d'Andrésy est caractérisé par un score (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b) anormalement élevé (tableau 4.23). Ceci est lié à la présence d'anomalies du type ajout d'une dent, en quantité relativement élevée. Nous notons l'apparition de Khön gap, phénodéviations relativement rare, dans le groupe ayant cru dans le sédiment d'Orcemont et provenant de parents du même groupe.

TABLEAU 4.23 – Pourcentage moyen de phénodéviantes et type de phénodéviations observées
Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

	effectif total	phénodéviantes (%)	ajout dent (%)	absence dent (%)	fusion dents (%)	Khön gap (%)	score ¹
Témoin-Témoin	97	7,1	1,0	4,1	2,0	0,0	60
Orcemont-Témoin	94	5,2	0,0	2,1	3,1	0,0	44
Orcemont-Orcemont	98	9,6	2,1	5,3	1,1	1,1	77
Andrésy-Témoin	141	6,8	6,4	1,4	0,0	0,0	132
Andrésy-Andrésy	143	4,9	2,1	2,1	0,7	0,0	55

1 : d'après Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b)

4.5.1.4 Niveaux d'AF de forme du mentum

La taille centroïde du mentum (figure 4.31) des groupes provenant de parents ayant crûs dans le sédiment d'Orcemont diffère significativement de celle du groupe provenant de parents ayant cru dans du sédiment témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, Orcemont-Orcemont : $W=2022$; Orcemont-Témoin : $W=2348$, $p\leq 0,05$).

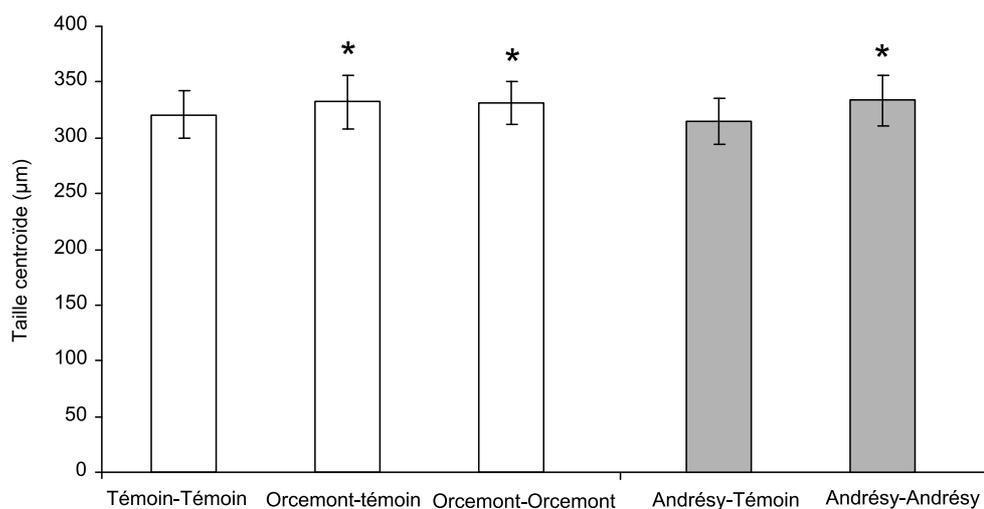


FIGURE 4.31 – Taille centroïde du mentum de la génération F1

* : taille centroïde différente (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $p\leq 0,05$). Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

Concernant la génération F1 issue de parents provenant du sédiment d'Andrésey (figure 4.31), la taille centroïde du groupe d'Andrésey diffère significativement de celle du groupe témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=3583$, $p \leq 0,05$); elle est, en effet, à la différence des résultats observés dans le groupe parental (cf. partie 4 du chapitre 4), légèrement supérieure à celle du groupe témoin.

La représentation graphique des vecteurs d'asymétrie met en évidence l'absence de phénomène d'AA pour tous les groupes étudiés. Néanmoins, l'effet côté est significatif pour ces groupes (tableau 4.24), excepté pour le groupe témoin provenant de parents appartenant au groupe témoin, ce qui suggère l'existence d'AD (MANOVA, tous les $p \leq 0,05$). Aussi ne pouvons-nous pas conclure que les asymétries observées consistent uniquement en des AF. La répétabilité est supérieure à 93 % ce qui indique que l'erreur de mesure est faible par comparaison au phénomène d'AF. Une régression entre la taille centroïde et les vecteurs d'asymétries ne permet pas de révéler d'effet significatif allométrique dans les différents groupes étudiés (test de permutation, tous les $p > 0,05$). Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableau 4.50).

TABLEAU 4.24 – Résultats de l'ANOVA mixte sur la forme du mentum chez la génération F1 des essais d'Orcemont et d'Andrésey

ME5 : descripteur de l'erreur de mesure. AF10 : indice d'asymétrie fluctuante. Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

Carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	individu x côté (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	AF10 (10^{-3})
Témoin-Témoin	81	2,0	5,6*	3,8*	0,10	95	4,9
Orcemont-Témoin	79	6,0*	5,6*	3,1*	0,09	94	4,3*
Orcemont-Orcemont	68	3,4*	6,5*	3,2*	0,12	93	4,4*
Andrésey-Témoin	112	7,1*	6,1*	3,6*	0,10	94	4,7
Andrésey-Andrésey	116	7,7*	7,9*	2,7*	0,10	93	4,0*

* : effet statistiquement significatif ($p \leq 0,05$)

Au sein de la génération F1 de l'essai d'Orcemont (tableau 4.24), nous notons des niveaux d'AF significativement plus faibles chez les organismes issus de parents appartenant au groupe d'Orcemont et ce quel que soit le sédiment dans lequel les larves F1 ont crû (Orcemont-témoin : test F, $F_{2043,1977}=1,12$, $p \leq 0,05$; Orcemont-Orcemont : test F, $F_{2043,1674}=1,10$, $p \leq 0,05$).

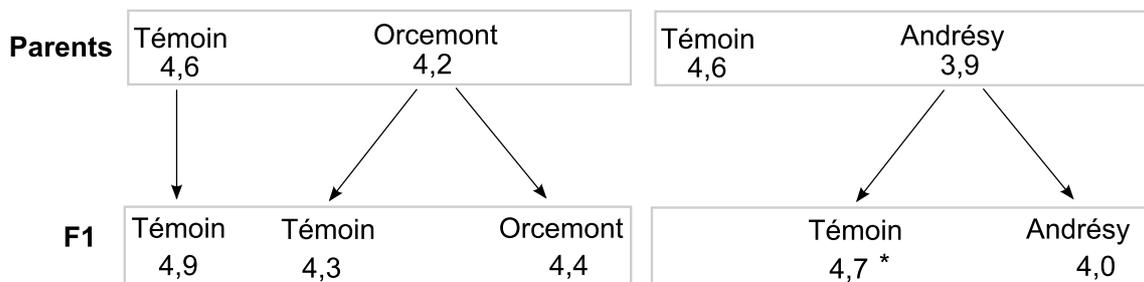


FIGURE 4.32 – Niveau d'AF de forme du mentum chez les groupes parents et la génération F1
A gauche : essai d'Orcemont et à droite : essai d'Andrésey. * : différence statistiquement significative avec le groupe parent (test F, $p \leq 0,05$)

Au sein de la génération F1 de l'essai d'Andrésey (tableau 4.24), nous notons un niveau d'AF significativement plus faible chez les organismes ayant crû dans le sédiment d'Andrésey (test F, $F_{2822,2875}=1,16$, $p \leq 0,05$) .

Pour l'essai d'Orcemont, par rapport à leurs parents, aucune variation statistiquement significative du niveau d'AF n'est observée chez la génération F1 (test F, tous les $p > 0,05$) (figure 4.32).

Pour l'essai d'Andrésey, nous observons une augmentation significative du niveau d'AF entre le groupe F1 ayant crû dans du sédiment témoin et leurs parents provenant du sédiment d'Andrésey (test F, $F_{4018,2822}=1,21$, $p \leq 0,05$) (figure 4.32).

4.5.1.5 Forme moyenne du mentum

La projection des individus sur le premier axe de l'analyse canonique de la variance révèle une séparation entre les groupes stressés et les groupes témoins, et ce pour l'essai d'Orcemont (figure 4.33) pour lequel cet axe représente 62 % de la variance observée, ou bien celui d'Andrésey (figure 4.34) pour lequel cet axe représente 48 % de la variance observée. Ainsi, le substrat utilisé semble jouer un rôle prépondérant dans la forme moyenne du mentum.

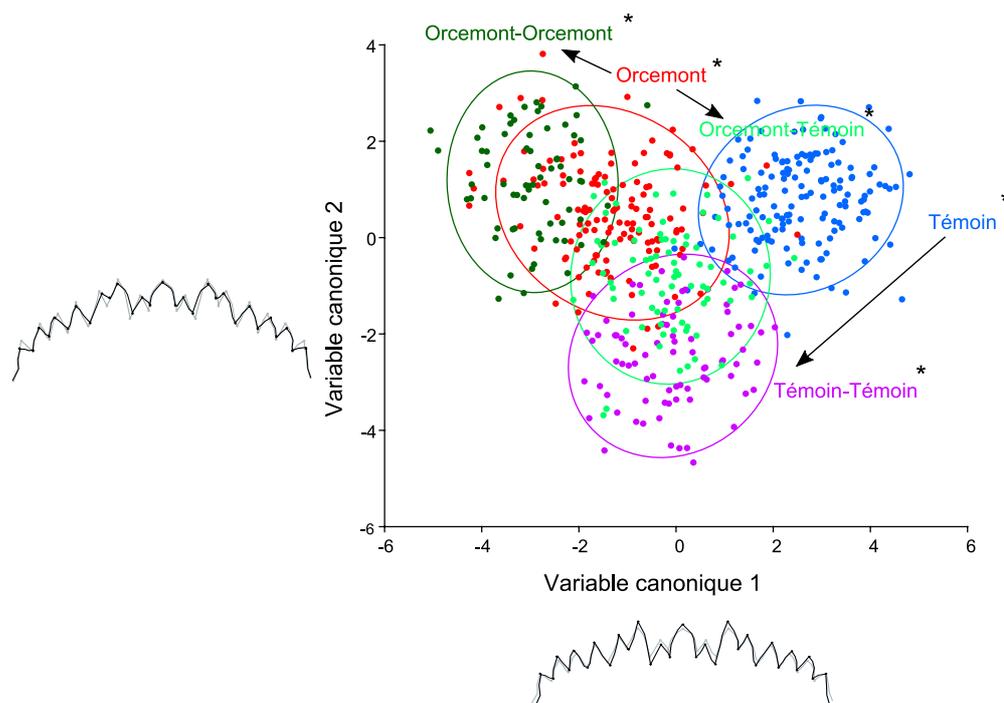


FIGURE 4.33 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé (génération parentale et F1 de l'essai d'Orcemont)

Les ellipses représentent les ellipses de confiance à 90 % de chaque groupe. Variations de forme le long de chaque axe par superposition des individus extrêmes : les menta en gris représentent le côté négatif des axes, ceux en noir le côté positif. * : toutes les distances procuste entre les groupes étudiés sont statistiquement significatives (test de permutation, $p \leq 0,05$). Le point initial des flèches indique le groupe parent, le point terminal la génération suivante.

Comme nous l'avons observé pour la génération parentale, la variation de la forme moyenne entre les groupes de la génération F1 ayant crû dans du sédiment témoin et celui ayant crû

dans le sédiment d'Orcemont consiste en une diminution de la taille des dents (figure 4.33).

Concernant l'essai d'Andrésey, comme nous l'avons observé pour la génération parentale, la variation de la forme moyenne entre le groupe F1 ayant crû dans le sédiment témoin et celui ayant crû dans le sédiment d'Andrésey consiste en une augmentation de l'angle séparant les dents de la zone externe de celles de la zone latérale (figure 4.34).

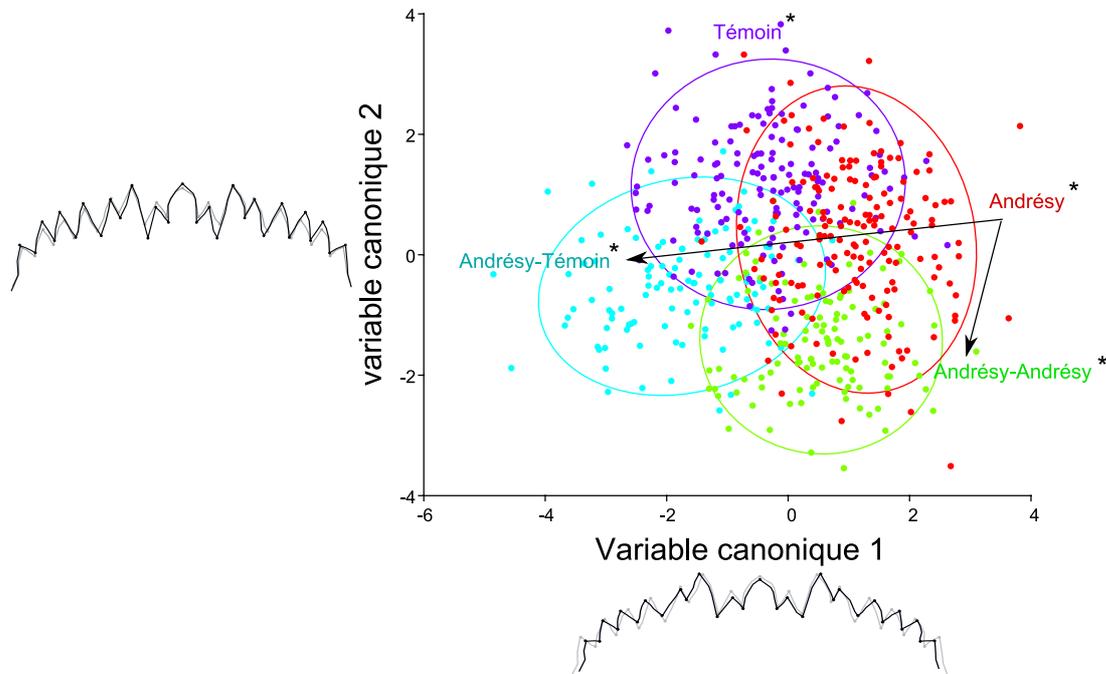


FIGURE 4.34 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé (génération parentale et F1 de l'essai d'Andrésey) cf. légende précédente.

Pour l'essai d'Andrésey, l'axe 2 (représentant 39 % de la variance) sépare préférentiellement les groupes parents des groupes appartenant à la génération suivante (F1) : la génération parentale se trouve préférentiellement du côté positif de l'axe, tandis que la génération F1 se trouve préférentiellement du côté négatif. Ainsi, l'axe 2 pourrait représenter les variations génétiques.

Pour l'essai d'Orcemont, la séparation selon l'axe 2 (26 % de la variance totale observée) est beaucoup moins claire. Si les groupes parents sont préférentiellement du côté positif de l'axe, nous notons également que le groupe F1 ayant crû dans le sédiment d'Orcemont et provenant du groupe parent d'Orcemont se situe également de ce côté de l'axe.

Il est à noter que la forme moyenne du mentum diffère de façon significative entre tous les groupes étudiés et ce quel que soit l'essai considéré (test de permutation, tous les $p \leq 0,05$) (figure 4.33 et figure 4.34).

4.5.2 Discussion

L'analyse des **métaux** essentiels (Cu et Zn) et non essentiels (Pb, Ni, Cd, Cr) présents dans le corps des larves de la génération F1 indique que ces éléments **ne sont pas transmis des parents à la génération suivante**. En particulier, les larves du groupe témoin provenant de parents ayant crû dans le sédiment d'Andrézy, présentent des concentrations similaires à celles usuellement mesurées dans les groupes témoins. Ce résultat est probablement en lien avec le phénomène d'élimination des toxiques survenant au cours de la métamorphose (cf. partie 1 du chapitre 4). De plus, les toxiques susceptibles d'être présents dans les pontes (cf. partie 1 du chapitre 4), pourraient ne pas pénétrer dans les œufs. En effet, Kosalwat et Knight (1987) ont montré que la coquille de l'œuf de *Chironomus decorus* constituait une barrière protectrice contre la pénétration du cuivre.

Il existe une légère réduction du taux de phénodéviation (différence toutefois non statistiquement significative) entre la génération parentale appartenant au groupe d'Orcemont et la génération F1 ayant crû dans un sédiment artificiel témoin : il passe en effet de 9,4 % à 5,2 %. Groenendijk *et al.* (1998) ont également observé chez *Chironomus riparius* provenant de sites contaminés par des métaux lourds une fréquence de Khön gaps variant entre 5,6 et 7,9 % qui chute à 0 % chez les générations F1 élevées en laboratoire sur substrat propre. De même, Martinez *et al.* (2004) mesurent chez la génération parentale de *Chironomus tentans* exposée à du zinc en laboratoire une fréquence de phénodéviation du mentum de 14 % qui chute à 1,7 % chez la génération F1 élevée sur substrat propre. Cette diminution suggère qu'**une partie des phénodéviation observées dans le groupe d'Orcemont n'est pas transmise à la génération suivante**. Toutefois, compte tenu du fait que le taux de phénodéviant relevé dans la génération parentale s'élève à 9,4 % et que nous n'avons prélevé que cinq pontes⁶ pour constituer les groupes de la génération F1, il semble peu probable que les pontes utilisées soient issues d'individus difformes. De plus, les individus présentant des phénodéviation importantes pourraient se révéler moins féconds. Il a par exemple été montré que les larves difformes pouvaient présenter une croissance plus faible, un taux d'émergence moindre ainsi que des déplacements réduits (Gerhardt et Janssens de Bisthoven, 1995 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998a). Il semble, par conséquent, prématuré de conclure quant au caractère héritable des anomalies morphologiques observées. Il semble toutefois qu'une partie des phénodéviation relevées dans ce travail possède une origine environnementale. En l'absence de pression toxique, la fréquence mesurée dans une population serait inférieure à 7 %, en présence d'un stress elle pourrait alors dépasser les 9 %. Nous retrouvons ainsi le seuil de 8 % proposé par Vermeulen *et al.* (1998) pour séparer un sédiment faiblement contaminé d'un sédiment très faiblement contaminé.

Pour l'essai d'Orcemont, par rapport à la génération parentale, nous n'observons chez la génération F1 aucune variation statistiquement significative du niveau d'AF. Ce résultat est surprenant car, compte tenu des conclusions de la partie 3 du chapitre 4, nous aurions pu nous attendre à une augmentation des AF chez les larves F1 provenant du groupe parent d'Orcemont et ayant crû dans du sédiment témoin. En effet, nous avons alors expliqué le niveau bas d'AF du groupe d'Orcemont par la présence de matière organique biodisponible et par conséquent, par une alimentation supérieure dans ce sédiment. Or, ces résultats démontrent que les niveaux d'AF sont transmis à la génération suivante et ce indépendamment du substrat sédimentaire et par conséquent de la quantité d'aliment disponible. Aussi, **les AF observées dans l'essai d'Orcemont ne posséderaient pas une origine environnementale mais génétique**. Par conséquent, nous pouvons penser, comme l'ont suggéré Stige *et al.* (2004) chez *Daphnia magna*,

6. Une femelle ne pondant qu'une fois, chaque ponte provient d'une femelle différente. Le nombre total d'adultes (mâles et femelles) était compris entre 150 et 200 pour chaque condition testée.

que la différence d'alimentation n'a que peu d'effet sur le niveau d'AF.

Le taux de phénotypiques des larves de la génération F1 exposées au sédiment d'Andrésy est faible. Une partie des organismes n'ayant pas atteint le stade adulte ; ce résultat est probablement lié à une mortalité supérieure des larves les plus difformes (**sélection au cours du développement**) (Dias *et al.*, 2008). En outre, en l'absence de pression toxique, c'est à dire lorsque la génération F1 est placée dans un sédiment artificiel témoin, la fréquence de phénotypiques retrouve une valeur proche de celle mesurée dans le groupe parent ayant crû dans un sédiment témoin.

Les variations du niveau d'AF de l'essai d'Andrésy sont similaires à celles de la fréquence de phénotypiques. Nous observons, par rapport à la génération parentale appartenant au groupe d'Andrésy, une augmentation statistiquement significative des AF chez les individus F1 ayant crû dans un sédiment artificiel témoin. Ce résultat confirme l'hypothèse émise précédemment : le niveau d'AF relativement bas du groupe d'Andrésy serait à mettre en relation avec une mortalité accrue des larves les plus asymétriques. En l'absence de pression de sélection, ce niveau retrouverait une valeur comparable à celle mesurée dans le groupe parent témoin. En d'autres termes, dans le sédiment d'Andrésy, **la sélection favoriserait les individus phénotypiquement stables ce qui se traduirait par une diminution du niveau d'AF et par un taux de phénotypiques relativement bas.**

L'analyse canonique de la variance permet de mettre en évidence **une forme moyenne du mentum largement corrélée au sédiment dans lequel les larves ont crû.** En effet, lorsque l'on place des larves de la génération F1 issues de parents exposés dans un sédiment artificiel témoin, leurs menta retrouvent une forme proche de celle des groupes témoins. Ce résultat suggère une faible transmission des changements de la forme moyenne du mentum associés aux sédiments d'Orcemont et d'Andrésy. Par conséquent, nous pouvons penser que ces changements ont une origine environnementale et non génétique. Pour le sédiment d'Orcemont, ils pourraient être liés à un effet mécanique d'abrasion tandis que pour le sédiment d'Andrésy, ils pourraient être expliqués par un effet toxique des contaminants présents dans la matrice (cf. partie 3 du chapitre 4).

Nous notons, en outre, une séparation des groupes, selon l'axe 2 de l'ACV, en fonction de la génération (parent ou F1), ce qui suggère, comme nous l'avons évoqué dans les parties précédentes, que **la génétique joue également un rôle important dans la forme moyenne du mentum observée.**

Pour conclure, il ressort de l'analyse des variations de forme du mentum affectant la génération F1 provenant de parents exposés aux matrices sédimentaires d'Orcemont ou d'Andrésey :

1. une légère diminution du taux de phénodéviations chez les organismes du groupe d'Orcemont dont la génération F1 a été remise dans un sédiment témoin. Ceci amène à penser qu'une partie des difformités du groupe d'Orcemont n'est pas transmise à la génération suivante. Elle pourrait posséder une origine environnementale ;

2. une diminution du taux de phénodéviations et du niveau d'AF lorsque l'on place les larves sur deux générations dans le sédiment d'Andrésey, ce qui suggère une sélection des individus présentant un phénotype stable ;

3. une augmentation des phénodéviations et des AF entre le groupe parent ayant crû dans le sédiment d'Andrésey et la génération F1 ayant crû dans le sédiment témoin. Ce résultat confirme l'hypothèse émise précédemment : la sélection maintiendrait artificiellement bas non seulement le taux de phénodéviations mais également le niveau d'AF ;

4. une forme moyenne du mentum largement corrélée au substrat dans lequel les larves ont crû, ce qui souligne le rôle essentiel de la matrice sédimentaire dans la forme moyenne du mentum observée.

4.6 Qu'observe t-on dans le milieu naturel ?

Dans cette partie, nous souhaitons vérifier que les variations phénotypiques mesurées en laboratoire sur une souche d'élevage sont proches de celles observées dans le milieu naturel. Nous avons, ainsi, mesuré les variations de forme affectant le mentum des larves de la population de *Chironomus* colonisant la station d'Orcemont, caractérisée par une faible pollution d'origine péri-urbaine. Afin d'évaluer le niveau de variations phénotypiques affectant cette population dans le cas d'une absence de stress toxique, nous avons mesuré les phénotypiques et les AF de la génération F1 de cette population élevée en laboratoire sur un sédiment artificiel témoin. Nous avons, de plus, comparé les résultats obtenus sur cette population à ceux obtenus précédemment sur la souche de laboratoire de *Chironomus riparius* exposée à du sédiment provenant de la station d'Orcemont (cf. partie 3 du chapitre 4).

4.6.1 Résultats

4.6.1.1 Suivi des paramètres physico-chimiques

La température de l'eau de la station d'Orcemont (tableau 4.25) diffère significativement de celle de nos essais en laboratoire (test de Wilcoxon, $W=105$, $p \leq 0,05$). Le pH et l'oxygène dissous diffèrent également significativement (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, pH : $W=0$; oxygène dissous : $W=2$, $p \leq 0,05$) ; ces paramètres sont inférieures dans le milieu naturel à ceux mesurés en laboratoire. En revanche, nous n'observons pas de différence statistiquement significative en terme de conductivité (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=68$, $p > 0,05$).

TABLEAU 4.25 – Moyennes et variations des paramètres physico-chimiques dans le milieu naturel et en laboratoire, essais sur la population de *Chironomus* provenant de la station d'Orcemont

	Orcemont <i>in situ</i>	Orcemont en laboratoire
Température (°C)	18,2 ± 0,6	15,6 ± 0,4*
pH	7,6 ± 0,0	8,2 ± 0,2*
Conductivité (µS/cm)	703 ± 89	621 ± 127
Oxygène dissous (mgO ₂ /l)	6,3 ± 0,2	7,4 ± 0,5*
Densité (individus/m ²)	30380	3704

* : valeur significativement différente de celle mesurée dans le milieu naturel (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $p \leq 0,05$)

La densité de chironomes de la station d'Orcemont est huit fois plus élevée que celle de nos essais en laboratoire (tableau 4.25). L'assemblage de cette station est le suivant : 99 % des chironomes appartiennent au genre *Chironomus* et 1 % à l'espèce *Prodiamesa olivacea*. Cet assemblage, où domine le genre *Chironomus*, est caractéristique des stations riches en matière organique situées à l'aval de stations d'épuration (Bazzanti et Bambacigno, 1987 ; Marques *et al.*, 1999). Nous n'avons pas pu déterminer l'espèce prélevée en raison du manque actuel de connaissances sur la détermination des espèces à partir des larves appartenant au genre *Chironomus* (Wiederholm, 1984).

4.6.1.2 Cycle de vie

La mortalité des larves provenant de la station d'Orcemont placées en laboratoire dans un sédiment artificiel témoin est faible. En effet, le pourcentage moyen de survie s'élève à 94 %. Ce résultat suggère que le sédiment artificiel est adapté à la vie de cette population. En outre, la

masse de ces organismes après 20 jours est élevée (figure 4.35) ; elle diffère significativement de celle des organismes prélevés dans le milieu naturel (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=36$, $p \leq 0,05$).

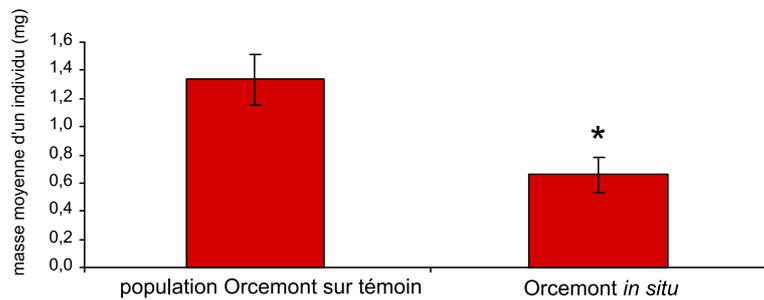


FIGURE 4.35 – Masse moyenne (mg) d’une larve au stade 4 dans la station d’Orcemont et dans cette population élevée pendant 20 jours sur sédiment témoin en laboratoire. Moyenne et écart-type entre les trois réplicats. * : valeur significativement différente de celle de l’autre groupe (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $W=36$, $p \leq 0,05$)

4.6.1.3 Taux de phénodéviations du mentum

Il n’existe aucune différence statistiquement significative entre le taux de phénodéviations affectant les organismes prélevés *in situ* (station d’Orcemont) et celui de la génération F1 provenant de cette population élevée sur un sédiment témoin artificiel en laboratoire (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,58$, $p > 0,05$). Ces taux s’élèvent à 7,4 et 10,7 %, respectivement (en rouge sur la figure 4.36). De même, les scores (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998b) obtenus chez ces deux groupes diffèrent peu (tableau 4.26).

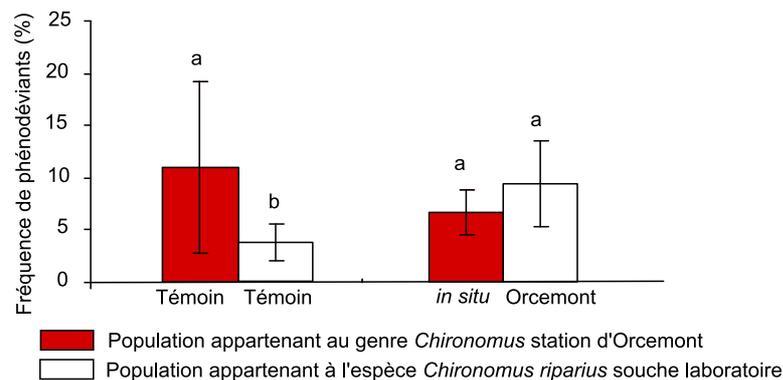


FIGURE 4.36 – Fréquence de phénodéviants dans la population de laboratoire et dans la population de la station d’Orcemont en fonction du substrat étudié. Moyenne et écart-type entre les trois réplicats. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (test des proportions, $p \leq 0,05$).

Nous observons dans le groupe provenant de la population du milieu naturel et élevé sur un sédiment témoin une fréquence de phénodéviants significativement supérieure (figure 4.36) à celle

détectée dans la souche de laboratoire de *Chironomus riparius* élevée sur ce même sédiment (test des proportions unilatéral, $\chi^2=5,14$, $p\leq 0,05$) (cf. partie 3 du chapitre 4). Ces taux s'élèvent en moyenne à 10,7 et 3,7 % respectivement. En revanche, aucune différence statistiquement significative n'est observée entre la fréquence de phénodéviants mesurée dans la population prélevée *in situ* et celle observée dans la population de *Chironomus riparius* maintenue en laboratoire et exposée au sédiment de la station d'Orcemont (test des proportions unilatéral, $\chi^2=0,20$, $p>0,05$). Les valeurs s'élèvent à 7,4 et 9,4 % respectivement.

TABLEAU 4.26 – Pourcentage moyen de phénodéviants et type de phénodéviations observées

	effectif total	phénodéviants (%)	ajout dent (%)	absence dent (%)	fusion dents (%)	Khön gap (%)	double fente dent médiane (%)	score ¹
population Orcemont sur témoin	140	10,7	2,9	5,7	1,4	0,0	0,7	96
Orcemont <i>in situ</i>	136	7,4	1,5	1,5	3,7	0,7	0,0	90

1 : d'après Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b)

Nous notons l'existence de Khön gap, phénodéviations relativement rare, dans le groupe prélevé dans la station d'Orcemont (tableau 4.26).

4.6.1.4 Niveaux d'AF de forme du mentum

La taille centroïde (figure 4.37) du mentum des individus prélevés dans la station d'Orcemont est significativement supérieure à celle des individus appartenant à cette même population élevés sur un sédiment témoin (test de Mann-Whitney-Wilcoxon unilatéral, $W=5180$, $p\leq 0,05$).

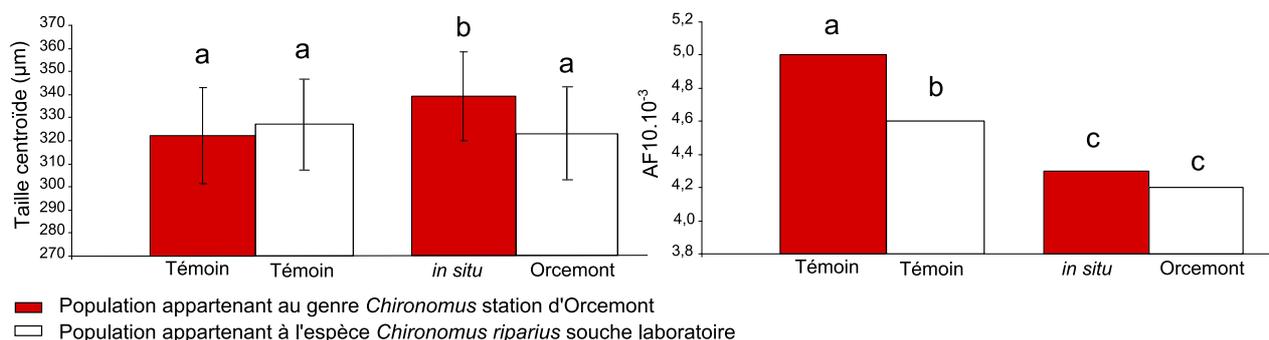


FIGURE 4.37 – Taille centroïde (µm) et AF de forme du mentum

A : taille centroïde (moyenne et écart-type entre les différents individus) et B : niveau d'AF. Les différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes ($p\leq 0,05$).

La représentation graphique des vecteurs d'asymétrie met en évidence l'absence d'AA pour les deux groupes étudiés (population d'Orcemont *in situ* et en laboratoire). Néanmoins, l'effet côté est statistiquement significatif chez les chironomes prélevés dans le milieu naturel (MANOVA,

Tr. Pillai=0,47, $p \leq 0,05$) et chez la génération F1 placée en laboratoire dans du sédiment artificiel (MANOVA, Tr. Pillai=0,53, $p \leq 0,05$), ce qui suggère l'existence d'AD. Aussi ne pouvons-nous pas conclure que les asymétries observées sont uniquement des AF. La répétabilité est supérieure à 92 % (tableau 4.27) ce qui indique que l'erreur de mesure est faible par comparaison aux AF. Une régression entre la taille centroïde et les vecteurs d'asymétries ne révèle aucun effet significatif allométrique (test de permutation, tous les $p > 0,05$). L'effet individu et l'effet côté x individu sont statistiquement significatifs pour les deux groupes étudiés (test F, *in situ* : $F_{2322,4698} = 23,69$; laboratoire : $F_{2187,4428} = 38,89$, $p \leq 0,05$). Les résultats détaillés des ANOVA sont donnés dans l'annexe 6 (tableau 4.51).

TABLEAU 4.27 – Résultats de l'ANOVA mixte sur la forme du mentum, population d'Orcemont

carré moyen :	effectif	côté (10^{-5})	individu (10^{-5})	côté x individu (10^{-5})	erreur de mesure (10^{-5})	ME5 (%)	FA10 (10^{-3})
population Or- cemont sur té- moin	82	4,8*	7,1*	4,0*	0,10	95	5,0*
Orcemont <i>in</i> <i>situ</i>	87	3,1*	8,5*	3,1*	0,13	92	4,3

* : l'influence du facteur est statistiquement significative ($p \leq 0,05$)

Le niveau d'AF des organismes provenant du milieu naturel élevés sur sédiment témoin (tableau 4.27) est significativement supérieur à celui mesuré sur la population en place (test F, $F_{2075,2128} = 1,16$, $p \leq 0,05$).

4.6.1.5 Forme moyenne du mentum

Une analyse discriminante réalisée entre la population prélevée *in situ* et la génération F1 de cette population élevée sur sédiment artificiel témoin en laboratoire met en évidence une différence statistiquement significative forte de la forme moyenne des menta (distance procuste=0,02, test de permutation, $p \leq 0,05$).

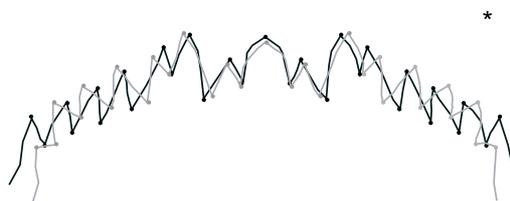


FIGURE 4.38 – Superposition de la forme moyenne du mentum de la population d'Orcemont ayant crû dans le sédiment témoin en laboratoire (en noir) et de cette même population prélevée dans la station d'Orcemont (en gris)

* : distance procuste statistiquement significative entre les deux groupes (test de permutation, $p \leq 0,05$).

Le mentum est plus arqué chez la population prélevée *in situ* (figure 4.38). En outre, alors que le sommet des dents de la zone externe est dirigé vers l'intérieur du mentum chez le groupe élevé sur sédiment artificiel, ce sommet est dirigé vers l'extérieur chez les individus prélevés

dans la station d'Orcemont.

Nous avons également réalisé une ACV entre cet essai et celui portant sur la souche de *Chironomus riparius* de laboratoire exposée aux matrices sédimentaires témoin et provenant de la station d'Orcemont (figure 4.39). Cette ACV permet de mettre en évidence, sur les deux premiers axes, une séparation claire entre les quatre groupes.

Le premier axe qui représente 48 % de la variance sépare les groupes témoins des groupes ayant crû dans le sédiment d'Orcemont. En revanche, la séparation est inversée entre les deux essais : alors que les organismes provenant du substrat témoin se trouvent préférentiellement du côté négatif pour l'essai sur notre souche de laboratoire, ils se trouvent du côté positif pour l'essai sur la population provenant du milieu naturel. Ainsi, cet axe pourrait représenter l'axe du stress, avec du côté négatif les individus les moins stressés et du côté positif les individus les plus stressés : le stress correspondant au changement de substrat par rapport au substrat d'origine de la population.

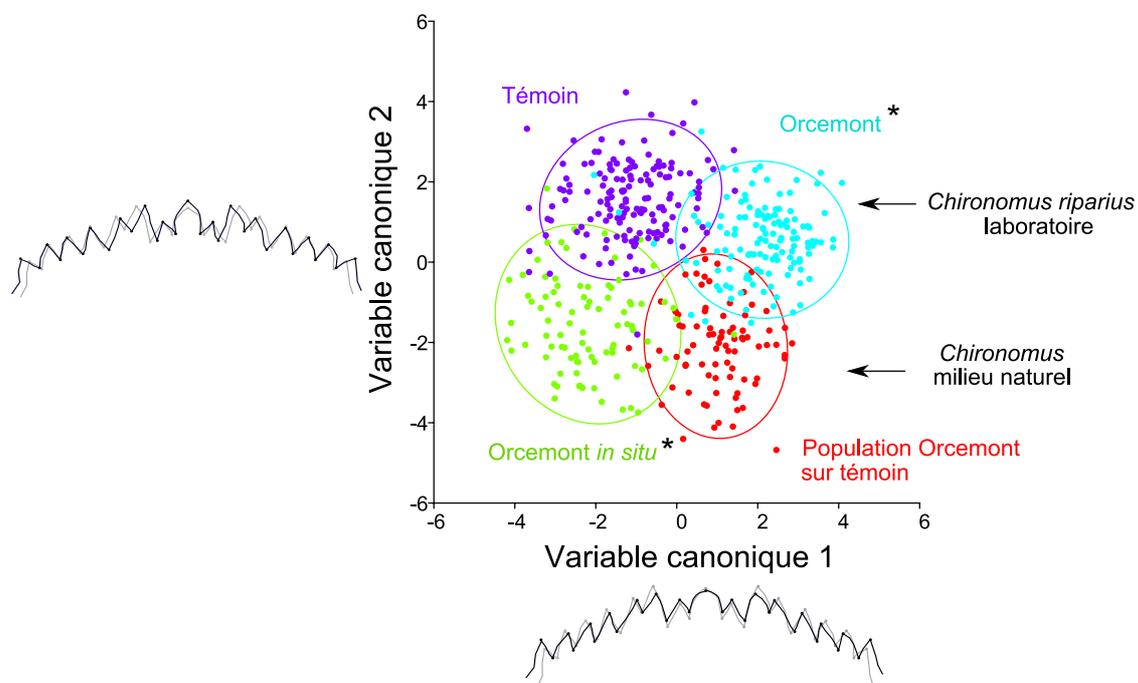


FIGURE 4.39 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 1 et 2 et changement de forme associé

Les ellipses représentent les ellipses de confiance à 90 % de chaque groupe. Variations de forme le long de chaque axe par superposition des individus extrêmes : les menta en gris représentent le côté négatif des axes, ceux en noir le côté positif. * : distance procuste par rapport au groupe témoin statistiquement significative (test de permutation, $p \leq 0,05$).

Le deuxième axe (représentant 37 % de la variance) sépare les deux souches utilisées : celle provenant de notre élevage en laboratoire de celle provenant du milieu naturel.

Enfin, le troisième est dernier axe (figure 4.40) qui représente 15 % de la variance, sépare les individus qui ont crû dans le sédiment témoin de ceux ayant crû dans le sédiment d'Orcemont. Les individus provenant du sédiment d'Orcemont présentent des dents plus petites et ce quelle

que soit la souche considérée (laboratoire ou bien *in situ*). Cette variation de forme est probablement liée à une usure des dents supérieure dans le sédiment d'Orcemont qui possède une fraction de sables grossiers importante.

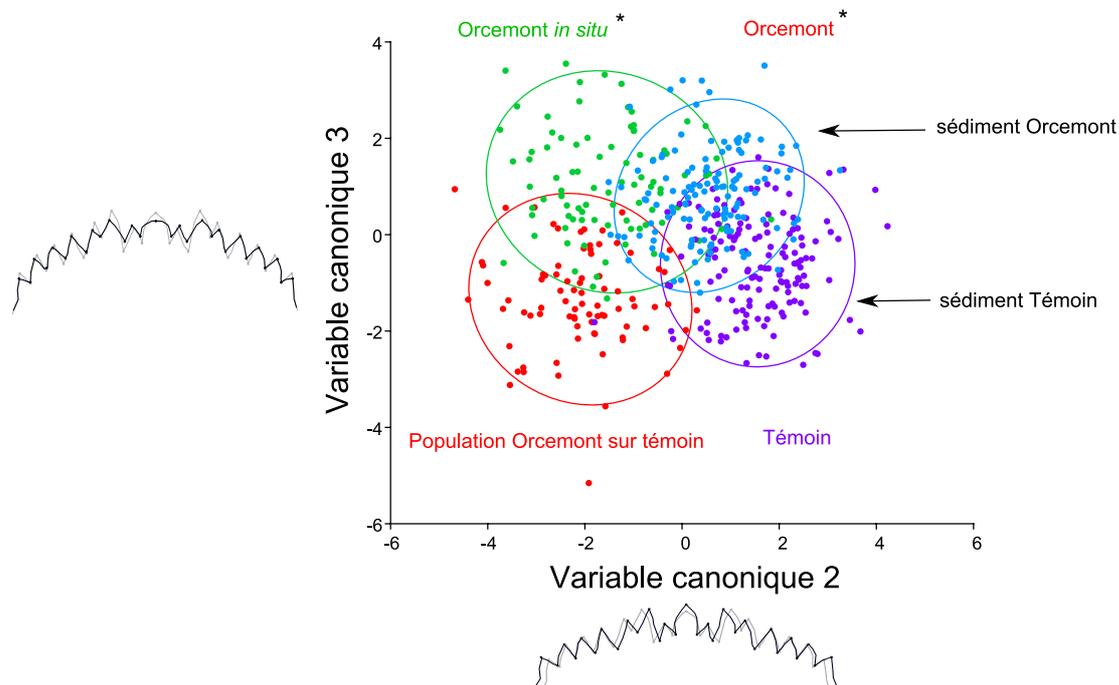


FIGURE 4.40 – Représentation des individus projetés sur les axes canoniques 2 et 3 et changement de forme associé cf. légende précédente.

4.6.2 Discussion

Les niveaux de phénodéviation observés sur notre souche de *Chironomus riparius* de laboratoire exposée au sédiment d'Orcemont et dans la population de *Chironomus* prélevée *in situ* sont similaires. Ainsi, **les essais en conditions contrôlées permettraient a priori d'avoir une estimation correcte** de la pression toxique exercée sur un milieu.

Jeyasingham et Ling (1997) observent chez *Chironomus zealandicus* une diminution des difformités des antennes chez la génération F1 provenant de larves prélevées dans deux stations anthropisées et élevées sur sédiment témoin. De plus, Franck (1983) montre chez une population de chironomes que le taux d'anomalies du mentum passent de 23 % dans le milieu naturel à 1-2 % chez la génération F1 élevée sur sédiment propre en laboratoire. De même, chez *Chironomus anthracinus* provenant d'un milieu contaminé en HAP, Dickman *et al.* (1992) constatent une réduction de 7,7 % à 4 % des anomalies morphologiques du mentum entre une station contaminée et une culture en laboratoire. Groenendijk *et al.* (1998) remarquent que le niveau de difformité du mentum de *Chironomus riparius* provenant d'un site pollué aux métaux lourds retrouve un niveau proche de celui des groupes de référence chez la génération F1 ayant crû dans un sédiment propre. Tous ces résultats amènent à penser qu'une part importante des phénodéviation observées dans le milieu naturel possède une origine environnementale et non génétique et n'est pas transmise à la génération suivante.

Dans notre expérience, au contraire, **la génération F1 de la population provenant de**

la station d'Orcemont que nous avons placée dans un sédiment témoin artificiel présente un taux de phénodéviations élevé, phénomène qu'ont également observé Servia *et al.* (2000) chez les générations F1 de *Chironomus riparius* provenant de deux sites pollués. La fréquence de phénodéviants observée est, en outre, significativement supérieure à celle détectée dans la souche de laboratoire ayant crû dans un sédiment témoin. De même, le niveau d'**AF de forme** de ce groupe est non seulement **significativement supérieur** à celui de la souche de laboratoire élevée sur un sédiment témoin mais également à celui de la génération parentale prélevée dans le milieu naturel. Nous pouvons émettre quatre hypothèses pour expliquer ces résultats.

Premièrement, les variations de forme (phénodéviations et AF) observées pourraient être liées à un stress génétique et seraient, par conséquent, transmises à la génération suivante. Groenendijk *et al.* (1998) constatent également un niveau d'AF méristique sur le mentum de *Chironomus riparius* important chez la génération F1 issue d'une population prélevée dans un milieu contaminé en métaux lourds. Ils imputent ces AF à un stress génétique et non environnemental. En effet, la population qu'ils ont échantillonnée doit, selon eux, être un mélange d'individus tolérants aux métaux lourds et non tolérants car provenant des stations amonts non contaminées. Le stress génétique lié au croisement entre ces deux populations favoriserait un niveau d'AF élevé. La station que nous avons étudiée présente un seuil en amont. Il semble alors peu probable qu'un mélange de populations se produise entre l'amont et l'aval. En outre, si cette hypothèse permet d'expliquer que le niveau d'AF ne diminue pas entre la génération parentale et la génération F1, elle ne permet pas, en revanche, d'expliquer l'augmentation observée entre ces deux générations.

Deuxièmement, le stress toxique exercé dans le milieu naturel pourrait avoir non seulement un effet tératogène mais également un effet mutagène⁷. Cette explication a été proposée par Martinez *et al.* (2004), pour expliquer l'absence de diminution de la fréquence de phénodéviants chez la génération F1 provenant de parents ayant été exposés en laboratoire à du plomb ou à du cuivre (Martinez *et al.*, 2003). Ainsi, le stress toxique exercé dans la station d'Orcemont pourrait avoir un effet mutagène et les effets pourraient, par conséquent, être transmis aux générations suivantes.

Troisièmement, les contaminants accumulés dans le corps de la mère pourraient avoir un effet tératogène sur la génération F1. C'est ce que proposent également Servia *et al.* (2000) pour expliquer la présence de phénodéviations affectant le premier stade larvaire d'une génération F1 de *Chironomus riparius* élevée dans une eau propre et provenant d'une population prélevée dans le milieu naturel. Ainsi, bien que les organismes soient placés dans un sédiment propre, ils pourraient avoir été exposés à des toxiques, *via* la ponte, par exemple. Néanmoins, l'exposition doit demeurer relativement limitée. D'une part, parce que les parents présentent probablement de faibles quantités de toxiques dans leurs tissus. En effet, la métamorphose permet aux organismes de se débarrasser non seulement d'une part importante des métaux et en particulier du plomb (cf. partie 1 du chapitre 4) (Timmermans et Walker, 1989 ; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998c ; Groenendijk *et al.*, 1999) mais également d'une partie des polluants organiques (Bell *et al.*, 2004) accumulés au cours de la phase larvaire. Toutefois, certaines substances organiques pourraient être transmises de la mère à la génération F1. En effet, Bartrons *et al.* (2007) montrent que les concentrations en PBDE et en composés organochlorés augmentent chez certains trichoptères et diptères, entre le dernier stade larvaire et

7. Substance affectant la séquence d'ADN et conduisant à la mutation d'un gène, qui peut être transmise des parents à la génération suivante (Hugues, 1996).

le stade nymphal. De même, Larsson (1984) observe une concentration des PCB, chez le chironome, au cours de la métamorphose. Selon Bartrons *et al.* (2007), cette augmentation des concentrations en toxiques serait liée à la consommation énergétique accrue au cours de la métamorphose qui entraînerait une diminution de la masse des organismes à quantité tissulaire en toxiques constante. D'autre part, parce que, comme l'ont suggéré Kosalwat et Knight (1987) chez *Chironomus decorus*, la coquille des œufs pourrait protéger l'embryon contre la pénétration de toxiques.

Quatrièmement, les mécanismes de tolérance à la pollution développés par la population du milieu naturel, pourraient représenter un coût énergétique considérable (Holloway *et al.*, 1990). Ceci expliquerait la diminution de la stabilité de développement de la population étudiée et ce en l'absence d'un stress toxique. Cette hypothèse a également été émise par Postma *et al.* (1995b) pour expliquer qu'une population de *Chironomus riparius* provenant d'un site très contaminé en cadmium et dont la génération F1 est élevée sur sédiment propre présente un taux de mortalité et un temps de développement larvaire élevés. De même, Dias (2010) remarque qu'une population de *Chironomus riparius* ayant acquis une tolérance à l'uranium présente, dans un sédiment propre, une fécondité et une taille moindres.

Le phénotype de la population étudiée est probablement adapté à son environnement physique et chimique. La sélection est fonction des caractéristiques du milieu, en particulier de la pression toxique (Postma *et al.*, 1995a), du type de substrat (Francis et Kane, 1995), de la quantité de matière organique biodisponible (Warwick, 1975), de la vitesse d'écoulement et de la profondeur. Ainsi, **le stress lié au changement de conditions environnementales** (passage du milieu naturel au laboratoire) **pourrait entraîner une augmentation des niveaux de phénotypages et d'AF.** Les effets du stress seraient d'autant plus importants que l'érosion génétique⁸ serait grande. Or, dans la rivière étudiée, la station d'Orcemont, par comparaison avec des stations avals et amonts, présente un assemblage de chironomes particulièrement pauvre (Arambourou et Chenevoy, 2010), probablement du fait du rejet de la station d'épuration, ce qui suggère une érosion génétique élevée. L'importance de l'adaptation d'un phénotype à son environnement est, en outre, visible à travers l'analyse de la forme moyenne du mentum. En effet, les groupes se séparent préférentiellement non pas selon un gradient de pollution mais selon le type de milieu d'où provient initialement la population. Ainsi, pour la souche de laboratoire adaptée au sable fin de Fontainebleau, le sédiment d'Orcemont à sable grossier et présentant une faible pollution représenterait une source de stress, tandis que pour la souche adaptée au sédiment grossier et très organique de la station d'Orcemont, le sédiment artificiel à sable fin ainsi que les conditions d'élevage en laboratoire (température, profondeur, courant et luminosité) pourraient constituer des éléments stressants.

En outre, comme l'évoquent Servia *et al.* (2000), les phénotypages affectant la génération F1 pourraient également résulter d'une **dysgénésie spontanée**, c'est à dire d'erreurs aléatoires se produisant au cours du développement, indépendantes d'effets génétiques ou tératogènes.

Ces hypothèses ne sont pas exclusives et nos observations résultent probablement d'un effet combiné de ces facteurs.

8. Perte de diversité génétique d'une population soumise à un stress anthropique (van Straalen et Timmermans, 2002).

La comparaison des variations morphologiques affectant une population de *Chironomus* prélevée dans le milieu naturel avec celles affectant la génération F1 issue de cette même population placée en laboratoire sur un sédiment témoin artificiel permet de mettre en évidence, d'une part, un taux de phénodéviation similaire entre les deux groupes et d'autre part, une augmentation significative des AF de forme chez la génération F1. Ceci pourrait être expliqué par :

1. le développement de mécanismes de tolérance dans le milieu naturel qui représenteraient un coût énergétique considérable : la stabilité de développement en serait réduite ;
2. les toxiques présents dans la station d'Orcemont pourraient posséder un effet mutagène : les variations de forme seraient alors transmises à la génération suivante ;
3. en outre, l'érosion génétique liée au rejet de la station d'épuration dans le milieu naturel pourrait contribuer à rendre la population peu apte à tout changement des conditions environnementales.

La comparaison entre les résultats obtenus sur la population de *Chironomus* prélevée dans la station d'Orcemont et ceux obtenus sur notre souche de *Chironomus riparius* de laboratoire exposée à du sédiment provenant de cette station montre des taux de phénodéviation et des niveaux d'AF similaires. Les essais en laboratoire semblent, par conséquent, constituer une bonne représentation des pressions exercées dans le milieu naturel.

Synthèse et perspectives

Le larve de *Chironomus riparius* accumule le plomb dans ses tissus. La métamorphose permet l'élimination de plus de 90 % du plomb accumulé. Si la présence de ce métal non essentiel dans la matrice sédimentaire, pour des concentrations variant entre 3 et 500 mg/kg de MS, n'affecte pas la croissance larvaire de *Chironomus riparius*, nous observons néanmoins une diminution des réserves énergétiques en lipides. Cette énergie est probablement consommée pour les processus de détoxification développés par l'organisme. En particulier, l'augmentation que nous observons du contenu tissulaire en métallothionéines, des protéines qui assurent le piégeage des métaux essentiels et non essentiels, doit résulter d'une activité de synthèse accrue nécessitant de l'énergie. Toutefois, les processus de défense ne paraissent pas suffisants puisque nous mesurons une augmentation du contenu tissulaire en MDA, un produit de dégradation des membranes cellulaires. En outre, la consommation d'énergie observée en présence de plomb pourrait se faire au détriment de celle nécessaire à la stabilité de développement.

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle la présence de plomb dans le sédiment entraîne des effets biochimiques chez *Chironomus riparius* est démontrée.

Néanmoins, les essais menés sur les variations de forme (phénodéviation, AF de longueur et de forme et variation de la forme moyenne) affectant le mentum du chironome en présence de plomb (pour des concentrations variant entre 3 et 457 mg/kg de MS) ou de nonylphénol (pour des concentrations variant entre 0 et 199 mg/kg de MS) soulignent la faible réponse des biomarqueurs ontogéniques étudiés (figure 4.41). En effet, par rapport au groupe témoin, nous ne mesurons aucune variation statistiquement significative de la fréquence de phénodéviant ni du niveau d'AF de longueur. De même, le niveau d'AF de forme varie peu : nous observons uniquement une augmentation statistiquement significative pour le groupe soumis à la concentration en plomb la plus élevée ainsi qu'une diminution statistiquement significative pour le groupe exposé à 184,6 mg/kg de MS de nonylphénol. Des variations statistiquement significatives de la forme moyenne du mentum sont, en outre, détectées chez certains groupes exposés. La réponse observée dépend non seulement de la concentration en toxique dans le milieu mais également de la session d'essai considérée, ce qui suggère que la composante génétique joue un rôle essentiel dans la sensibilité aux toxiques.

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle la présence d'un toxique dans l'environnement favorise l'apparition de variations morphologiques n'est pas validée.

Une augmentation statistiquement significative du taux de phénodéviation du mentum est détectée chez les larves de *Chironomus riparius* ayant crû en laboratoire dans du sédiment provenant d'un milieu caractérisé par une faible pollution d'origine péri-urbaine (Orcemont). Ainsi, la présence d'un mélange de toxiques, en concentrations relativement faibles, participerait à une augmentation des phénodéviation. En revanche, aucun effet statistiquement significatif n'est observé pour des sédiments très chargés en métaux lourds et en substances organiques (Andrésy) et ce alors même que nous mesurons des quantités importantes de métaux essentiels (Cu et Zn) et non essentiels (Pb, Cd, Ni et Cr) dans le corps des organismes. L'absence d'augmentation statistiquement significative du taux de phénodéviant ainsi que la diminution statistiquement significative du niveau d'AF dans le groupe ayant crû dans le sédiment d'Andrésy sont proba-

blement liées à la disparition des organismes présentant un niveau important d'instabilités de développement. Ainsi, la pression de sélection au cours du développement larvaire donnerait un avantage sélectif aux individus les plus stables phénotypiquement. Enfin, nous observons une variation de la forme moyenne du mentum significative entre les groupes témoins et les groupes exposés aux matrices provenant du milieu naturel. Néanmoins, nous ne pouvons conclure, en l'état des connaissances, qu'il s'agit là d'un effet toxique. En effet, d'autres paramètres, tels que la granulométrie et la quantité de matière organique, diffèrent entre les sédiments étudiés. En particulier, les larves provenant du sédiment d'Orcemont présentent des dents émoussées ce qui laisse supposer l'existence d'un phénomène mécanique d'abrasion important dans ce sédiment.

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les variations de forme seraient davantage sensibles à une exposition multiple n'est validée que dans le cas d'une faible exposition. En effet, dans le cas d'une pression toxique élevée, la pression de sélection pourrait occulter ce phénomène en éliminant les individus qui présentent les instabilités de développement les plus fortes.

Sur les ailes des adultes, aucune différence statistiquement significative ni du niveau d'AF de taille centroïde ni du niveau d'AF de forme n'est détectée entre les groupes témoins et les groupes provenant de larves ayant été exposées à deux sédiments provenant du milieu naturel, et ce qu'il s'agisse des mâles ou bien des femelles. Néanmoins, des variations statistiquement significatives de la forme moyenne des ailes sont observées. Pour les organismes provenant du sédiment faiblement contaminé ces variations de forme pourraient être liées à la différence d'alimentation ; une fraction non négligeable de la matière organique étant assimilable par la larve dans ce sédiment. En revanche, pour les adultes provenant de larves ayant crû dans un sédiment très contaminé, la variation de la forme moyenne observée, uniquement visible chez le groupe femelle, pourrait révéler un stress environnemental.

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les variations d'AF seraient davantage visibles après la métamorphose des organismes n'est pas démontrée. Néanmoins, l'étude de la variation de la forme moyenne des ailes des femelles pourrait permettre de révéler une exposition toxique.

La mesure des polluants métalliques (Pb, Cu, Zn, Ni, Cd et Cr) présents dans les larves de la génération F1 élevées sur sédiment témoin propre et provenant de parents ayant crû dans des sédiments contaminés, met en évidence la non transmission de ces éléments à la génération suivante. En outre, nous observons une légère diminution, non statistiquement significative, de la fréquence de phénotypés entre le groupe parent exposé au sédiment faiblement contaminé provenant de la station d'Orcemont et la génération F1 élevée sur un sédiment artificiel témoin. Ainsi, une part des phénotypés mesurés dans le groupe parent pourrait posséder une origine environnementale et non génétique. De plus, nous notons, d'une part, un niveau de phénotypés et d'AF relativement bas chez les individus maintenus sur deux générations dans le sédiment très contaminé provenant de la station d'Andrésey et d'autre part, une augmentation statistiquement significative de ces variations de forme lorsqu'on place la génération F1 issue de parents exposés dans un sédiment artificiel témoin. Ces résultats confirment l'hypothèse émise précédemment d'une sélection au cours du développement larvaire des individus les plus stables. Par ailleurs, nous observons une forme moyenne des menta largement corrélée au type de substrat dans lequel les larves ont crû, ce qui suggère que les caractéristiques physiques et chimiques du sédiment jouent un rôle essentiel dans la forme du mentum observée.

Pour résumé, l'hypothèse selon laquelle une partie des variations de forme observées

n'est pas transmise à la génération suivante est validée. Ces anomalies morphologiques pourraient posséder une origine environnementale.

La comparaison entre les variations de forme (phénodéviation et AF de forme) affectant une population de *Chironomus* prélevée dans une station faiblement contaminée soumise à un rejet de station d'épuration (Orcemont) et les variations de forme affectant la souche de laboratoire de *Chironomus riparius* ayant crû dans le sédiment provenant de cette station, révèle des tendances similaires. Néanmoins, le changement de substrat semble constituer un élément stressant pour les deux populations. C'est ainsi que l'on observe, non seulement un changement de la forme moyenne statistiquement significatif chez la souche de laboratoire placée dans le sédiment provenant du milieu naturel, mais également chez la génération F1 issue de la population du milieu naturel placée dans un sédiment artificiel témoin en laboratoire. Ce résultat suggère l'existence d'une érosion génétique de la population du milieu naturel liée, entre autre, au rejet de la station d'épuration. Cette perte de diversité contraindrait alors la capacité d'adaptation de cette population à tout changement des conditions environnementales.

Enfin, il semble que l'essai en laboratoire puisse constituer une mesure indirecte de la pression toxique exercée dans le milieu naturel. Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution, car il apparaît que les variations de forme du mentum sont également largement dépendantes des caractéristiques physico-chimiques du substrat et des conditions environnementales qui règnent au cours du développement larvaire.

Des variations de forme significatives du mentum, phénodéviation et AF essentiellement, affectant des organismes appartenant au genre *Chironomus* provenant de rivières contaminées en métaux lourds et/ou en substances organiques ont été largement décrites dans la littérature (Clarke, 1993a ; Groenendijk *et al.*, 1998 ; Vermeulen *et al.*, 1998 ; Al-Shami *et al.*, 2011a). Ces anomalies morphologiques résultent probablement d'une exposition à plusieurs toxiques. **En laboratoire, les résultats seraient beaucoup moins probants** (Bleeker *et al.*, 1999 ; Meregalli *et al.*, 2001 ; Langer-Jaesrich *et al.*, 2010) **en raison de l'exposition à un seul et unique contaminant.** Ainsi, si la mesure des phénodéviation et des AF sur le genre *Chironomus* prélevé dans le milieu naturel peut nous renseigner sur l'état de dégradation d'un milieu, nous ne pouvons pas, en l'état des connaissances, déterminer les substances impliquées dans ces variations phénotypiques. De plus, dans les milieux très contaminés, la sélection des individus les plus tolérants (Krantzberg et Stockes, 1989 ; Postma *et al.*, 1995a ; Dias, 2010) pourrait contribuer à sous-estimer le degré de dégradation d'un milieu. Il est à noter que, à la différence des autres types de phénodéviation, le Khön gap n'apparaît que dans les groupes exposés. L'analyse de cette phénodéviation pourrait, par conséquent, constituer un indicateur plus précis de la pression toxique exercée dans un milieu.

Pour chacun des vingt-quatre groupes étudiés, il existe une corrélation significative (test de permutation, tous les $p \leq 0,05$) entre les matrices de covariances liées aux AF et celles liées aux variations individuelles. Cette corrélation entre AF et variations individuelles nous amène à penser, comme l'ont proposé Klingenberg et McIntyre (1998), que les processus de régulation homéostatiques de canalisation et de stabilité de développement reposent sur un même et unique mécanisme. Néanmoins, il est à noter que pour la moitié des groupes, nous observons également une corrélation entre la matrice de covariance d'AF et la matrice de covariance d'erreur de mesure, corrélation qui n'ont aucune raison d'exister. **Aussi ne pouvons-nous pas conclure quant à l'existence d'un même et unique mécanisme contrôlant la canalisation et la stabilité de développement.**

Alors que certains travaux rapportent une corrélation entre la fréquence de phénodéviants et le niveau d'AF (Graham *et al.*, 1993b ; Muzlanov, 2002 ; Polak et Tomkins, 2012), d'autres travaux soulignent l'absence de liens entre ces deux variables (Clarke, 1993c ; Zakharov *et al.*, 2001 ; Stige *et al.*, 2004). Dans ce travail, si l'on superpose les variations d'AF à celles du taux de phénodéviations des 24 groupes étudiés (essais portant sur le plomb, le nonylphénol et sur les deux sédiments étudiés provenant du milieu naturel) (figure 4.41), il apparaît un comportement proche entre ces deux variables. Ainsi, les phénodéviations et les AF pourraient posséder une même origine. Toutefois, un test de Spearman ne permet pas de mettre en évidence une telle corrélation ($S=1399$, $p>0,05$), ce qui suggère que ces deux types de variations morphologiques pourraient être contrôlés par des mécanismes différents. Compte tenu de ces observations, **nous pouvons penser qu'une partie des phénodéviations observées reflète le bruit de développement** - ce qui expliquerait un comportement proche entre le niveau d'AF et la fréquence de phénodéviants - **tandis qu'une autre partie traduirait une mauvaise canalisation** - ce qui expliquerait l'absence de corrélation forte entre ces deux variables -.

Certains travaux suggèrent que l'analyse des AF, qui consistent en des déviations mineures, constitue un indicateur plus sensible que l'analyse de la fréquence de phénodéviations, qui consistent en des déviations sévères (Leary *et al.*, 1984 ; Lens *et al.*, 2002). Néanmoins, dans ce travail, comme l'ont également souligné Clarke (1993c) chez une population de *Chrysopa perla* prélevée à proximité d'une industrie agrochimique ou bien Polak et Tomkins (2012) chez une population de *Drosophila bipunctata* soumise à un stress thermique, **l'analyse du taux de phénodéviants permet de détecter un stress environnemental qu'une analyse du niveau d'AF n'a pas révélé**. Le niveau d'AF varie, en effet, très peu non seulement au sein d'un essai entre les groupes témoins et les groupes exposés mais également entre les différents essais (figure 4.41). Ceci pourrait être lié, chez le chironome, à l'existence de mécanismes de récupération de la symétrie entre les différentes mues. De plus, il est important de noter que sur les 24 groupes étudiés 14 présentent de l'AD. C'est un phénomène courant chez les insectes (Pelabon et Hansen, 2008) mais qui peut occulter les AF (Palmer et Strobeck, 2003). Ces résultats soulignent les difficultés quant à l'utilisation des AF pour détecter un stress toxique chez *Chironomus riparius*.

Au contraire, l'étude de **la variation de la forme moyenne du mentum et des ailes** par morphométrie géométrique semble constituer un marqueur sensible d'une exposition toxique (tableau 4.28). Cependant, ce marqueur est également largement **influencé par la génétique** de la population ainsi que par les caractéristiques physico-chimiques du sédiment. Par conséquent, il s'avère actuellement difficile de l'utiliser afin de mettre en évidence une pression toxique.

Pour conclure, il ressort de ce travail (tableau 4.28) que :

- le niveau d'AF est peu sensible à une exposition toxique, qu'elle soit unique ou multiple ;
- la mortalité des larves exposées au cours de leur croissance biaise les résultats observés en sélectionnant les individus les plus stables phénotypiquement ;
- la réponse des biomarqueurs ontogéniques, en particulier celle de la variation de la forme moyenne, dépend étroitement de la composante génétique de la population ;
- le mentum étant une pièce d'usure, sa forme moyenne est également largement dépendante des caractéristiques physiques du sédiment ;

La faible réponse des biomarqueurs ontogéniques que nous observons pourrait être, en partie, liée à **l'espèce modèle choisie**, qui pourrait se révéler **peu sensible** à une pression toxique.

Les essais sont, par conséquent, à poursuivre sur de **nouvelles espèces modèles**. Les gammares pourraient constituer un groupe intéressant. En effet, ils sont plus sensibles aux polluants organiques et minéraux présents dans la phase aqueuse que les diptères (Von der Ohe et Liess, 2004). Néanmoins, ils s'avèrent plus difficiles à manipuler en laboratoire que le chironome. Par ailleurs, le recours à une **batterie d'organismes** modèles présentant des modes de vie et, par conséquent, des modes d'exposition différents (Carignan et Villard, 2002 ; Ducrot *et al.*, 2005) pourrait se révéler judicieux pour mettre en évidence les effets d'une exposition toxique sur la forme.

TABLEAU 4.28 – Sensibilité des biomarqueurs ontogéniques étudiés à différents facteurs

facteur :	génétique	stress toxique simple	stress toxique multiple	apport nourriture	granulométrie
phénotypiques du mentum	+	0	+	0	0
	(consanguinité)		(uniquement en l'absence de mortalité)		
AF de forme du mentum	+	+ (uniquement pour des concentrations d'exposition élevées et en l'absence de mortalité)	0	0	0
variation de la forme moyenne du mentum	+	+	+	+	+
AF de forme des ailes	+	nd	0	0	0
AF de taille centroïde des ailes	+	nd	0	0	0
variation de la forme moyenne des ailes	+	nd	+	+	0

0 : pas d'effet significatif observé.

+

nd : non déterminé.

Comme l'ont souligné Leung *et al.* (2000), une analyse des AF sur un ensemble de traits constituerait, en outre, un indicateur plus sensible qu'une analyse reposant sur un unique trait. Néanmoins, chez le chironome, la larve possède peu de pièces sclérifiées pouvant supporter un montage microscopique sans être déformées. Une solution consisterait alors à réaliser une **analyse** sans montage microscopique de la capsule céphalique du chironome par **morphométrie géométrique en 3D** (Marcus *et al.*, 2000 ; Claude *et al.*, 2003).

De plus, il serait intéressant de développer une méthodologie permettant d'**analyser les phénotypiques sans tuer les organismes** (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998a). Ceci permettrait d'isoler les individus difformes et ainsi de mesurer plus particulièrement les caractéristiques

biochimiques (concentration en toxiques dans les tissus, réserves énergétiques, dommages cellulaires et concentration en métallothionéines) et comportementales (alimentation, locomotion et bioturbation) de ces individus. De plus, il serait alors possible d'étudier la transmission réelle des anomalies morphologiques observées aux générations suivantes.

Par ailleurs, la larve de chironome, tout comme la drosophile, possède des chromosomes géants dans ses glandes salivaires facilement observables sous microscope. L'analyse des altérations structurales et fonctionnelles de ces chromosomes pour détecter une exposition toxique chez des espèces appartenant au genre *Chironomus* a été proposée dans les années 1990 (Aziz *et al.*, 1991 ; Bentivegna et Kooper, 1993 ; Michailova *et al.*, 1998). Elle a, par exemple, permis de mettre en évidence chez *Chironomus riparius* une exposition toxique à de faibles concentrations en cuivre (5 µg/l) qu'une analyse des anomalies morphologiques du mentum et des mandibules n'avait pas révélée (Michailova *et al.*, 2006). Ainsi, l'analyse des **variations de forme des chromosomes géants** du chironome pourrait se révéler être une mesure sensible à une exposition toxique.

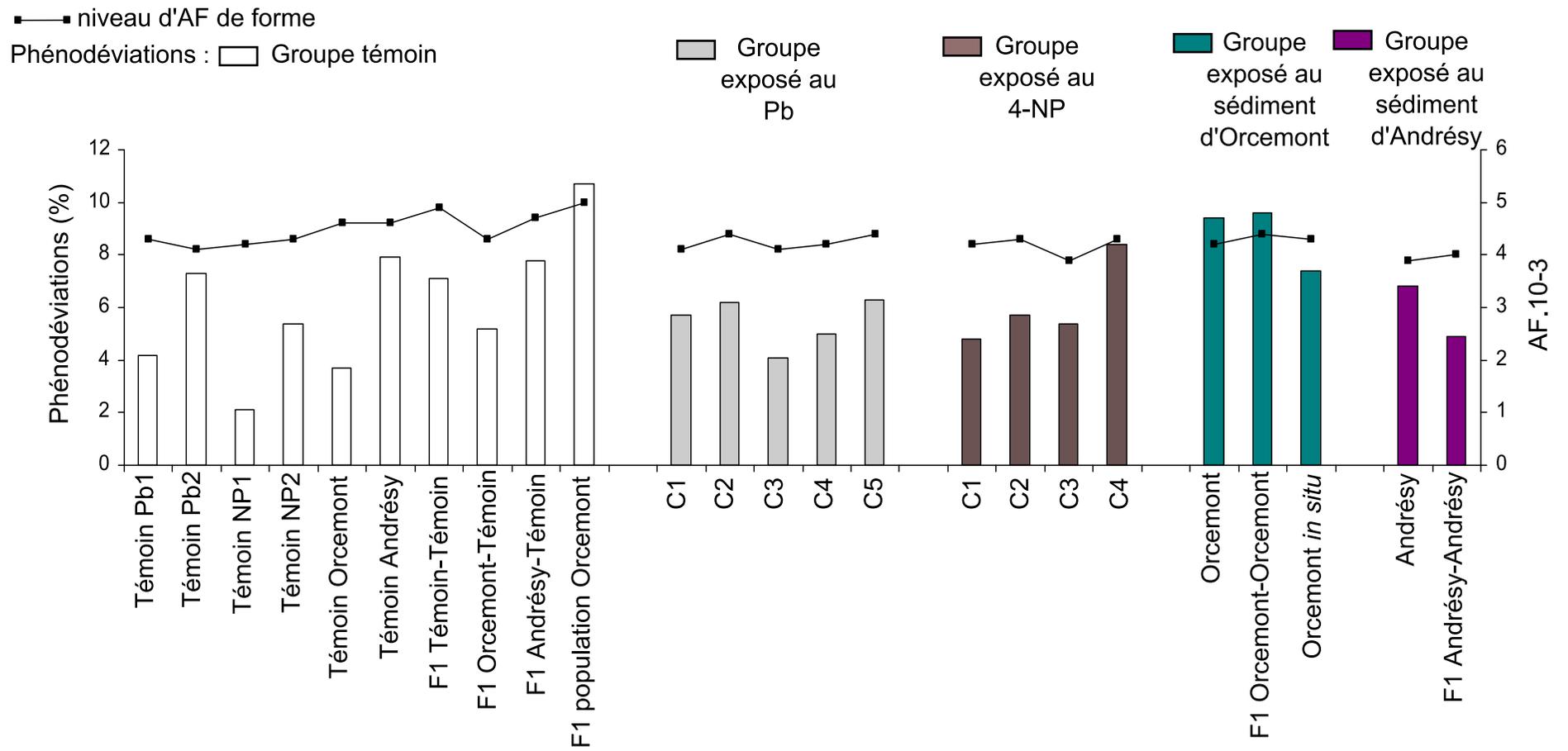


FIGURE 4.41 – Variation de la fréquence de phénodéviants et du niveau d'AF de forme du mentum de la larve de *Chironomus* tout essais confondus

Bibliographie

- Admiraal, W., Barranguet, C., van Beusekom, S. A. M., Bleeker, E. A. J., van den Ende, F., van der Geest, H. G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M. H. S. et Stuijzand, S. C. 2000. Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere* **41**, 289–295.
- AESN 2008. Base de données 2008, données non publiées.
- Agra, A. R. et Soares, A. M. V. M. 2009. Effects of two insecticides on survival, growth and emergence of *Chironomus riparius* Meigen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **82**, 501–504.
- Al-Shami, S. A., Rawi, C. S. M., Ahmad, A. H. et Nor, S. A. M. 2011. Evaluation of mentum deformities of *Chironomus* spp. (Chironomidae: Diptera) larvae using modified toxic score index (MTSI) to assess environmental stress in Juru River basin, Penang, Malaysia. *Environmental Monitoring and Assessment* **177**, 233–244.
- Al-Shami, S. A., Rawi, C. S. M., Ahmad, A. H. et Nor, S. A. M. 2011. Fluctuating Asymmetry of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae) Larvae in Association with Water Quality and Metal Pollution in Permatang Rawa River in the Juru River Basin, Penang, Malaysia. *Water air and soil pollution* **216**, 203–216.
- Al-Shami, S. A., Rawi, C. S. M., Ahmad, A. H. et Nor, S. A. M. 2012. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. *Toxicology and Industrial Health* **28**, 734–739.
- Albrecht, G. H. 1980. Multivariate analysis and the study of form, with special reference to canonical variate analysis. *American Zoologist* **20**, 679–693.
- Alhama, J., Romero-Ruiz, A. et Lopez-Barea, J. 2006. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. *Journal of Chromatography A* **1107**, 52–58.
- Alibert, P., Renaud, S., Dod, B., Bonhomme, F. et Auffray, J. C. 1994. Fluctuating asymmetry in the *Mus musculus* hybrid zone: a heterotic effect in disrupted co-adapted genomes. *Proceedings of the Royal Society* **258**, 53–59.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. et Rainbow, P. S. 2006. Metallothionein in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **76**, 160–202.
- Anderson, R. L. 1980. Chironomidae toxicity tests. Biological background and procedures. Aquatic bioinvertebrate bioassays. American Society for testing and materials, Philadelphia, PA. Buikema A.L and Cairns J.Jr Ed. 70–80.

-
- Anderson, R. L., Walbridge, C. T. et Fiantdt, J. T. 1980. Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to Copper, Cadmium, Zinc, and Lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **9**, 329–335.
- Arambourou, H. et Chenevoy, A. 2010. Mise en évidence des pressions toxiques exercées sur la rivière la Drouette (78) grâce à l'analyse des déformations affectant le mentum des chironomes (Diptères, Chironomidae). *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées* **276**, 97–106.
- Arrese, E. L. et Soulagés, J. L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* **55**, 207–225.
- Arrêté 2006. Arrêté du 9 août 2006 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée au décret n° 93-743 du 29 mars 1993.
- Awad, T. et Mulla, M. S. 1984. Morphogenetic and histopathological effects of the insect growth regulator cyromazine in larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **21**, 427–431.
- Axtmann, E. V. et Luoma, S. N. 1991. Large-scale distribution of metal contamination in the fine-grained sediments of the Clark Fork River, Montana, U.S.A. *Applied Geochemistry* **6**, 75–88.
- Azimi, S., Ludwig, A., Thévenot, D. et Collin, J. L. 2003. Trace metal determination in total atmospheric deposition in rural and urban areas. *Science of the Total Environment* **308**, 247–256.
- Aziz, J. B., Akrawi, N. M. et Nassori, G. A. 1991. The effect of chronic toxicity of copper on the activity of Balbiani rings and nucleolar organizing region in the salivary gland chromosomes of *Chironomus ninevah* larvae. *Environmental Pollution* **69**, 125–130.
- Bartrons, M., Grimalt, J. O. et Catalan, J. 2007. Concentration changes of organochlorine compounds and polybromodiphenyl ethers during metamorphosis of aquatic insects. *Environmental Science and Technology* **41**, 6137–6141.
- Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F. et Boudou, A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2096–2105.
- Bazzanti, M. et Bambacigno, F. 1987. Chironomids as water quality indicators in the river Mignone (Central, Italy). *Hydrobiological bulletin* **21**, 213–222.
- Beardmore, J. A. 1960. Developmental stability in constant and fluctuating temperatures. *Heredity* **14**, 411–422.
- Becue, A. et Nguyen, R. 2005. Etude de l'analyse des alkylphénols. Rapport INERIS. 40 p.
- Behrens, W. et Madère, R. 1991. Malonaldehyde determination in tissues and biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *Lipids* **26**, 232–236.
- Bell, H. E., Liber, K., Call, D. J. et Ankley, G. T. 2004. Evaluation of bioaccumulation and photo-induced toxicity of fluoranthene in larval and adult life-stages of *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **476**, 297–303.
-

-
- Bennie, D. T., Sullivan, H. B., Peart, T. E. et Maguire, R. J. 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Science of the Total Environment* **193**, 263–275.
- Bentivegna, C. S. et Kooper, K. R. 1993. Reduced chromosomal puffing in *Chironomus tentans* as a biomarker for potentially genotoxic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**, 1001–1011.
- Berni, J., Rabossi, A., Pujol-Lereis, L. M., Tolmasky, D. S. et Queseda-Allué, L. A. 2009. Phloxine B affects glycogen metabolism in larval stages of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **95**, 12–17.
- Bervoets, L., Blust, R., de Wit, M. et Verheyen, R. 1996. Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in Tubificid worms and Chironomid larvae. *Environmental Pollution* **95**, 345–356.
- Bervoets, L., Blust, R. et Verheyen, R. 1996. Effect of temperature on Cadmium and Zinc Uptake by the Midge Larvae *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 502–511.
- Bettinetti, R., Cuccato, D., Galassi, S. et Provini, A. 2002. Toxicity of 4-Nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* **46**, 201–207.
- Bettinetti, R., Giarei, C. et Provini, A. 2003. Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the river Lambro (Northern Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **45**, 72–78.
- Bettinetti, R. et Provini, A. 2002. Toxicity of 4-Nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-Days Whole Sediment Tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**, 113–121.
- Bhattacharyay, G., Sadhu, A. K., Mazumdar, A. et Chaudhuri, P. K. 2005. Antennal deformities of Chironomid larvae and their use in biomonitoring of heavy metal pollutants in the river Damodar of west Bengal, India. *Environmental Monitoring and Assessment* **108**, 67–84.
- Bird, G. A. 1994. Use of Chironomid deformities to assess environmental degradation in the Yamaska River, Quebec. *Environmental Monitoring and Assessment* **30**, 164–175.
- Bird, G. A. 1997. Deformities in cultured *Chironomus tentans* larvae and the influence of substrate on growth, survival and mentum wear. *Environmental Monitoring and Assessment* **45**, 273–283.
- Bird, G. A., Schwartz, W. J. et Joseph, D. L. 1995. The effect of ^{210}Pb and stable lead on the induction of menta deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 2125–2130.
- Blackburn, M. A., Kirby, S. J. et Waldock, M. J. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **38**, 109–118.
- Blackburn, M. A. et Waldock, M. J. 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research* **29**, 1623–1629.
- Blazka, P. 1966. Metabolism of natural and cultured populations of *Daphnia* related to secondary production. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* **16**, 380–385.
-

-
- Bleeker, E. A., Leslie, H. A., Groenendijk, D., Plans, M. et Admiraal, W. 1999. Effect of exposure to azaarenes on emergence and mouthpart development in the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1829–1834.
- Bomboi, M. T. et Hernandez, A. 1990. Hydrocarbons in urban runoff: their contribution to the wastewaters. *Water Research* **25**, 557–565.
- Bonada, N., Vives, S., Rieradevall, M. et Prat, N. 2005. Relationship between pollution and fluctuating asymmetry in a pollution-tolerant caddisfly *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Insecta). *Archiv für Hydrobiologie* **162**, 167–185.
- Bonada, N. et Williams, D. D. 2002. Exploration of the utility of fluctuating asymmetry as an indicator of river condition using larvae of the caddisfly *Hydropsyche morosa* (Trichoptera: Hydropsychidae). *Hydrobiologia* **481**, 147–156.
- Bonnet, C. 2000. Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Thèse de doctorat, Université de Metz. 250 p.
- Bonneton, F. 1994. Etude développementale et fonctionnelle des métallothionéines chez la drosophile. Thèse de doctorat, Université Paris XI. 68 p.
- Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, New-York. 435 p.
- Borgmann, U. et Norwood, W. P. 1999. Assessing the toxicity of lead in sediments to *Hyalella azteca*: the significance of bioaccumulation and dissolved metal. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**, 1494–1503.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brett, J. R. 1958. Implications and assessments of environmental stress. Proceedings of the International Symposium on Investigations of Fish-power Problems. University of British Columbia. P.A Larkin Ed. 69–83.
- Calow, P. et Sibly, R. 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications? *Functional Ecology* **4**, 283–288.
- Campero, M., De Block, M. et Stoks, R. 2008. Metamorphosis offsets the link between larval stress, adult asymmetry and individual quality. *Functional Ecology* **22**, 271–277.
- Carignan, V. et Villard, M. A. 2002. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* **78**, 45–61.
- Chang, X., Zhai, B., Liu, X. et Wang, M. 2007a. Effects of temperature stress and pesticide exposure on fluctuating asymmetry and mortality of *Coperia annulata* (selys) (Odonata: Zygoptera) larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**, 120–127.
- Chang, X., Zhai, B., Wang, M. et Wang, B. 2007b. Relationship between exposure to an insecticide and fluctuating asymmetry in a damselfly (Odonata, Coenagriidae). *Hydrobiologia* **586**, 213–220.
-

-
- Cho, E. 2005. Bioturbation as a novel method to characterize the toxicity of aquatic sediment. PhD thesis, North Carolina. 153 p.
- Choi, J., Roche, H. et Caquet, T. 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 495–500.
- Choi, J., Roche, H. et Caquet, T. 2001. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **130**, 11–17.
- Clarke, G. M. 1992. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. *Acta Zoologica Fennica* **191**, 31–5.
- Clarke, G. M. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution* **82**, 207–211.
- Clarke, G. M. 1993. The genetic basis of developmental stability. I. Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. *Genetica* **89**, 15–24.
- Clarke, G. M. 1993. Patterns of developmental stability of *Chrysopa perla* L. (Neuroptera: Chrysopidae) in response to environmental pollution. *Environmental Entomology* **22**, 1362–1366.
- Clarke, G. M. 1998. The genetic basis of developmental stability. Individual and population asymmetry parameters. *Heredity* **80**, 553–561.
- Clarke, G. M., Oldroyd, B. P. et Hunt, P. 1992. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera*: Heterozygosity versus genic balance. *Evolution* **46**, 753–762.
- Claude, J., Paradis, E., Tong, H. et Auffray, J. C. 2003. A geometric morphometric assessment of the effects of environment and cladogenesis on the evolution of the turtle shell. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 485–501.
- Clayton, M. E., Steinmann, R. et Fent, K. 2000. Different expression patterns of heat shock protein HSP 60 and HSP 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquatic Toxicology* **47**, 213–226.
- Connors, D. E. et Black, M. C. 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **467**, 362–371.
- Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P. et Walker, C. 1995. The effect of malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 1181–1188.
- Cushman, R. M. 1984. Chironomid deformities as indicators of pollution from a synthetic, coal-derived oil. *Freshwater Biology* **14**, 179–182.
- da Silva, J. J., Mendes, J. et Lomônaco, C. 2004. Developmental Stress by Diflubenzuron in *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Neotropical entomology* **33**, 249–253.
- Daly, H. V. 1985. Insect morphometrics. *Annual review of Entomologia* **30**, 415–438.
-

-
- Darlington, R. B. 1970. Is kurtosis really peakdness? *The American Statistician* **24**, 19–22.
- De Coen, W. M. et Janssen, C. R. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **6**, 43–55.
- de Hass, E. M., Paumen, M. L., Koelmans, A. A. et Kraak, M. H. S. 2004. Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. *Environmental Pollution* **127**, 99–107.
- de Voogt, P., de Beer, K. et van der Wielen, F. 1997. Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **16**, 584–595.
- Debat, V. 2000. Approche théorique et morphométrique du contrôle de la variabilité phénotypique : application à des modèles actuels et fossiles. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II. 200 p.
- Debat, V., Alibert, P., David, P., Paradis, E. et Auffray, J. F. 2000. Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse. *Proceedings of the Royal Society* **267**, 423–430.
- Debat, V., Bloyer, S., Faradji, F., Gidaszewski, N., Navarro, N., Orozco-terWengel, P., Ribeiro, V., Schlötterer, C., Deutsch, J. S. et Peronnet, F. 2011. Developmental stability: A major role for Cyclin G in *Drosophila melanogaster*. *Plos Genetics* **7**, e1002314.
- Debat, V., Milton, C. C., Rutherford, S., Klingenberg, C. P. et Hoffmann, A. A. 2006. HSP90 and the quantitative variation of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **60**, 2529–2538.
- Development Core team, R. 2010. A language and environment for statistical computing. Vienna: R foundation for statistical computing. Disponible : <http://www.R-project.org>. Consulté le 15 septembre 2010.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W. et Jewell, C. S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 1103–1123.
- Dias, V. 2010. Etude des réponses adaptatives d'une population d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) soumise à une exposition métallique chronique : le cas de l'uranium. Thèse de doctorat, Université de Provence Aix-Marseille I. 289 p.
- Dias, V., Vasseur, C. et Bonzom, J. M. 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth and mouthpart deformities. *Chemosphere* **71**, 574–581.
- Dickman, M., Brindle, I. et Benson, M. 1992. Evidence of teratogens in sediments of the Niagara river Watershed as reflected by Chironomid (Dipera: Chironomidae) deformities. *Journal of Great Lakes Research* **18**, 467–480.
- Diggins, P. et Stewart, K. M. 1993. Deformities of aquatic larval midges (Chironomidae: Diptera) in the sediments of the Buffalo river, New-York. *Journal of Great Lakes Research* **19**, 648–659.

-
- Ding, W. H. et Tzing, S. H. 1998. Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas-chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry with electron impact and chemical ionization. *Journal of Chromatography A* **824**, 79–90.
- Dobrin, M. et Corkum, L. D. 1999. Can fluctuating asymmetry in adult burrowing mayflies (*Hexagenia rigida*, Ephemeroptera) be used as a measure of contaminant stress? *Journal of Great Lakes Research* **25**, 339–346.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M. C., Babut, M. et Vasseur, P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental and field exposure in the gills and the digestive gland of freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**, 93–110.
- DRIEE 2010. Base de données : Inventaires des rejets situés sur les axes fluviaux et petits cours d'eau. Disponible : <http://www.driee.ile-de-france.developpement-durable.gouv.fr/donnes-sur-la-region-ile-de-a371.html>. Consulté le 8 avril 2012.
- Drover, S., Leung, B., Forbes, M. R., Mallory, M. L. et McNicol, D. K. 1999. Lake pH and aluminium concentration: consequences for developmental stability of water strider *Rheumatobates rileyi* (Hemiptera: Gerridae). *Canadian Journal of Zoology* **77**, 157–161.
- Ducrot, V., Usseglio-Polatera, P., Péry, A. R. R., Mouthon, J., Lafont, M., Roger, M. C., Garric, J. et Féraud, J. F. 2005. Using aquatic macroinvertebrate species trait to build test batteries for sediment toxicity assessment: Accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 2306–2315.
- Dudley, W. D., Nesterovitch, A. I., Tavares, A. F. et Muzzatti, E. G. 2001. Morphological deformities occurring in Belarusian Chironomids (Diptera: Chironomidae) subsequent to the Chernobyl nuclear disaster. *Freshwater Biology* **46**, 503–512.
- Dutta, A., Kumari, S., Smita, A. et Dutta, S. 2010. Toxicokinetics and bioaccumulation of copper and lead in *Chironomus* sp. (Diptera: Chironomidae) at different temperature under laboratory condition. *The Bioscan* **2**, 313–321.
- Emlen, D. J. et Nijhout, H. F. 2000. The development and evolution of exaggerated morphologies in insects. *Annual Review of Entomology* **45**, 661–708.
- England, D. E. et Bussard, J. B. 1993. Toxicity of nonylphenol to the midge *Chironomus tentans*. Rapport n°40597 préparé pour : Chemical Manufacturers Association by Analytical Bio-Chemistry Laboratories Inc. Washington, DC.
- Epler, J. H. 2001. Identification Manual for the Larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Raleigh, NC, and St. Johns River Water Management District. 53 p.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. et Aykins-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **1**, 529–539.
- Fabrick, I., Ruferova, Z., Hilscherova, K., Adam, V., Trnkova, L. et Kizek, R. 2008. A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (*Chironomus riparius*) using Brdicka reaction. *Sensors* **8**, 4081–4094.
-

-
- Fewler, K. et Whitlock, M. C. 1994. Fluctuating asymmetry does not increase with moderate inbreeding in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **73**, 373–376.
- Fowler, B. A. 1987. Intracellular Compartmentation of Metals in Aquatic Organisms: Roles in Mechanisms of Cell Injury. *Environmental Health Perspectives* **71**, 121–128.
- Francis, D. R. et Kane, T. C. 1995. Effect of substrate on colonization of experimental ponds by Chironomidae (Diptera). *Journal of Freshwater Ecology* **10**, 57–63.
- Franck, C. 1983. Influences of Chironomidae larvae by chemicals from the environment and their suitability as indicator for loading and trophy. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* **27**, 143–146.
- Fuller, R. C. et Houle, D. 2003. Inheritance of developmental instability. Developmental Instability: Causes and Consequences. Michal Polak Ed. Oxford University Press. 157–183.
- Gerhardt, A. et Janssens de Bisthoven, L. 1995. Behaviourial, developmental and morphological responses of *Chironomus* gr. *thummi* larvae (Diptera, Nematocera) to aquatic pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **4**, 205–214.
- Giger, W., Brunner, P. H. et Schaffner, C. 1984. 4-nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**, 623–625.
- Gilinsky, E. 1984. The role of fish predation and spatial heterogeneity in determining benthic community structure. *Ecology* **65**, 455–468.
- Gillis, P. L., Diener, L. C., Reynoldson, T. B. et Dixon, D. G. 2002. Cadmium-induced production of a metallothionein protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): Correlation with reproduction and growth. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 1836–1844.
- Gismondi, E., Beisel, J. N. et Cossu-Leguille, C. 2012. *Polymorphus minutus* affects antitoxic responses of *Gammarus roeseli* exposed to cadmium. *Plos One* **7**, e41475.
- Gismondi, E., Rigaud, T., Beisel, J. N. et Cossu-Leguille, C. 2012. Effect of multiple parasitic infections on the tolerance to pollutant contamination. *Plos One* **7**, e41950.
- Gnaiger, E. 1983. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. H. Forstners and E. Gnaiger Ed. Springer, Berlin. 337–345.
- Goetghebuer, M. 1928. Diptères (nématocères). Office centrale de faunistique. Faune de France. Paris. 174 p.
- Graham, J. H., Carl Freeman, D. et Emlen, J. M. 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica* **89**, 121–137.
- Graham, J. H., Emlen, J. M. et Freeman, D. C. 1993. Developmental stability and its applications in ecotoxicology. *Ecotoxicology* **2**, 175–184.
- Graham, J. H. et Felley, J. D. 1985. Genomic coadaptation and developmental stability within introgressed populations of *Enneacanthus gloriatus* and *E. obesus* (Pisces, Centrarchidae). *Evolution* **39**, 104–114.
-

-
- Graney, R. L. et Giesy, J. P. 1968. Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* Bousfield (Crustacea, Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **12**, 233–251.
- Groenendijk, D., Kraak, M. H. S. et Admiraal, W. 1999. Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1225–1231.
- Groenendijk, D., Zeinstra, L. W. M. et Postma, J. F. 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) from a metal contaminated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 1999–2005.
- Gromaire, M. C., Garnaud, S., Gonzalez, A. et Chebbo, G. 1999. Characterisation of urban runoff pollution in Paris. *Water Science and Technology* **39**, 1–8.
- Grosell, M., Gerdes, R. M. et Brix, K. V. 2006. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates - *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 97–104.
- Gross-Sorokin, M. Y., Grist, E. P. M., Cooke, M. et Crane, M. 2003. Uptake and depuration of 4-nonyphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: How important is feeding rate? *Environmental Science and Technology* **37**, 2236–2241.
- Ha, M. H. et Choi, J. 2008. Chemical-induced alteration of hemoglobin expression in the 4th instar larvae of *Chironomus tentans* Mg. (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **25**, 393–398.
- Ha, M. H. et Choi, J. 2008. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere* **71**, 1928–1936.
- Hämäläinen, H. 1999. Critical appraisal of the indexes of chironomid larval deformities and their use in bioindication. *Annales Zoologici Fennici* **36**, 179–186.
- Hamburger, K., Lindegaard, C. et Dall, P. C. 1996. The role of glycogen during the ontogenesis of *Chironomus anthracinus* (Chironomidae, Diptera). *Hydrobiologia* **318**, 51–59.
- Hamilton, L. et Saether, O. A. 1971. The occurrence of characteristic deformities in the Chironomid larvae of several Canadian lakes. *The Canadian Entomologist* **10**, 363–368.
- Hardersen, S. et Frampton, C. M. 1999. Effects of short term pollution on the level of fluctuating asymmetry - a case study using damselflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92**, 1–7.
- Hare, L. et Carter, J. C. H. 1976. The distribution of *Chironomus* (s.s)? *cucini* (*salinarius* group) larvae (Diptera: Chironomidae) in Parry Sound, Georgian Bay, with particular reference to structural deformities. *Canadian Journal of Zoology* **54**, 2129–2134.
- Harrahy, E. A. et William, W. H. 1997. Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 317–327.
- Heyland, A. et Moroz, L. L. 2006. Signaling mechanisms underlying metamorphic transitions in animals. *Integrative and Comparative Biology* **46**, 743–759.
-

-
- Hirthe, G., Fisher, T. C., Crane, M. et Callagan, A. 2001. Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. *Chemosphere* **44**, 583–589.
- Hoffmann, A. A., Collins, E. et Woods, R. 2002. Wing shape and wing size changes as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: noctuidae) moths: comparing shifts in means, variances, and asymmetries. *Environmental Entomology* **31**, 965–971.
- Hoffmann, A. A. et Woods, R. 2001. Trait variability and stress: canalization, developmental stability and the need for a broad approach. *Ecology Letters* **4**, 97–101.
- Hoffmann, A. A., Woods, R. E. et Collins, E. 2005. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insect. *Australian Journal of Entomology* **44**, 233–243.
- Holloway, G. J., Sibly, R. M. et Povey, S. R. 1990. Evolution in toxin-stressed environments. *Functional Ecology* **4**, 289–294.
- Huckins, J., Manuweera, G., Petty, J., Mackay, D. et Lebo, J. 1993. Lipid-containing semipermeable-membrane devices for monitoring organic contaminants in water. *Environmental Science and Technology* **27**, 2489–2496.
- Hudson, L. A. et Ciborowski, J. H. 1996. Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 297–304.
- Hugues, E. M. et Gallagher, E. P. 2004. Effects of 17- β estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **137**, 237–247.
- Hugues, W. W. 1996. Essentials of environmental toxicology: The effects of environmentally hazardous substances on human health. C Simon, S.M Twigg et E Dugger Ed. Taylor and Francis, Bristol. 176 p.
- Hunt, J. et Simmons, L. W. 1997. Patterns of fluctuating asymmetry in beetle horns: an experimental examination of the honest signalling hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41**, 109–114.
- Hwang, H., Fisher, S. W., Kim, K. et Landrum, P. F. 2004. Comparison of the toxicity using body residues of DDE and select PCB congeners to the midge, *Chironomus riparius*, in partial-life cycle tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 32–42.
- Ibrahim, H., Kheir, R., Helmi, S., Lewis, J. et Crane, M. 1998. Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides and a heavy metal on survival and cholinesterase activity in *Chironomus riparius* Meigen. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **60**, 448–455.
- Ingersoll, C. G., Haverland, P. S., Brunson, E. L., Canfield, T. J., Dwyer, F. J., Henke, C. E., Kemble, N. E., Mount, D. R. et Fox, R. G. 1996. Calculation and evaluation of Sediment Effect Concentrations for the amphipod *Hyaella azteca* and the midge *Chironomus riparius*. *Journal of Great Lakes Research* **22**, 602–623.
-

-
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A. et Takada, H. 2001. Distribution and behaviour of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environmental Science and Technology*, 1041–1049.
- Jain, C. K. 2004. Metal fractionation study on bed sediments of river Yamuna, India. *Water Research* **38**, 569–578.
- Janssens de Bisthoven, L. et Gerhardt, A. 2002. Chironomidae (Diptera, Nematocera) fauna in three small streams of Skania, Sweden. *Environmental Monitoring and Assessment* **83**, 89–102.
- Janssens de Bisthoven, L., Huysmans, L., Vannevel, R., Goemans, G. et Ollevier, F. 1996. Field and experimental morphological response of *Chironomus* larvae (Diptera: Nematocera) to xylene and toluene. *Netherlands Journal of Zoology* **47**, 227–239.
- Janssens de Bisthoven, L., Nuyts, P., Godderis, B. et Ollevier, F. 1998. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their bioindicator value. *Freshwater Biology* **39**, 179–191.
- Janssens de Bisthoven, L., Postma, J. F., Parren, P., Timmermans, K. R. et Ollevier, F. 1998. Relation between heavy metals in aquatic sediments in *Chironomus* larvae of Belgian low-land rivers and their morphological deformities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 688–703.
- Janssens de Bisthoven, L., Postma, J. F., Vermeulen, A., Goemans, G. et Ollevier, F. 2001. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water Air and Soil Pollution* **129**, 167–179.
- Janssens de Bisthoven, L., Timmermans, K. R. et Ollevier, F. 1992. The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in *Chironomus* gr. *thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. *Hydrobiologia* **239**, 141–149.
- Janssens de Bisthoven, L., Vermeulen, A. et Ollevier, F. 1998. Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* larvae by chronic exposure to copper and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **35**, 249–256.
- Jeyasingham, K. et Ling, N. 1997. Head capsule deformities in *Chironomus zealandicus* (Diptera: Chironomidae): Influence of site and substrate. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater research* **31**, 175–184.
- Jin-Clark, Y., Anderson, T. D. et Zhu, K. Y. 2008. Effect of alachlor and metolachlor on toxicity of chlopyrifos and major detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**, 645–652.
- Jobling, S., Sheahan, D. and Osborne, J., Matthiessen, P. et Sumpter, J. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenols chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 194–202.
- Jørgensen, E. S. 2010. Ecotoxicology. E.S Jørgensen Ed. Academic Press. 408 p.
- Kahl, M. D., Makynen, E. A., Kosian, A. M. et Ankley, G. T. 1997. Toxicity of 4-Nonylphenol in a Life-Cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**, 155–160.
-

-
- Karouna-Renier, N. et Zehr, J. P. 2003. Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in midge larvae (*Chironomus tentans*). *Science of the Total Environment* **312**, 267–272.
- Klingenberg, C. P. 2011. MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology* **11**, 353–357.
- Klingenberg, C. P., Badyaev, A. V., Sowry, S. M. et Beckwith, N. J. 2001. Inferring Developmental Modularity from Morphological Integration: Analysis of Individual Variation and Asymmetry in Bumblebee Wings. *The American Naturalist* **157**, 11–23.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M. et Mayer, A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* **56**, 1909–1920.
- Klingenberg, C. P. et McIntyre, G. S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* **54**, 678–688.
- Klingenberg, C. P. et Monteiro, L. R. 2005. Distances and Directions in Multidimensional Shape Spaces: Implications for Morphometric Applications. *Systematic Biology* **54**, 678–688.
- Koehn, R. K. et Bayne, B. L. 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* **37**, 157–171.
- Kosalwat, P. et Knight, A. W. 1987. Chronic Toxicity of Copper to a Partial Life Cycle of the Midge, *Chironomus decorus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**, 283–290.
- Krantzberg, G. et Stockes, P. M. 1989. Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**, 389–398.
- Kristensen, T. N., Pertoldi, C., Andersen, D. H. et Loeschcke, V. 2003. The use of fluctuating asymmetry and phenotypic variability as indicators of developmental instability: a test of a new method employing clonal organisms and high temperature stress. *Evolutionary Ecology Research* **5**, 53–68.
- Kuhlmann, M. L., Hayashida, C. Y. et Araujo, R. P. A. 2000. Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. *Acta Limnologica Brasiliensia* **12**, 55–61.
- Kwak, I. S. et Lee, W. 2005. Mouthpart deformity and developmental retardation exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to tebufenozide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **75**, 859–865.
- Lagrana, C., Apodaca, D. et David, C. P. 2010. Response of Chironomids to Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ Metal ions Using 96-hour Toxicity Test and Evaluating Different Factors that Affect Metal Accumulation. *Journal of Trends in Chemistry* **1**, 8–13.
- Langer-Jaesrich, M., Köler, H. R. et Gerhardt, A. 2010. Can mouth part deformities of *Chironomus riparius* serve as indicators for water and sediment pollution? A laboratory approach. *Journal of Soils and Sediments* **10**, 414–422.
- Larsson, P. 1984. Transport of PCBs from aquatic to terrestrial environments by emerging Chironomids. *Environmental Pollution* **34**, 283–289.
-

-
- Leary, R. F. et Allendorf, F. W. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* **4**, 214–217.
- Leary, R. F., Allendorf, F. W. et Knudsen, K. L. 1984. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *The American Naturalist* **124**, 540–551.
- LeBlanc, G., Mu, X. et Rider, C. V. 2000. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives* **108**, 1133–1137.
- Lee, S. B. et Choi, J. 2006. Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 3006–3014.
- Lee, S. M., Lee, S. B., Park, C. H. et Choi, J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobine genes in *Chironomus riparius* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* **65**, 1074–1081.
- Lee, S. W. et Choi, J. 2009. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **28**, 269–274.
- Lenat, D. R. 1993. Using mentum deformities of *Chironomus* larvae to evaluate the effects of toxicity and organic loading in streams. *Journal of the North American Benthological Society* **12**, 265–269.
- Lens, L., van Dongen, S., Kark, S. et Matthysen, E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies. *Biological Reviews* **77**, 27–38.
- Leppänen, M. T., Ristola, T., Johnson, J. et Burton Jr, A. 2006. Applying adult emergence as an endpoint in a post exposure laboratory test using two midges species (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere* **64**, 1667–1674.
- Lerner, I. M. 1954. Genetic Homeostasis. Wiley and Sons, New York. Oliver and Boyd. 154 p.
- Leung, B., Forbes, M. R. et Houle, D. 2000. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: Comparing efficacy of analysis involving multiple traits. *The American Naturalist* **155**, 101–115.
- Leung, B., Mineau, P. et Knopper, L. 2003. A critical assessment of fluctuating asymmetry as a bioindicator of environmental stress. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Michel Polak Ed. Oxford University Press. 415–426.
- Leversee, G. J., Giesy, J. P., Landrum, P. F., Geroul, S., Bowling, J. W., Fannin, T. E., Haddock, J. D. et Bartell, S. M. 1982. Kinetics and biotransformation of benzo(a)pyrene in *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **11**, 25–31.
- Lietti, E., Marin, M. G., Matozzo, V., Polesello, S. et Valsechi, S. 2007. Uptake and elimination of 4-Nonylphenol by the clam *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**, 571–578.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 1151–1191.
-

-
- Lobinske, R. J., ALi, A. et Stout, I. J. 1996. Qualitative and quantitative studies on Chironomidae (Diptera) and selected physico-chemical parameters in two tributaries of the Wekiva river, Central Florida. *Florida Entomologist* **79**, 531–542.
- Locke, M. et Collins, J. V. 1968. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *The Journal of Cell Biology* **36**, 453–483.
- Loska, K. et Wiechula, D. 2003. Application of principal component analysis for the estimation of source heavy metal contamination in surface sediments from the Rybnik reservoir. *Chemosphere* **51**, 723–733.
- Ludwig, W. 1932. Das Rechts-links problem im tierreich und beim menschen. Springer, Berlin. 496 p.
- MacDonald, E. E. et Taylor, B. R. 2006. Incidence of mentum deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae) from norther Nova Scotia, Canada. *Hydrobiologia* **563**, 277–287.
- Madden, C. P., Suter, P. J., Nicholson, B. C. et Austin, A. D. 1992. Deformities in Chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* **26**, 551–557.
- Mäenpää, K. et Kukkonen, J. V. K. 2006. Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Aquatic Toxicology* **77**, 329–338.
- Marcus, L., Hingst-Zaher, E. et Zaher, H. 2000. Applications of landmarks morphometrics to skull representing the orders of living mammals. *Hystrix* **11**, 27–47.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J. P. et Boudou, A. 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Chemosphere* **19**, 399–407.
- Markow, T. A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annual Review of Entomology* **40**, 105–120.
- Marques, M. M. G. S. M., Barbosa, F. A. R. et Callisto, M. 1999. Distribution and abundance of Chironomidae (Diptera, Insecta) in an impacted watershed in south-east Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* **59**, 553–561.
- Martinez, E. A., Barry, C. M., Schaumloffel, J. et Dasgupta, N. 2001. Induction of morphological deformities in *Chironomus tentans* exposed to zinc and lead spiked sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2475–2481.
- Martinez, E. A., Moore, B. C., Schaumloffel, J. et Dasgupta, N. 2002. The potential association between menta deformities and trace elements in Chironomidae (Diptera) taken from a heavy metal contaminated river. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**, 286–291.
- Martinez, E. A., Moore, B. C., Schaumloffel, J. et Dasgupta, N. 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**, 204–212.
- Martinez, E. A., Moore, B. C., Schaumloffel, J. et Dasgupta, N. 2004. Teratogenic versus mutagenic abnormalities in Chironomid larvae exposed to zinc and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**, 193–198.
-

-
- Martinez, E. A., Wold, L., Moore, B. C., Schaumloffel, J. et Dasgupta, N. 2006. Morphologic and growth responses in *Chironomus tentans* to arsenic exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**, 529–536.
- Mather, K. 1953. Genetical control of stability in development. *Heredity* **7**, 297–336.
- Meadows, J., Tillitt, D., Huckins, J. et Schroeder, D. 1993. Large-scale dialysis of sample liquids using a semipermeable membrane device. *Chemosphere* **26**, 1993–2006.
- Meiklejohn, C. D. et Hartl, D. L. 2002. A single mode of canalization. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 468–473.
- Meregalli, G. et Ollevier, F. 2001. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *Science of the Total Environment* **269**, 157–161.
- Meregalli, G., Pluymers, L. et Ollevier, F. 2001. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environmental Pollution* **111**, 241–246.
- Michailova, P., Petrova, N., Ilkova, J., Bovero, S., Brunettit, S., White, K. et Sella, G. 2006. Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution* **144**, 647–654.
- Michailova, P., Petrova, N., Sella, G., Ramella, L. et Bovero, S. 1998. Structural-functional rearrangements in chromosome G in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) collected from a heavy metal-polluted area near Turin, Italy. *Environmental Pollution* **103**, 127–134.
- Milton, C. C., Huynh, B., Batterham, P., Rutherford, S. L. et Hoffmann, A. A. 2003. Quantitative trait symmetry independent of Hsp90 buffering: Distinct modes of genetic canalization and developmental stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13396–13401.
- Milton, C. C., Ulane, C. M. et Rutherford, S. 2006. Control of canalization and evolvability by Hsp90. *Plos One* **1**, e75.
- Møller, A. P. et Swaddle, J. P. 1997. Asymmetry, developmental stability, and evolution. R.M May and P.H Harvey Ed. Oxford University Press. 291 p.
- Moller Pillot, H. K. M. 2009. Chironomidae larvae. Biology and ecology of the Chironomini. Stowa, Utrecht. 270 p.
- Moore, M. N., Livingston, D. R., Widdows, J., Lowe, D. M. et Pipe, R. K. 1987. Molecular, cellular, and physiological effects of oil derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assesment. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B* **316**, 209–214.
- Morales, M., Planelló, R., Martinez-Paz, P., Herrero, O. et Cortés, E. 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **153**, 150–158.
- Moran, N. A. 1994. Adaptation and constraint in the complex life-cycles of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 573–600.
-

-
- Moreda, J. M., Arranz, A., Fdez de Betono, S., Cid, A. et Arranz, J. F. 1998. Chromatographic determination of aliphatic hydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons (PAHS) in a sewage sludge. *Science of the Total Environment* **220**, 33–43.
- Mpho, M., Holloway, G. J. et Callagan, A. 2001. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. *Chemosphere* **45**, 713–720.
- Muzlanov, Y. A. 2002. Chronological dynamics of the distribution of wing venation anomalies in intrapopulation groups of *Calopteryx splendens* Harr. Damselflies. *Russian Journal of Ecology* **33**, 194–199.
- Naylor, C. G., Mieure, J. P., Adams, W. J., Weeks, J. A., Castaldi, F. J., Ogle, L. D. et Romano, R. R. 1992. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **69**, 695–703.
- Nie, X. B., Huang, T. L., Zhang, J. S., Li, W., Li, X. Y., Zhang, S. et Wang, B. S. 2010. Study on inactivation effect and toxic mechanism of chlorine for the aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Sustainable Environment Research* **20**, 341–346.
- Nowak, C., Vogt, C., Diogo, B. et Schwenk, K. 2007. Genetic impoverishment in laboratory cultures of the test organism *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 1018–1022.
- OCDE 2004. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé. Edition OCDE. 21 p.
- Ortel, J. 1991. Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water contents of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **59**, 93–100.
- Pachura, S. 2005. Toxicité et effets sur le développement d'*Hydra attenuata* des polluants hydriques et du nonylphénol (NP). Thèse de doctorat, Université de Metz. 126 p.
- Pachura-Bouchet, S., Blaise, C. et Vasseur, P. 2006. Toxicity of nonylphenol on the cnidarian *Hydra attenuata* and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology* **21**, 388–394.
- Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. Proceedings of the International Conference on Developmental Instability: Its origins and Evolutionary Implications. Tempe, Arizona, 14-15 June 1993. T.H Markow Ed. 355–364.
- Palmer, A. R. 2000. The Emperor's codpiece: A post-modern perspective on biological asymmetries. *International Society for Behavioral Ecology, Newsletter* **12**, 13–20.
- Palmer, A. R. et Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**, 191–421.
- Palmer, A. R. et Strobeck, C. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* **191**, 57–72.
- Palmer, A. R. et Strobeck, C. 2003. Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. Developmental Instability: Causes and Consequences. Oxford University Press. Michal Polak Ed. 279–319.

-
- Park, K., Bang, H. W., Park, J. et Kwak, I. S. 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* **77**, 359–367.
- Park, K. et Kwak, I. S. 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* **74**, 89–95.
- Park, S. Y. et Choi, J. 2009. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **83**, 463–468.
- Parker, P. J. N. et Callagan, A. 1997. Esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (L.) (Diptera: Simuliidae) exposed to organophosphate pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2550–2555.
- Pascoe, D., Kendall, A. W. et Green, D. W. J. 1989. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen - effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia* **175**, 109–115.
- Pelabon, C. et Hansen, T. F. 2008. On the adaptative accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution* **62**, 2855–2867.
- Péry, A. R. R. 2003. Modélisation des effets des toxiques sur le chironome *Chironomus riparius* de l'individu à la population. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I. 119 p.
- Péry, A. R. R. 2006. L'écotoxicologie revisitée par la modélisation de la dynamique énergétique. Habilitation à diriger les recherches, Université Claude Bernard Lyon 1. 105 p.
- Péry, A. R. R., Sulmon, V., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L. et Garric, J. 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 2507–2513.
- Péry, A. R. R., Sulmon, V., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L. et Garric, J. 2003. A model to understand the confounding effects of naturel sediments in toxicity tests with *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 2476–2481.
- Petering, D. H. et Fowler, B. A. 1986. Discussion Summary. Roles of Metallothionein and Related Proteins in Metal Metabolism and Toxicity: Problems and Perspectives. *Environmental Health Perspectives* **65**, 217–224.
- Pettigrove, V. 1989. Larval mouthpart deformities in *Procladius paludicola* Skuse (Diptera: Chironomidae) from the Murray and Darling Rivers, Australia. *Hydrobiologia* **179**, 111–117.
- Pijanowska, J., Bernatowicz, P. et Fronk, J. 2007. Phenotypic plasticity within *Daphnia lingispina* complex: differences between parental and hybrid clones. *Polish Journal of Ecology* **55**, 761–769.
- Piscart, C., Moreteau, J. C. et Beisel, J. N. 2005. Decrease of fluctuating asymmetry among larval instars in an aquatic, holometabolous insect. *Comptes Rendus de Biologies* **328**, 912–917.
- Piscart, C., Moreteau, J. C. et Beisel, J. N. 2006. Fluctuating Asymmetry of Natural Populations of Aquatic Insects Along a salinity Gradient. *Environmental Bioindicators* **1**, 229–241.
-

-
- Plaistow, S. J., Troussard, J. P. et Cézilly, F. 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal for Parasitology* **31**, 346–351.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J. L. et Morcillo, G. 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone nuclear receptor genes in aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **408**, 1598–1603.
- Polak, M., Opoka, R. et Cartwright, I. L. 2002. Response of fluctuating asymmetry to arsenic toxicity: support for the developmental selection hypothesis. *Environmental Pollution* **118**, 19–28.
- Polak, M. et Tomkins, J. L. 2012. Developmental instability as phenodeviance in a secondary sexual trait increase sharply with thermal stress. *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 277–287.
- Postma, J. F., Buckert-de Jong, M. C., Staats, N. et Davids, C. 1994. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**, 143–148.
- Postma, J. F., Kyed, M. et Admiraal, W. 1995. Site specific differentiation in metal tolerance in the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Hydrobiologia* **315**, 159–165.
- Postma, J. F., van Kleunen, A. et Admiraal, W. 1995. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (Diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**, 469–475.
- Postma, J. F., van Nugteren, P. et Buckert de Jong, M. B. 1996. Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera). *Environmental Toxicology and Chemistry* **95**, 332–339.
- Qureshi, S. A., Saxena, A. B. et Singh, V. P. 1980. Acute toxicity of four heavy metals to benthic fish food organisms from the river Khan, Ujjain. *Journal of Environmental Studies* **15**, 59–61.
- Ramos, L., Gonzalez, M. J. et Hernandez, L. M. 1999. Sequential extraction of copper, lead, cadmium, and zinc in sediments from Ebro river (Spain): Relationship with levels detected in earthworms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**, 301–308.
- Rasband, W. 2010. Image J: Image processing and analysis in Java. Disponible : <http://rsbweb.nih.gov>. Consulté le 13 janvier 2010.
- Rasmuson, M. 1960. Frequency of morphological deviants as criterion of developmental stability. *Hereditas* **46**, 511–535.
- Rathore, H. S., Sanghvi, P. K. et Swarup, H. 1979. Toxicity of cadmium and lead nitrate to *Chironomus tentans* larvae. *Environmental Pollution* **18**, 173–177.
- Renner, R. 1997. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* **31**, 316–320.
- Reynolds, S. K. et Ferrington, L. C. 2001. Temporal and taxonomic patterns of mouthpart deformities in larval midges (Diptera: Chironomidae) in relation to sediment chemistry. *Journal of Freshwater Ecology* **16**, 14–28.
-

-
- Ritossa, F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell stress chaperones* **1**, 97–98.
- Roberts, S. P. et Feder, M. E. 1999. Natural hyperthermia and expression of the heat shock protein Hsp70 affect developmental abnormalities in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia* **121**, 323–329.
- Roesijadi, G. 1994. Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives* **102**, 91–95.
- Rohlf, F. J. 2010. TPS DIG, Suny Stony Brook. Disponible : <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. Consulté le 9 septembre 2010.
- Rohlf, F. J. et Marcus, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**, 129–132.
- Rossaro, B., Gaggino, G. F. et Marchetti, R. 1986. Accumulation of mercury in larvae and adults, *Chironomus riparius* (Meigen). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **37**, 402–406.
- Roulier, J. L., Tusseau-Vuillemin, M. H., Coquery, M., Geffard, O. et Garric, J. 2008. Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*: First results of an experimental study. *Chemosphere* **70**, 925–932.
- Rutherford, S. L. et Lindquist, S. 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**, 336–342.
- Scheiner, S. M. 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **24**, 35–68.
- Schill, R. O., Görlitz, H. et Köhler, H. R. 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp 70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *BioMetals* **16**, 391–401.
- Schlichting, C. D. et Smith, H. 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* **16**, 189–211.
- Schmude, K. L., Liber, K., Corry, T. D. et Stay, F. S. 1999. Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emergence in littoral enclosures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 386–393.
- Seidman, L. A., Bergtrom, G. et Remsen, C. C. 1986. Structure of the larval midgut of the fly *Chironomus thummi* and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue and Cell* **18**, 407–418.
- Servia, M. J., Cobo, F. et Gonzales, M. A. 1998. Deformities in larval *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) and their use as bioindicators of toxic sediment stress. *Hydrobiologia* **385**, 153–162.
- Servia, M. J., Cobo, F. et Gonzales, M. A. 2002. Monitoring deformities of *Chironomus riparius* MEIGEN, 1804 (Diptera, Chironomidae) larvae from first to fourth instar: a potential tool for investigating their origin. *Archiv für Hydrobiologie* **154**, 447–460.
-

-
- Servia, M. J., Cobo, F. et Gonzales, M. A. 2002. Ontogeny of individual asymmetries in several traits of larval *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). *Canadian Journal of Zoology* **80**, 1470–1479.
- Servia, M. J., Cobo, F. et Gonzalez, M. A. 2000. Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Archiv für Hydrobiologie* **149**, 387–401.
- Servia, M. J., Cobo, F. et Gonzalez, M. A. 2004. Multiple trait Analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: a case study using *Chironomus riparius* Meigen, 1804 larvae. *Environmental Monitoring and Assessment* **90**, 101–112.
- Servia, M. J., Péry, A., Heydorff, M., Garric, J. et Lagadic, L. 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* **15**, 229–240.
- Sharley, D. J., Pettigrove, V. et Parsons, Y. M. 2004. Molecular identification of *Chironomus* spp. (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems. *Australian Journal of Entomology* **43**, 359–365.
- Sherfy, M. H., Kirkpatrick, R. L. et Richkus, K. D. 2000. Benthos core sampling and chironomid vertical distribution: implications for assessing shorebird food availability. *Wildlife Society Bulletin* **28**, 124–130.
- Smith, E., Ridgway, I. et Coffey, M. 2001. The determination of alkylphenols in aqueous samples from the Forth Estuary by SPE-HPLC-fluorescence. *Journal of Environmental Monitoring* **3**, 616–620.
- Smith, T. et Manoylov, K. 2007. Diatom deformities from acid mine drainage site at Friendship Hills National Historical Site, Pennsylvania. *Journal of Freshwater Ecology* **22**, 521–527.
- Sokal, R. R. et Rohlf, F. J. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 4th edition. W.H Freeman and Co., New-York. 937 p.
- Sornom, P., Gismondi, E., Vellinger, C., Devin, S., Féraud, J. F. et Beisel, J. N. 2012. Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *Plos One* **7**, e42435.
- Stearns, S. C. 1989. The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience* **39**, 436–445.
- Stige, L. C., Hessen, D. O. et Vøllestad, L. F. 2004. Severe food stress has no detectable impact on developmental instability in *Daphnia magna*. *Oikos* **107**, 519–530.
- Stoks, R. 2001. Food stress and predator-induced stress shape developmental performance in a damselfly. *Oecologia* **127**, 222–229.
- Strayer, D. L. 2008. A new widespread morphological deformity in freshwater mussels from New York. *Northeastern Naturalist* **15**, 149–151.
- Strenzke, K. 1959. Revisin der gattung *Chironomus* Meig. 1. Die Images von 15 norddeutschen arten und unterarten. *Archiv für Hydrobiologie* **56**, 1–42.
-

-
- Sumi, Y., Suzuki, T., Yamamura, M., Hatakeyama, S., Sugaya, Y. et Suzuki, K. T. 1984. Histochemical staining of cadmium taken up by midge, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera, Chironomidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **79**, 353–357.
- Suwalsky, M., Ramos, P., Vyllena, F., Cardenas, H., Norry, B., Cuevas, F. et Sotomayer, C. P. 2001. The organophosphorous insecticide parathion changes properties of natural and model membranes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**, 74–85.
- Swansburg, E. O., Fairchild, W. L., Fryer, B. J. et Ciborowski, J. H. 2009. Mouthpart deformities and community composition of Chironomidae (Diptera) larvae downstream of metal mines in New Brunswick, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 2675–2684.
- Takahashi, K. H., Daborn, P. J., Hoffmann, A. A. et Takano-Shimizu, T. 2011. Environmental-stress-dependent effects of deletions encompassing Hsp70Ba on canalization and quantitative trait asymmetry in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **6**, e17295.
- Tessier, L., Boisvert, J. L., Vought, L. B. M. et Lacoursière, J. O. 2000. Anomalies on capture nets of *Hydropsyche slossonae* larvae (Trichoptera; Hydropsychidae) following a sublethal chronic exposure to cadmium. *Environmental Pollution* **108**, 425–438.
- Thévenot, D., Meybeck, M. et Lestel, L. 2002. Métaux lourds : des bilans en mutation. Rapport de synthèse Piren Seine 1998-2001. Université Paris 6. 76 p.
- Thibault, R., Jumel, A., Debrauwer, L., Trathahao, E., Lagadic, L. et Cravedi, J. P. 2000. Identification of 4-n-nonylphenol metabolic pathways and residues in aquatic organisms by HPLC and LC-MS analyses. *Analyses* **28**, 793–801.
- Thoday, J. M. 1958. Homeostasis in a selection experiment. *Heredity* **12**, 401–415.
- Thomas, V. M. 1995. The elimination of lead in gasoline. *Annual Review of Energy and the Environment* **20**, 301–324.
- Timmermans, K. R., Peeters, W. et Tonkes, M. 1992. Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiologia* **241**, 119–134.
- Timmermans, K. R. et Walker, P. A. 1989. The fate of trace metals during the metamorphosis of Chironomids (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution* **62**, 73–85.
- Tripathi, P. K. et Singh, A. 2002. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on carbohydrate metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **68**, 606–611.
- Tsuda, T., Sugo, K., Kaneda, E. et Ohsuga, M. 2000. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **746**, 305–309.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. et Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, 178–189.
- van Dongen, S. V. 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 1727–1743.
-

-
- van Straalen, N. M. et Timmermans, M. J. T. N. 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the genetic erosion hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* **8**, 983–1002.
- van Urk, G., Kerckhof, F. C. M. et Smit, H. 1992. Life cycle patterns, density, and frequency of deformities in *Chironomus* larvae (Diptera: Chironomidae) over a contaminated sediment gradient. *Journal Canadien des Sciences Halieutiques et Aquatiques* **49**, 2291–2299.
- van Valen, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* **16**, 125–142.
- vanderZandt, P. T. J., heinis, F. et Kikkert, A. 1994. Effects of narcotic industrial pollutants on behaviour of midge larvae (*Chironomus riparius* (Meigen), Diptera): a quantitative structure-activity relationship. *Aquatic Toxicology* **28**, 209–221.
- Vermeulen, A., Dall, P. C., Lindegaard, C., Ollevier, F. et Goddeeris, B. 1998. Improving the methodology of Chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams. *Archiv für Hydrobiologie* **144**, 103–135.
- Vermeulen, A. C. 1995. Elaborating Chironomid deformities as bioindicators of toxic sediment stress: the potential application of mixture toxicity concept. *Acta Zoologica Fennica* **32**, 265–285.
- Vermeulen, A. C., Liberloo, G., Dumont, P., Ollevier, F. et Goddeeris, B. 2000. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and β -sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere* **41**, 1581–1591.
- VNF 2006. Schéma directeur régional des terrains de dépôt. Nord-Pas-de-Calais, 16 p.
- VNF 2008. Guide de dragage. Béthune, 76 p.
- VNF 2010. CD-Rom des statistiques de la navigation intérieure de l'année 2010.
- VNF 2012. Base de données physico-chimiques des sédiments de dragage, non publiée.
- Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R. et Bervoets, L. 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* **79**, 213–225.
- Von der Ohe, P. C. et Liess, M. 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental toxicology and chemistry* **23**, 150–156.
- Vrijenhoek, R. C. 1985. Animal population genetics and disturbance: The effects of local extinctions and recolonizations on heterozygosity and fitness. The ecology of natural disturbance and patch dynamics. Academic Press, New-York. Pickett and White Ed. 265–285.
- Waddington, C. H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* **150**, 563–565.
- Wagner, G. P., Booth, G. et Bagheri-Chaichian, H. 1997. A population genetic theory of canalization. *Evolution* **51**, 329–347.
- Wahlberg, C., Renberg, L. et Wideqvist, U. 1990. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. *Chemosphere* **20**, 179–195.
-

-
- Warwick, W. F. 1975. The impact of man on the Bay of Quinte, Lake Ontario, as shown by the subfossil chironomid succession Chironomidae (Diptera). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* **19**, 3134–3141.
- Warwick, W. F. 1985. Morphological Abnormalities in Chironomidae (Diptera) Larvae as Measures of Toxic Stress in Freshwater Ecosystems: Indexing Antennal deformities in *Chironomus* Meigen. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**, 1881–1914.
- Warwick, W. F. 1988. Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as bioindicators of toxic stress. Toxic contaminants and ecosystem health; A great Lakes focus. Wiley and Sons Ed., New-York. 281–320.
- Warwick, W. F. 1990. Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae from the lac St. Louis and Laprairie bassins of the St. Lawrence river. *Journal of Great Lakes Research* **16**, 185–208.
- Warwick, W. F., Fitchko, J., McKee, P. M., Hart, D. R. et Burt, A. J. 1987. The incidence of deformities in *Chironomus* spp. from Port Harbour, lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* **13**, 88–92.
- Watts, M. M. et Pascoe, D. 2000. A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**, 299–306.
- Watts, M. M., Pascoe, D. et Carroll, K. 2003. Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol-A - effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and environmental safety* **54**, 207–215.
- Wene, G. 1940. The soil as an ecological factor in the abundance of aquatic Chironomid larvae. *Ohio Journal of Science* **110**, 193–199.
- West-Eberhard, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**, 249–278.
- Wiederholm, T. 1983. Chironomidae of the holarctic region. Keys and diagnoses. Vol. 1. Larvae., T. Wiederholm Ed. 457 p.
- Wiederholm, T. 1984. Incidence of deformed larvae (Diptera: Chironomidae) in swedish lakes. *Hydrobiologia* **109**, 243–249.
- Wigglesworth, V. B. 1942. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *Journal of Experimental Biology* **19**, 56–77.
- Wiklund, C. 1977. Why do males emerge before females? A hypothesis to explain the incidence of protandry in butterflies. *Oecologia* **31**, 153–158.
- Wildi, E., Nagel, R. et Streinberg, E. W. 1994. Effects of pH on the bioconcentration of the pyrene in the larval midge, *Chironomus riparius*. *Water Research* **28**, 2553–2559.
- Woods, R. E., Sgrò, C. M., Hercus, M. J. et A, H. A. 1999. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* **53**, 493–505.
- Ying, G. G., Williams, B. et Kookana, R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environmental International* **28**, 215–226.
-

-
- Zakharov, V. M. 1994. Appearance, fixation and stabilisation of environmentally induced phenotypic changes as a microevolutionary event. Proceedings of the International Conference on Developmental Instability: Its origins and Evolutionary Implications. Tempe, Arizona, 14-15 June 1993. T.H Markow Ed. 229–236.
- Zakharov, V. M., Zhdanova, N. P., Kirik, E. F. et Shkil', F. N. 2001. Ontogenesis and population: Evaluation of developmental stability in natural populations. *Russian Journal of Developmental Biology* **32**, 336–351.
- Zhang, B., Hagmann, M., Günes, C., Cramer, M., Faller, P., Vasák, M. et Schaffner, W. 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 8471–8485.
- Zhang, H. et Davison, W. 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for *in-situ* measurements of trace metals in aqueous solution. *Analytica Chimica* **67**, 3391–3400.
- Zheng, X., Long, W., Guo, Y. et Ma, E. 2011. Effects of cadmium exposure on lipid peroxidation and the antioxidant system in fourth-instar larvae of *Prosilocerus akamusi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology* **104**, 827–832.

Annexes

Annexe 1

Lenat (1993) a proposé de classifier les phénodéviation affectant le mentum, une pièce buccale de la larve du chironome comportant des dents, en trois catégories :

- catégorie 1 : déviations mineures souvent difficiles à séparer d’une altération physique ;
- catégorie 2 : ajout, absence ou espacement important de dents ;
- catégorie 3 : trait présentant au moins deux déviations de catégorie 2.

et a défini un Indice de Score Toxique (IST) :

$$IST = \frac{(n_{cat1} + 2.n_{cat2} + 3.n_{cat3}).100}{n_{tot}} \quad (4.2)$$

avec n_{cati} : le nombre d’individus présentant une déviation de la catégorie i et n_{tot} : le nombre total d’organismes.

Cet indice a, par la suite, été modifié par Al-Shami *et al.* (2011a) qui ont proposé l’Indice de Score Toxique Modifié (ISTM) :

$$ISTM = [(n_{cat1} + 2.n_{cat2} + 3.n_{cat3})_{\text{dents médianes}} + (2.n_{cat1} + 3.n_{cat2} + 4.n_{cat3})_{\text{dents latérales}} + (3.n_{cat1} + 4.n_{cat2} + 5.n_{cat3})_{\text{dents externes}}].100/n_{tot} \quad (4.3)$$

avec

- catégorie 1 définie comme Lenat (1993) ;
- catégorie 2 : réduction de la taille des dents ;
- catégorie 3 : ajout, absence, espacement important de dents.

Vermeulen *et al.* (1998) ainsi que Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b) ont, quant à eux, proposé des scores (tableau 4.29 et tableau 4.30) pour chaque type de déviations observées. Les phénodéviation sont alors calculées selon la formule :

$$\frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n score - larve_i \quad (4.4)$$

avec n : le nombre total d’organismes.

TABLEAU 4.29 – Scores établis par Vermeulen *et al.* (1998)

type	intensité	score
Khön gap	faible, pas de diminution de la pigmentation	2
	important, pigmentation réduite	8
addition dent		4
asymétrie dent	légèrement inclinée	1
	fortement inclinée, un côté vertical	2
	profil irrégulier	2
absence dent		4
déplacement dent	antérieur/postérieur	2
	bas/haut	4
élargissement dent	surface d'élargissement < 50 %	1
	surface d'élargissement \geq 50 % et < 100 %	2
	surface d'élargissement \geq 100 %	4
fusion dent	étendue à < 1/2 longueur	1
	étendue à \geq 1/2 longueur, les apex sont toujours visibles	3
	complète	4
		2
réduction pigmentation dent		1
profil dent altéré		1
		1
dent réduite	réduction surface < 50 %	1
	réduction surface \geq 50 % et < 100 %	2
	réduction surface 100 %	4
fente dent	dent médiane et fente médiane	0,5
	étendue à \leq 1/8 longueur	-
	étendue à < 1/2 longueur	1
	étendue à \geq 1/2 longueur	2

TABLEAU 4.30 – Scores établis par Janssens de Bisthoven *et al.* (1998b)

type	score
absence 1 dent	3
absence 1/2 dent	2
absence > 1 dent au niveau des dents externes	10
absence > 1 dent au niveau des dents latérales	20
absence > 1 dents au niveau des dents médianes	30
Khön gap de taille égal à 1 dent	10
1.5	15
2	20
3	40
4	80
>5	100
+ 1 dent	20
+ 2 dents	30
+ 3 dents	40
fusion ou fente	10

Annexe 2

Limites de quantification

Le tableau 4.31 ci-dessous récapitule les limites de quantifications des éléments minéraux dosés dans les différents compartiments étudiés (eau, sédiment et chironomes).

TABLEAU 4.31 – Limites de quantification des éléments minéraux dans l'eau, les chironomes et le sédiment

	Pb	Cu	Zn	Cr	Cd	Ni	Mn	As	Se	Ba	K	Al	Mg	Fe	Hg
eau ($\mu\text{g/l}$)	1,0	0,5	50	1,0	0,11	2,0	1,0	2,0	2,0	2	20	1000	100	100	1,0
sédiment (mg/kg de MS)	0,2	0,1	10	0,2	0,04	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	4	200	20	20	0,2
chironomes (mg/kg de MS)	1,3	0,7	66,7	1,3	0,3	2,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Annexe 3

Développement analytique du dosage des alkylphénols

Le développement analytique du dosage du 4-nonylphénol (4-NP) et du 4t-octylphénol (4t-OP), les deux alkylphénols (AP) les plus couramment détectés dans le milieu naturel, a été réalisé en phase inverse sur HPLC (High Performance Liquid Chromatography) équipée d'un détecteur par fluorescence (Waters 2475) (de Voogt *et al.*, 1997 ; Tsuda *et al.*, 2000). Dans cette partie, nous présentons essentiellement les résultats concernant le 4-NP. Les quatre matrices dosées des unités expérimentales sont : le sédiment, l'eau surnageante, l'eau interstitielle ainsi que les corps des organismes ayant crû dans le sédiment.

Conservation des échantillons

Les AP sont des substances organiques. Afin de conserver les échantillons avant analyse tout en évitant leur dégradation, les sédiments ainsi que les corps des organismes sont lyophilisés. L'eau et les SPMD sont conservées dans des flacons en verre à l'obscurité à 4°C.

Substances utilisées

Nous avons travaillé avec du 4-NP (n°CAS 84852-15-3) (pestanal, Sigma Aldrich) et du 4t-OP (n°CAS 140-66-9) (Dr Ehrenstorfer). Les étalons internes retenus sont le 4n-nonylphénol (4n-NP) (n°CAS 104-40-5) et le 4n-octylphénol (4n-OP) (n°CAS 1806-26-4)(Dr Ehrenstorfer). Il s'agit d'isomères linéaires substitués en position 4 et quasiment absents dans les mélanges commerciaux de NP et d'OP. Ils sont utilisés afin d'évaluer le rendement des phases d'extraction.

Extraction sur SPE

La séparation des AP contenus dans l'eau ainsi que dans les extraits de chironomes est réalisée sur SPE. Afin de limiter le colmatage de la colonne SPE, les eaux sont préalablement filtrées sur filtre en fibre de verre GF/F (Whatman) possédant un diamètre de pore compris entre 0,6 et 0,8 µm. Pour limiter l'interaction entre AP et matériaux, nous avons choisi de travailler sur des colonnes SPE en verre C18 encappées (Macherey-Nagel).

Les colonnes sont conditionnées avec 5 ml de dichlorométhane (Lichrosolv®, Merck), 5 ml de méthanol (Chromasolv®, Sigma Aldrich) et 5 ml d'eau distillée. Pour tester le rendement d'extraction, de l'eau distillée dopée au 4-NP et au 4n-NP est versée à travers la colonne. Puis, la colonne est séchée sous flux d'air à -15 kPa par aspiration pendant 30 minutes.

L'eau ayant traversé la cartouche SPE est récupérée et le contenu en 4-NP est mesuré afin de vérifier qu'après passage à travers la colonne, le 4-NP et le 4n-NP sont restés adsorbés sur la colonne. La colonne est ensuite éluée par gravité avec 5 ml de méthanol. Puis, une élution au dichlorométhane (deux fois 2,5 ml), un solvant identifié comme efficace pour l'élution des AP (Wahlberg *et al.*, 1990), est réalisée à faible débit (<0,2 ml/min). La quantité de 4-NP et de 4n-NP est analysée non seulement dans le méthanol mais également dans le dichlorométhane dans l'objectif d'évaluer la quantité de nonylphénol non désorbée par l'élution au méthanol.

Cet essai montre (tableau 4.32) :

- l'absence de 4-NP et de 4n-NP dans l'eau ayant traversé la colonne ce qui indique que ces composés sont bien retenus sur la cartouche ;

- l'élution d'une faible quantité de 4-NP et de 4n-NP avec le dichlorométhane après élution au méthanol. Ceci amène à penser que le méthanol n'est pas un solvant suffisamment fort pour désorber complètement le NP. Les éluions seront, par conséquent, réalisées au dichlorométhane ;
- un rendement d'élution au méthanol + dichlorométhane proche de 100 %.

TABLEAU 4.32 – Elution sur colonne SPE C18 encappée
Moyenne de deux éluions.

	$m_{\text{injectée}}$ (μg)	m_{eau} (μg)	$m_{\text{méthanol}}$ (μg)	$m_{\text{dichlorométhane}}$ (μg)	m_{totale} (μg)	rendement total
4-NP	1	< 0,25	1,0	0,1	1,1	114 %
4n-NP	1	< 0,25	0,9	0,1	1,0	97 %

Choix de la colonne

Une synthèse bibliographique (tableau 4.33) met en évidence l'utilisation préférentielle pour le dosage des AP en phase inverse de colonnes en silice greffées C18 (taux de carbone : 17 %).

TABLEAU 4.33 – Type de colonnes utilisées dans la littérature pour l'analyse des AP en phase inverse sur HPLC

	caractéristiques	modèle
Kahl <i>et al.</i> (1997)	150 x 4,6 mm, 5 μm , C18	Alltima
de Voogt <i>et al.</i> (1997)	125 x 4 mm, 5 μm , C18	Lichrospher 100
Bettinetti <i>et al.</i> (2002)	125 x 4 mm, 5 μm , C18	Lichrospher 100
Lietti <i>et al.</i> (2007)	150 x 4,6 mm, 4 μm , C18	Polar-RP

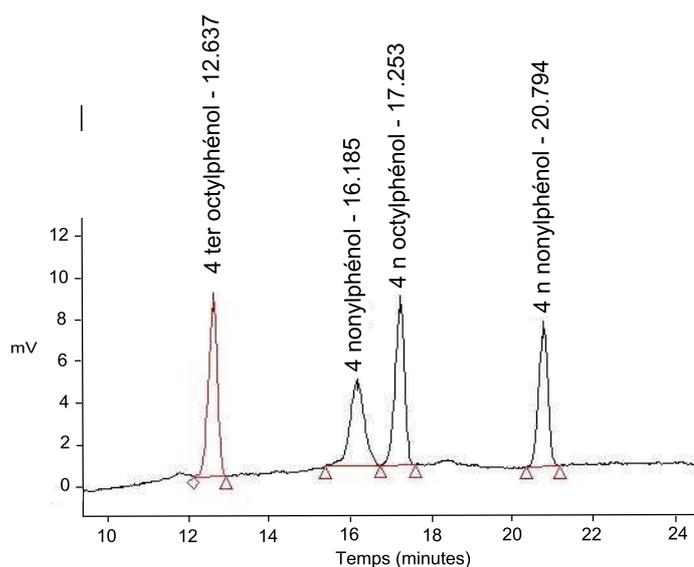


FIGURE 4.42 – Chromatogramme obtenu avec une eau déminéralisée dopée à 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ en NP et OP sur colonne Alltima

Quatre colonnes phase inverse HPLC ont été testées : la Prevail (150 x 4,6 mm, 3 µm, C18, Alltech), l'Alltima (150 x 4,6 mm, 5 µm, C18, Alltech), la Smart (150 x 4,6 mm, 5 µm, RP-18, Grace) ainsi que la Denali (250 x 4,6 mm 5 µm, C18, Vydac). Les colonnes Smart et Denali ne permettent pas de bien séparer le 4-NP du 4n-OP. Aussi, la colonne que nous avons retenue est l'Alltima. Le chromatogramme obtenu sur une eau dopée aux nonylphénols (4-NP et 4n-NP) et aux octylphénols (4t-OP et 4n-OP) est présenté sur la figure 4.42.

Choix des longueurs d'onde

Il s'agit de choisir des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission qui permettent d'obtenir une sensibilité élevée tout en limitant les interférences. Une synthèse bibliographique (tableau 4.34) permet de mettre en évidence pour l'analyse des AP des longueurs d'ondes d'excitation variant entre 229 et 275 nm et des longueurs d'ondes d'émission variant entre 290 et 310 nm .

TABLEAU 4.34 – Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission utilisées dans la littérature pour l'analyse des AP

	excitation (nm)	émission (nm)
Kahl <i>et al.</i> (1997)	229	310
de Voogt <i>et al.</i> (1997)	230	290
Tsuda <i>et al.</i> (2000)	230	302
Smith <i>et al.</i> (2001)	275	300
Bettinetti <i>et al.</i> (2002)	230	290
Lietti <i>et al.</i> (2007)	230	302

Nous avons testé deux longueurs d'ondes d'émission : 300 nm et 305 nm. Toutefois, aucune différence significative n'est observée. Par conséquent, nous avons choisi de travailler à 300 nm en émission. Puis, nous avons testé les couples de longueurs d'ondes 230/300 nm et 275/300 nm sur une eau de rivière dopée aux alkylphénols. A la différence du couple 275/300 nm, le couple 230/300 nm permet d'obtenir une ligne de base stable. Aussi avons-nous choisi de travailler à 230 nm en excitation et à 300 nm en émission.

Calibration

Trois solutions mères de calibration (1000 µg/l, 100 µg/l et 10 µg/l) sont obtenues en mélangeant la quantité souhaitée de 4-NP et/ou de 4n-NP avec du méthanol. Les autres concentrations sont obtenues en diluant la solution mère. 50 µl de chaque solution étalon sont injectés dans l'HPLC et les courbes de calibration sont obtenues en déterminant l'aire de chaque pic en fonction de la concentration injectée. Deux gammes d'étalonnage ont été préparées : une gamme forte variant entre 60 et 800 µg/l ainsi qu'une gamme plus sensible variant entre 40 et 400 µg/l. Pour chaque gamme, six ou sept niveaux ont été testés, chacun répétés cinq fois. Nous avons eu recours au test d'adéquation au modèle d'étalonnage de la norme NF T 90-210, pour valider la fonction d'étalonnage.

Limites de quantification

Les limites de quantification du 4-NP ont été calculées selon la méthode d'une limite présumée (NF T 90-210) avec 5 niveaux de concentration (série) et 2 répétitions sur chaque niveau. Cette limite s'élève à 40 µg/l pour les gammes fortes et à 25 µg/l pour les gammes faibles

(tableau 4.35).

TABLEAU 4.35 – Valeurs obtenues pour l'évaluation de la limite de quantification présumée sur la gamme forte et la gamme faible de 4-NP

série	répétition	gamme forte		gamme faible	
		1	2	1	2
1		45,1	36,9	24,5	21,8
2		44,1	38,8	26,3	31,0
3		38,8	41,8	23,0	19,8
4		39,9	36,6	28,9	25,5
5		35,5	41,9	31,6	26,1

Essais croisés

Afin de valider nos méthodes analytiques, des essais croisés avec le LPTC (Université de Bordeaux), le LEESU et le LCPP ont été réalisés. Pour ce faire, du sédiment artificiel (cf partie 3 matériel et méthode) a été dopé avec des concentrations croissantes en 4-NP puis envoyés aux différents laboratoires d'analyse. Les résultats obtenus sur le sédiment dopé sont présentés dans le tableau 4.36. De même, nous avons récupéré des échantillons d'eau surnageante que nous avons envoyés aux laboratoires participant à l'essai croisé (tableau 4.38). Nous avons, en outre, participé à un essai croisé inter-laboratoire BIPEA sur un échantillon d'eau superficielle dopée aux alkylphénols (4-NP et 4t-OP) (tableau 4.39). Douze laboratoires ont participé à ce dernier essai.

TABLEAU 4.36 – Essai croisé sur sédiment artificiel dopé au 4-NP
Moyenne et écart-type entre les trois concentrations obtenues en mg/kg de MS.

	C0=0	C1=154	C2=250	technique d'analyse
LEESU	0,04	140,3 ± 30,9	201,5 ± 60,5	extraction micro-onde + LC-MS-MS
LCPP	1,00	123,0 ± 11,0	178,0 ± 24,0	ultrasons + GC-MS
CETE	0,06 ± 0,03	117,0 ± 9,5	196,6 ± 2,9	Soxhlet + HPLC-fluo
LPTC	0,50	95,0	262,0	extraction micro-onde + LC-MS-MS

TABLEAU 4.37 – Valeurs statistiques calculées pour l'essai croisé sur sédiment artificiel dopé au 4-NP

niveau	nombre de laboratoire	moyenne	écart-type de répétabilité	écart-type de reproductibilité
C1	4	123,6	19,7	21,8
C2	4	199,0	37,6	39,5

Concernant l'essai croisé sur le sédiment dopé au 4-NP (tableau 4.37), un test de Cochran entre les différents laboratoires sur les niveaux C1 (test de Cochran, $C=0,82$, $p>0,05$) et C2 (test de

Cochran, $C=0,86$, $p>0,05$) nous indique qu'il n'y a pas de valeurs aberrantes. Les écart-types de répétabilité et de reproductibilité ont été calculés selon la norme NF ISO 725-2. L'écart-type moyen de répétabilité sur le sédiment s'élève à 28,6 et l'écart-type moyen de reproductibilité à 30,7.

De même, un test de Cochran sur l'essai croisé sur l'eau en contact avec le sédiment (tableau 4.38) nous indique qu'il n'y a pas de valeurs aberrantes sur les niveaux C1 (test de Cochran, $C=0,55$, $p>0,05$) et C2 (test de Cochran, $C=0,50$, $p>0,05$). Néanmoins, nous constatons une forte variabilité entre les laboratoires pour le niveau C0, c'est à dire pour les faibles concentrations.

TABLEAU 4.38 – Essai croisé sur l'eau en contact avec le sédiment dopé au 4-NP
Moyenne et écart-type entre les trois concentrations obtenues en $\mu\text{g/l}$.

	C0	C1	C2	technique d'analyse
LCPP	$0,7 \pm 0,1$	$107,3 \pm 7,8$	$187,5 \pm 10,4$	SPE + GC-MS
CETE	$1,9 \pm 0,1$	$94,2 \pm 11,5$	$194,0 \pm 15,0$	SPE + HPLC-fluo
LPTC	$< 0,01$	$95,0 \pm 7,0$	$167,0 \pm 11,0$	SPE + LC-MS-MS

L'écart-type moyen de répétabilité sur l'eau s'élève à 10,7 et l'écart-type moyen de reproductibilité à 13,2 (tableau 4.39).

TABLEAU 4.39 – Valeurs statistiques calculées pour l'essai croisé sur l'eau en contact avec un sédiment artificiel dopé au 4-NP

niveau	nombre de laboratoire	moyenne	écart-type de répétabilité	écart-type de reproductibilité
C1	3	98,8	9,8	10,1
C2	3	182,8	11,5	16,3

En conclusion, ces essais croisés mettent en évidence des résultats proches entre le CETE IDF, le LCPP, le LPTC et le LEESU, et ce pour les dosages de 4-NP dans la phase solide ou bien dans la phase aqueuse.

Les résultats de l'essai inter-laboratoire BIPEA permettent, en outre, de mettre en évidence des résultats analytiques, non seulement pour le dosage du 4-NP mais également pour celui du 4t-OP, compris dans l'intervalle de tolérance fixé par BIPEA (tableau 4.40).

TABLEAU 4.40 – Valeurs statistiques calculées pour l'essai croisé BIPEA sur l'eau dopée au 4-NP et au 4t-OP

substance	valeur assignée ($\mu\text{g/l}$)	tolérance	valeur mesurée ($\mu\text{g/l}$)
4-NP	0,672	$\pm 0,403$	0,885
4t-OP	0,325	$\pm 0,195$	0,445

Cet essai inter-laboratoire BIPEA confirme ainsi la justesse des résultats obtenus grâce à la technique de dosage des AP développée au cours de ce travail.

Annexe 4

Dégradation du 4-NP

La figure 4.43 présente la dégradation du 4-NP dans les unités expérimentales au cours du temps dans la phase aqueuse ainsi que dans la phase sédimentaire.

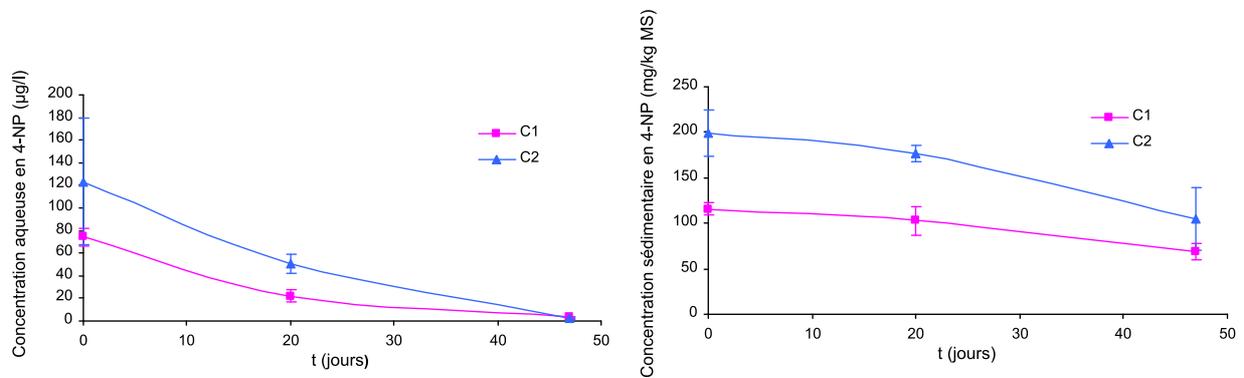


FIGURE 4.43 – Dégradation du 4-NP dans les phases aqueuse ($\mu\text{g/l}$) et sédimentaire (mg/kg de MS) dans les unités expérimentales au cours du temps
Moyenne et écart-type entre les trois réplicats.

Annexe 5

Photographies des sédiments utilisés

Ci-dessous les photographies des trois sédiments lyophilisés étudiés.



FIGURE 4.44 – Photographies du sédiment artificiel témoin, du sédiment d'Andrésey et du sédiment d'Orcemont

Annexe 6

Résultats détaillés des ANOVA mixtes réalisées

Le tableau 4.41 récapitule les résultats des ANOVA mixtes réalisées sur la longueur du mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le plomb.

TABLEAU 4.41 – Résultats des ANOVA réalisées sur la longueur du mentum - essais au plomb
Moyenne des trois réplicats.

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p
Témoin 1-Pb					
individu	$3,2 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	30	421,04	<0,05
côté	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	1	2,13	>0,05
individu x côté	$8,7 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	30	109,38	<0,05
erreur	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	61		
Témoin 2-Pb					
individu	$7,5 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	31	706,42	<0,05
côté	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	1	1,29	>0,05
individu x côté	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$	31	79,09	<0,05
erreur	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	63		
C1-Pb					
individu	$4,9 \cdot 10^{-1}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	29	529,22	<0,05
côté	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-4}$	1	0,25	>0,05
individu x côté	$7,2 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	29	77,15	<0,05
erreur	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	61		
C2-Pb					
individu	$3,5 \cdot 10^{-1}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	21	317,85	<0,05
côté	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	1	1,15	>0,05
individu x côté	$6,6 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	21	66,42	<0,05
erreur	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	45		
C3-Pb					
individu	$4,9 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	30	416,01	<0,05
côté	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	1	0,67	>0,05
individu x côté	$9,0 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	21	66,42	<0,05
erreur	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	63		
C4-Pb					
individu	$5,8 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	30	480,98	<0,05
côté	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	1	0,65	>0,05
individu x côté	$8,2 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	30	68,56	<0,05
erreur	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	63		
C5-Pb					
individu	$6,9 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	36	513,16	<0,05
côté	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-3}$	1	2,33	>0,05
individu x côté	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	36	89,30	<0,05
erreur	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-5}$	73		

Le tableau 4.42 récapitule les résultats des ANOVA mixtes réalisées sur la longueur du mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le 4-nonylphénol.

TABLEAU 4.42 – Résultats des ANOVA réalisées sur la longueur du mentum - essais au 4-NP
Moyenne des trois réplicats.

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p
Témoin 1-NP					
individu	$6,9.10^{-1}$	$2,2.10^{-2}$	32	655,83	<0,05
côté	$3,2.10^{-3}$	$3,2.10^{-3}$	1	1,06	>0,05
individu x côté	$9,4.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	32	89,00	<0,05
erreur	$2,3.10^{-3}$	$3,5.10^{-5}$	65		
Témoin 2-NP					
individu	$5,8.10^{-1}$	$1,8.10^{-2}$	33	359,82	<0,05
côté	$4,4.10^{-3}$	$4,4.10^{-3}$	1	1,27	>0,05
individu x côté	$9,6.10^{-2}$	$3,0.10^{-3}$	33	64,52	<0,05
erreur	$3,4.10^{-3}$	$5,0.10^{-5}$	67		
C1-NP					
individu	$6,4.10^{-1}$	$1,9.10^{-2}$	34	452,39	<0,05
côté	$4,4.10^{-3}$	$4,4.10^{-3}$	1	1,53	>0,05
individu x côté	$9,4.10^{-2}$	$2,8.10^{-3}$	34	68,45	<0,05
erreur	$2,9.10^{-3}$	$4,2.10^{-5}$	71		
C2-NP					
individu	$6,0.10^{-1}$	$1,7.10^{-2}$	34	486,99	<0,05
côté	$3,4.10^{-3}$	$3,4.10^{-3}$	1	1,36	>0,05
individu x côté	$9,6.10^{-2}$	$2,8.10^{-3}$	34	80,92	<0,05
erreur	$2,7.10^{-3}$	$3,8.10^{-5}$	71		
C3-NP					
individu	$6,9.10^{-1}$	$2,2.10^{-2}$	31	866,09	<0,05
côté	$1,5.10^{-3}$	$1,5.10^{-3}$	1	0,71	>0,05
individu x côté	$7,7.10^{-2}$	$2,5.10^{-3}$	31	96,04	<0,05
erreur	$1,7.10^{-3}$	$2,6.10^{-5}$	64		
C4-NP					
individu	$5,1.10^{-1}$	$1,8.10^{-2}$	28	456,59	<0,05
côté	$7,1.10^{-3}$	$7,1.10^{-3}$	1	2,64	<0,05
individu x côté	$7,4.10^{-2}$	$2,6.10^{-3}$	28	67,66	<0,05
erreur	$2,3.10^{-3}$	$4,0.10^{-5}$	58		

Le tableau 4.43 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur le mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le plomb. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.43 – Résultats des ANOVA procuste sur le mentum et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essais au plomb

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoïn 1-Pb							
individu	1,6.10 ⁻¹	6,4.10 ⁻⁵	2484	2,15	<0,0001		
côté	8,3.10 ⁻⁴	3,1.10 ⁻⁵	27	1,04	0,4071	0,43	0,0256
individu x côté	7,4.10 ⁻²	3,0.10 ⁻⁵	2484	33,61	<0,0001		
erreur	4,4.10 ⁻³	8,8.10 ⁻⁷	5022				
Témoïn 2-Pb							
individu	1,2.10 ⁻¹	6,3.10 ⁻⁵	1944	2,26	<0,0001		
côté	1,2.10 ⁻³	4,3.10 ⁻⁵	27	1,55	0,0353	0,45	0,1587
individu x côté	5,4.10 ⁻²	2,8.10 ⁻⁵	1944	18,92	<0,0001		
erreur	5,8.10 ⁻³	1,5.10 ⁻⁶	3942				
C1-Pb							
individu	1,8.10 ⁻¹	7,7.10 ⁻⁵	2322	2,81	<0,0001		
côté	7,2.10 ⁻⁴	2,7.10 ⁻⁵	27	0,98	0,4978	0,26	0,7636
individu x côté	6,3.10 ⁻²	2,7.10 ⁻⁵	2322	30,00	<0,0001		
erreur	4,3.10 ⁻³	9,1.10 ⁻⁷	4698				
C2-Pb							
individu	1,1.10 ⁻¹	6,4.10 ⁻⁵	1728	2,07	<0,0001		
côté	2,8.10 ⁻³	1,0.10 ⁻⁴	27	3,41	<0,0001	0,46	0,3109
individu x côté	5,3.10 ⁻²	3,1.10 ⁻⁵	1728	34,29	<0,0001		
erreur	3,1.10 ⁻³	9,0.10 ⁻⁷	3510				
C3-Pb							
individu	1,6.10 ⁻¹	6,7.10 ⁻⁵	2457	2,47	<0,0001		
côté	1,3.10 ⁻³	4,8.10 ⁻⁵	27	1,76	0,0089	0,35	0,1963
individu x côté	6,6.10 ⁻²	2,7.10 ⁻⁵	2457	29,53	<0,0001		
erreur	4,6.10 ⁻³	9,2.10 ⁻⁷	4968				
C4-Pb							
individu	8,3.10 ⁻²	5,1.10 ⁻⁵	1620	1,79	<0,0001		
côté	9,3.10 ⁻⁴	3,4.10 ⁻⁵	27	1,20	0,2211	0,66	0,0078
individu x côté	4,6.10 ⁻²	2,9.10 ⁻⁵	1620	24,09	<0,0001		
erreur	3,9.10 ⁻³	1,2.10 ⁻⁶	3294				
C5-Pb							
individu	1,5.10 ⁻¹	6,6.10 ⁻⁵	2268	2,04	<0,0001		
côté	1,9.10 ⁻³	7,0.10 ⁻⁵	27	2,18	0,0004	0,48	0,0131
individu x côté	7,3.10 ⁻²	3,2.10 ⁻⁵	2268	26,22	<0,0001		
erreur	5,7.10 ⁻³	1,2.10 ⁻⁶	4590				

Le tableau 4.44 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur le mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le 4-NP. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.44 – Résultats des ANOVA procuste sur le mentum et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essais au 4-NP

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoin							
1-NP							
individu	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$	2538	2,22	<0,0001		
côté	$8,1 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	27	1,06	0,3816	0,37	0,1051
individu x côté	$7,2 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	2538	26,71	<0,0001		
erreur	$5,4 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	5130				
Témoin							
2-NP							
individu	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$	2430	2,07	<0,0001		
côté	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	27	0,91	0,6026	0,91	0,5589
individu x côté	$7,5 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	2430	22,40	<0,0001		
erreur	$6,8 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	4914				
C1-NP							
individu	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$	2538	2,10	<0,0001		
côté	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	27	2,42	<0,0001	0,37	0,1034
individu x côté	$7,3 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	2538	29,83	<0,0001		
erreur	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$9,6 \cdot 10^{-7}$	5130				
C2-NP							
individu	$1,9 \cdot 10^{-1}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	2727	2,31	<0,0001		
côté	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	27	2,29	0,0002	0,36	0,0702
individu x côté	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	2727	23,82	<0,0001		
erreur	$7,0 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	5508				
C3-NP							
individu	$1,3 \cdot 10^{-1}$	$5,7 \cdot 10^{-5}$	2322	2,31	<0,0001		
côté	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	27	1,43	0,0707	0,49	0,0081
individu x côté	$5,7 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	2322	26,41	<0,0001		
erreur	$4,4 \cdot 10^{-3}$	$9,3 \cdot 10^{-7}$	4698				
C4-NP							
individu	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$	2268	2,62	<0,0001		
côté	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	27	4,38	<0,0001	0,42	0,0886
individu x côté	$7,0 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	2268	22,44	<0,0001		
erreur	$6,3 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	4590				

Le tableau 4.45 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur le mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le sédiment d'Orcemont ainsi que sur le sédiment d'Andrésey. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.45 – Résultats des ANOVA procuste sur le mentum et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essai sur les sédiments d'Orcemont et d'Andrésey

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoin Or-							
cemont							
individu	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	4023	1,75	<0,0001		
côté	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	27	0,88	0,639	0,28	0,018
individu x côté	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	4023	20,52	<0,0001		
erreur	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	8100				
Orcemont							
individu	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$5,9 \cdot 10^{-5}$	3483	2,06	<0,0001		
côté	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$	27	1,89	0,0036	0,40	0,0004
individu x côté	$9,9 \cdot 10^{-2}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	3483	28,87	<0,0001		
erreur	$6,9 \cdot 10^{-3}$	$9,9 \cdot 10^{-7}$	7020				
Témoin An-							
drésy							
individu	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$6,1 \cdot 10^{-5}$	4158	1,81	<0,0001		
côté	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	27	1,73	0,0109	0,45	<0,0001
individu x côté	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	4158	36,78	<0,0001		
erreur	$7,7 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-7}$	8370				
Andrésey							
individu	$2,6 \cdot 10^{-1}$	$5,9 \cdot 10^{-5}$	4374	2,36	<0,0001		
côté	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	27	2,78	<0,0001	0,43	<0,0001
individu x côté	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	4374	24,29	<0,0001		
erreur	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	8802				

Le tableau 4.46 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur la forme des ailes des organismes femelles des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le sédiment d'Orcemont ainsi que sur le sédiment d'Andrésy. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.46 – Résultats des ANOVA procuste sur la forme des ailes des organismes femelles et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essai sur les sédiments d'Orcemont et d'Andrésy

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoin Or-							
cemont							
individu	9,9.10 ⁻²	1,3.10 ⁻⁴	768	4,22	<0,0001		
côté	1,1.10 ⁻⁴	9,0.10 ⁻⁶	12	0,29	0,9903	0,90	0,9424
individu x côté	2,3.10 ⁻²	3,0.10 ⁻⁵	768	15,38	<0,0001		
erreur	3,1.10 ⁻³	2,0.10 ⁻⁶	1560				
Orcemont							
individu	5,7.10 ⁻²	9,7.10 ⁻⁵	588	2,76	<0,0001		
côté	5,9.10 ⁻⁴	4,9.10 ⁻⁵	12	1,40	0,1595	0,29	0,2599
individu x côté	2,1.10 ⁻²	3,5.10 ⁻⁵	588	15,37	<0,0001		
erreur	2,7.10 ⁻³	2,3.10 ⁻⁶	1200				
Témoin An-							
drésy							
individu	4,3.10 ⁻²	1,1.10 ⁻⁴	408	4,54	<0,0001		
côté	4,0.10 ⁻⁴	3,3.10 ⁻⁵	12	1,42	0,1539	0,44	0,1821
individu x côté	9,6.10 ⁻³	2,3.10 ⁻⁵	408	10,06	<0,0001		
erreur	2,0.10 ⁻³	2,3.10 ⁻⁶	840				
Andrésy							
individu	3,4.10 ⁻²	9,7.10 ⁻⁵	348	3,85	<0,0001		
côté	5,0.10 ⁻⁴	4,1.10 ⁻⁵	12	1,65	0,0767	0,60	0,0561
individu x côté	8,8.10 ⁻³	2,5.10 ⁻⁵	348	11,11	<0,0001		
erreur	1,6.10 ⁻³	2,3.10 ⁻⁶	720				

Le tableau 4.47 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur la forme des ailes des organismes mâles des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le sédiment d'Orcemont ainsi que sur le sédiment d'Andrésy. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.47 – Résultats des ANOVA procuste sur la forme des ailes des organismes mâles et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essai sur les sédiments d'Orcemont et d'Andrésy

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoin Or-							
cemont							
individu	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	648	4,49	<0,0001		
côté	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	12	0,55	0,8834	0,18	0,6455
individu x côté	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	648	11,82	<0,0001		
erreur	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$	1320				
Orcemont							
individu	$4,6 \cdot 10^{-2}$	$9,8 \cdot 10^{-5}$	468	2,73	<0,0001		
côté	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	12	0,52	0,9023	0,19	0,8517
individu x côté	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	468	18,08	<0,0001		
erreur	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	960				
Témoin An-							
drésy							
individu	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$9,2 \cdot 10^{-5}$	408	3,58	<0,0001		
côté	$8,3 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-5}$	12	2,70	0,0016	0,60	0,0148
individu x côté	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	408	14,00	<0,0001		
erreur	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	840				
Andrésy							
individu	$4,4 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	348	4,29	<0,0001		
côté	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	12	1,02	0,4297	0,34	0,6631
individu x côté	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	348	12,17	<0,0001		
erreur	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	720				

Le tableau 4.48 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur la taille centroïde des ailes des organismes femelles des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le sédiment d'Orcemont ainsi que sur le sédiment d'Andrésy.

TABLEAU 4.48 – Résultats des ANOVA procuste sur la taille centroïde des ailes des organismes femelles - essai sur le sédiment d'Orcemont et essai sur le sédiment d'Andrésy

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p
Témoin Orcemont					
individu	1192103	18627	64	168,15	<0,0001
côté	5	5	1	0,05	0,8262
individu x côté	7090	111	64	34,26	<0,0001
erreur	420	3	130		
Orcemont					
individu	308040	6287	49	56,45	<0,0001
côté	34	34	1	0,30	0,5834
individu x côté	5457	111	49	46,79	<0,0001
erreur	238	2	100		
Témoin Andrésy					
individu	449320	13215	34	178,03	<0,0001
côté	79	79	1	1,06	0,3106
individu x côté	2524	74	34	13,43	<0,0001
erreur	387	6	70		
Andrésy					
individu	310986	10724	29	229,85	<0,0001
côté	215	215	1	4,62	0,0401
individu x côté	1353	47	29	15,82	<0,0001
erreur	177	3	60		

Le tableau 4.49 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur la taille centroïde des ailes des organismes mâles des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur le sédiment d’Orcemont ainsi que sur le sédiment d’Andrésey.

TABLEAU 4.49 – Résultats des ANOVA procuste sur la taille centroïde des ailes des organismes mâles - essai sur le sédiment d’Orcemont et essai sur le sédiment d’Andrésey

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p
Témoin Orcemont					
individu	312373	5785	54	80,46	<0,0001
côté	56	56	1	0,78	0,3802
individu x côté	3883	72	54	14,97	<0,0001
erreur	528	5	110		
Orcemont					
individu	1612371	4134	39	37,39	<0,0001
côté	182	182	1	1,65	0,2070
individu x côté	4312	111	39	29,94	<0,0001
erreur	295	4	80		
Témoin Andrésey					
individu	225540	6634	34	163,24	<0,0001
côté	24	24	1	0,59	0,4481
individu x côté	1382	41	34	16,40	<0,0001
erreur	174	2	70		
Andrésey					
individu	101111	3487	29	51,25	<0,0001
côté	16	16	1	0,23	0,6321
individu x côté	1973	68	29	27,19	<0,0001
erreur	150	3	60		

Le tableau 4.50 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur le mentum des différents groupes étudiés appartenant à la génération F1 dans le cadre des essais portant sur le sédiment d'Orcemont ainsi que sur le sédiment d'Andrésey. Les résultats de la MANOVA sur l'effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.50 – Résultats des ANOVA procuste sur le mentum de la génération F1 et résultats des MANOVA sur l'effet côté - essai sur les sédiments d'Orcemont et d'Andrésey
Le premier nom du groupe indique le sédiment d'origine du groupe parent, le deuxième celui de la génération F1.

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
Témoin- Témoin							
individu	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$	2160	1,47	<0,0001		
côté	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	27	0,52	0,9798	0,44	0,0794
individu x côté	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	2160	36,65	<0,0001		
erreur	$4,6 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	4374				
Orcemont- Témoin							
individu	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$	2106	1,83	<0,0001		
côté	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$	27	1,97	0,0021	0,52	0,0119
individu x côté	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	2106	32,26	<0,0001		
erreur	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^{-7}$	4266				
Orcemont- Orcemont							
individu	$1,2 \cdot 10^{-1}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$	1809	2,04	<0,0001		
côté	$9,2 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	27	1,06	0,3834	23,83	<0,0001
individu x côté	$5,8 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	1809	26,59	<0,0001		
erreur	$4,4 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	3672				
Andrésey- Témoin							
individu	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$6,1 \cdot 10^{-5}$	2997	1,71	<0,0001		
côté	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	27	1,99	0,0018	0,48	<0,0001
individu x côté	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	2997	34,03	<0,0001		
erreur	$6,3 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	6048				
Andrésey- Andrésey							
individu	$2,4 \cdot 10^{-1}$	$7,9 \cdot 10^{-5}$	3105	2,95	<0,0001		
côté	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-5}$	27	2,89	<0,0001	0,52	<0,0001
individu x côté	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	3105	26,72	<0,0001		
erreur	$6,3 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	6264				

Le tableau 4.51 récapitule les résultats des ANOVA procuste sur le mentum des différents groupes étudiés dans le cadre des essais portant sur la population de *Chironomus* colonisant la station d’Orcemont. Les résultats de la MANOVA sur l’effet côté sont également reportés.

TABLEAU 4.51 – Résultats des ANOVA procuste sur le mentum de la population de *Chironomus* provenant de la station d’Orcemont : groupe ayant crû en laboratoire sur un sédiment témoin et groupe prélevé *in situ* et résultats des MANOVA sur l’effet côté

	somme des carrés	carré moyen	ddl	F	p	Tr. Pillai	p
population Orcemont sur témoin							
individu	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	2187	1,78	<0,0001		
côté	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	27	1,19	0,2320	0,53	0,0049
individu x côté	$8,8 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	2187	38,89	<0,0001		
erreur	$4,6 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	4428				
Orcemont <i>in situ</i>							
individu	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$8,5 \cdot 10^{-5}$	2322	2,77	<0,0001		
côté	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	27	1,02	0,4363	0,47	0,0134
individu x côté	$7,1 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	2322	23,69	<0,0001		
erreur	$6,1 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	4698				

Liste des publications

Communications affichées

Sublethal effects of lead sediment contamination in *Chironomus riparius* larvae: Analysis of mentum shape through fluctuating asymmetry approach and geometric morphometrics. Congrès annuel de la SEFA, Paris, juin 2011.

Bioaccumulation and sublethal toxicity of 4-nonylphenol in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae: Assessment of mentum shape variations by morphometric analyses. 6th SETAC World Congress, Berlin, mai 2012.

Communications orales

Un exemple d'indicateur de suivi environnemental des rivières : les instabilités de développement affectant le chironome (Diptère). 22^{èmes} Journées Scientifiques de l'Environnement - Reconquête des environnements urbains : les défis du 21^{ème} siècle, Créteil, février 2011.

Articles

Arambourou, H., Beisel, J. N., Branchu, P., Debat, V. 2012. Patterns of fluctuating asymmetry and shape variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to nonylphenol or lead. *Plos One* **7**, e48844.

Long-term exposure to lead disrupts methallothionein and energy reserves of the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). (En cours).

Patterns of Fluctuating Asymmetry and Shape Variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) Exposed to Nonylphenol or Lead

Hélène Arambourou^{1,2*}, Jean-Nicolas Beisel², Philippe Branchu¹, Vincent Debat³

1 CETE Ile de France, Unité qualité des eaux et des sols, IFSTTAR-ERA n°85, Trappes, France, 2 Université de Lorraine, Laboratoire LIEBE CNRS-UMR 7146, Metz, France, 3 UMR 5202 OSEB, Département Systématique et Evolution, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

Abstract

Deformities and fluctuating asymmetry in chironomid larvae have been proposed as sensitive indicators of biological stress and are commonly used to assess the ecological impact of human activities. In particular, they have been associated in *Chironomus riparius*, the most commonly used species, with heavy metal and pesticide river pollution. In this study, the effect of lead and 4-nonylphenol on mouthpart morphological variation of *Chironomus riparius* larvae was investigated by traditional and geometric morphometrics. For this purpose, first to fourth instar larvae were exposed to sediment spiked with lead (from 3.0 to 456.9 mg/kg dry weight) or 4-NP (from 0.1 to 198.8 mg/kg dry weight). Mentum phenotypic response to pollutants was assessed by four parameters: (1) the frequency of deformities, (2) fluctuating asymmetry of mentum length, (3) fluctuating asymmetry of mentum shape and (4) the mentum mean shape changes. Despite the bioaccumulation of pollutants in the chironomid's body, no significant differences between control and stressed groups were found for mouthpart deformities and fluctuating asymmetry of mentum length. Slight effects on mentum shape fluctuating asymmetry were observed for two stressed groups. Significant mean shape changes, consisting of tooth size increase and tooth closing, were detected for lead and 4-NP exposure respectively. Those variations, however, were negligible in comparison to mentum shape changes due to genetic effects. These results suggest that the use of mentum variation as an indicator of toxic stress in *Chironomus riparius* should be considered cautiously.

Citation: Arambourou H, Beisel JN, Branchu P, Debat V (2012) Patterns of Fluctuating Asymmetry and Shape Variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) Exposed to Nonylphenol or Lead. PLoS ONE 7(11): e48844. doi:10.1371/journal.pone.0048844

Editor: Gabriele Sorci, CNRS, Université de Bourgogne, France

Received: June 4, 2012; Accepted: October 1, 2012; Published: November 2, 2012

Copyright: © 2012 Arambourou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work has been financially supported by the The Research and Innovation Directorate (DR) of the French Ministry of Ecology, by the IFSTTAR organism (French institute of science and technology for transport, development and networks) and by the French Water Agency (AESN). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: helene.arambourou@developpement-durable.gouv.fr

Introduction

Development of anthropogenic activities in the XIXth century has led to generalised river contamination. Aquatic ecosystems have been exposed to a wide variety of mineral and organic substances, which induce a stress on living organisms. This stress acts at the molecular, cellular and physiological levels [1]. It affects on a long term basis the dynamics of aquatic organisms and could be involved in fine in many species extinction [2]. If the community level is an adequate scale to reveal lethal effect, it does not allow to detect subtle toxic stress that do not lead immediately to a species disappearance. In this context, investigations at the individual and population levels are of major interest to highlight sublethal effects of pollutants [3].

Detecting sublethal effect in natural populations requires the use of a model that is in some extent tolerant to the pollutant. Choosing an appropriate bio indicator species thus depends on a delicate but necessary balance between its sensitivity (the characteristics used as a biomarker) and its ability to cope with stress (allowing the species to survive in the polluted area) (see [4] for a review).

Chironomids have been largely used as a bio indicator of freshwater quality because they are very abundant [5] even in

highly polluted rivers, where they often present phenotypic and developmental defects that can be easily detected [6].

Amongst chironomids the genus *Chironomus* is particularly prone to such pollution-induced phenotypes [7], [8], and its abundance in both clean and polluted areas allows powerful statistical comparisons. Its larvae spend the majority of their life in sediment making them particularly relevant for sediment bioassay.

Because it can be reared in the laboratory (short life cycle, resistance to manipulation) *Chironomus riparius* has become the most widely used *Chironomus* species [9], [10], [11], [12], thereby providing a good comparative framework. Results of previous studies on the impact of various pollutants on its morphology are nevertheless equivocal: while most studies have reported morphogenetic effects of pollution in the wild [6], [9], [13], [14] some lab studies failed to detect such effects [15], [16], [17]. The potential of this species as a general bio indicator of sediment pollution thus needs to be further investigated.

Morphogenetic defects occur when developmental homeostasis is insufficient to compensate environmental stress [2], [18], [19], [20]. These phenotypes are in turn used as an early warning indicator of toxic stress, and are routinely scored on *Chironomus* spp. [21]. This reasoning implies that although *Chironomus* are able to survive their polluted environment, either their development

remains sensitive to the toxics or their overall resistance comes at the cost of a less stable development. Such developmental defects are phenotypically expressed as deformities, fluctuating asymmetry and various shape changes.

Deformities have been widely reported in chironomid larvae in river sediments contaminated with heavy metals [22], [23] and organic pollutants [12]. They consist of an increase in the frequency of abnormal phenotypes that normally occur very rarely in any population. Fluctuating Asymmetry (FA) refers to random and subtle departure from a perfect bilateral symmetry [24]. It has also been repeatedly shown that levels of FA in chironomid larvae [6], [9], [25], are higher when exposed to pollution. However, the response seems to depend largely on the studied trait [12].

Recently, subtle mean shape changes in trait of interest have been proposed as a more sensitive marker than FA to detect toxic stress [26]. Many genes being involved in organ shape, perturbations during development are indeed likely to alter the usual shape [27]. This is a special case of phenotypic plasticity where two samples are submitted to different environmental conditions—one of them being potentially stressful. While the stress-induced phenotypes should be somehow detrimental, no prediction on the specific phenotype can typically be made.

Here, we investigated the potential for these different phenotypic traits to reveal a sublethal toxic stress in *Chironomus riparius* larvae. We aimed both at ascertaining the validity of those morphological traits as bio indicators in this model species and at identifying the specific effect of two commonly found pollutants: the 4-nonylphenol (4-NP), an endocrine disruptor [28], and the lead (Pb), a nonessential metal.

Lead was chosen because it is still widely detected in aquatic systems, particularly in sediments [29]. Moreover, while its acute toxicity in macroinvertebrates has been widely reported [30], few studies have considered sublethal effects [31]. Studied concentrations ranged from 0 to 500 mg/kg dry weight, based on concentrations commonly measured in freshwater sediments [22], [32]. In the wild, a relationship between lead concentration in sediment and mentum deformity rate in chironomid larvae has been established for sediment concentrations ranging from 7.6 to 3812.2 mg/kg dw [23]. Moreover, a positive correlation between mentum deformity rate and lead concentration in *Chironomus* bodies was reported for sediment concentrations ranging from 20 to 240 mg/kg dw [22]. On other taxa, growth retardation was observed in *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) for exposure concentration of 16 mg/l [33].

4-NP was selected because it is a toxic compound coming from degradation of nonylphenol ethoxylates, a surfactant widely used to produce oil soluble detergents and emulsifiers [34], [35]. Concentrations tested were limited to ecologically relevant levels, that is lower than 200 mg/kg dw. For these range of concentrations, growth retardation was observed in *Chironomus riparius* larvae [36], [37]. In addition, Meregalli et al. [38] observed mouthpart defects in *Chironomus riparius* larvae for exposure concentrations of 100 mg/l. Morphological abnormalities were also reported in other taxa, such as *Daphnia magna* (Crustacea) for concentrations of 44 mg/l [39]. Moreover, effects on growth and reproduction were observed in *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) for concentration of 40 mg/l [40].

We investigated four mentum phenotypic traits: (1) the rate of deformities, (2) mentum length FA, (3) mentum shape FA and (4) mentum mean shape differences among samples. We tested and compared the response of these four potential phenotypic biomarkers to assess their relative sensitivity to toxic exposure in this model species.

Materials and Methods

Experimental Design

Bioassays consisted in two separate similarly structured experiments: one with lead and the other with 4-NP. Chironomid larvae were placed during their complete larval cycle (i.e. 1st to 4th instar) in sediment spiked with increasing concentrations of either one of the two pollutants (see Figure 1 for an overview of the experimental design).

For logistic reasons, we had to split each experiment into two bioassay sessions in order to obtain a sufficient number of newly hatched larvae at a time. For lead bioassay, the first session was performed with sediment concentrations lower than 150 mg/kg dw (from C1 to C3) and the second one with sediment concentrations ranging from 200 to 500 mg/kg dw (from C4 to C5). For 4-NP bioassay, the first one was conducted with concentrations of 67 and 185 mg/kg dw (C1 and C3) and the second one with concentrations of 115 and 199 mg/kg dw (C2 and C4). To test for a possible session effect, we included control aquaria in each session performed. As different egg masses derived from different females [41] had to be used in the different sessions, any differences among control aquaria of both sessions would likely reflect genetic effects.

Test Animals and Culture Conditions

Test organisms were reared in the laboratory (CETE Ile de France, Trappes) and were obtained from our laboratory stocks that have been maintained for eight years since we obtained them from the IRSTEA (Lyon) laboratory culture. This strain was originally obtained from a cross breeding between several laboratory strains. The stock culture was kept in an incubator at 15.6 °C on a 16:8 h light:dark photoperiod. The temperature chosen was lower than the temperature of 20 °C usually applied [10], [11] to be more representative of natural conditions. Indeed, our observations in rivers of the Paris region (France) showed that the temperatures do not exceed 18 °C. Aquaria were composed of 2 cm sand layer surrounded by a mixture of deionised water and source water (pH = 7.7, electrical conductivity = 350 µS/cm, hardness = 142 mg CaCO₃/l).

Artificial Sediment Preparation

Following OECD bioassay recommendations [42], artificial sediment is a mixture of Fontainebleau sand (75.3%), kaolin (19.0%), braked peat (5.0%) and calcium carbonate (0.7%). The pH is 8.9, the organic matter content is 5% dw, the organic carbon content is 2% dw and the nitrogen organic content is 0.03% dw. Median diameter of solid particles is 218 nm.

Sediment Spiking

To spike sediment with lead, 400 ml of PbCl₂ (Anhydrous for synthesis, Merck) solution was added to 1000 g of wet sediment. To spike sediment with 4-NP known quantity of 4-NP (Pestanal H, Sigma Aldrich), was directly added to wet sediment and mixed with deionised water (for 1000 g of wet sediment, 400 ml of water was added). This process did not involve the use of solvent [36], which could induce mouthpart deformities [43]. Therefore, sediment spiked with lead or 4-NP was shaken for 24 h to enhance sorption of contaminant. After shaking, the sediment was separated from water by centrifugation at 4000 rpm during 20 minutes. For lead bioassay we used only plastic (PE-HD) container cleaned with diluted nitric acid. For 4-NP bioassay, we used only container in glass burned for two hours at 550 °C or rinsed with solvent.

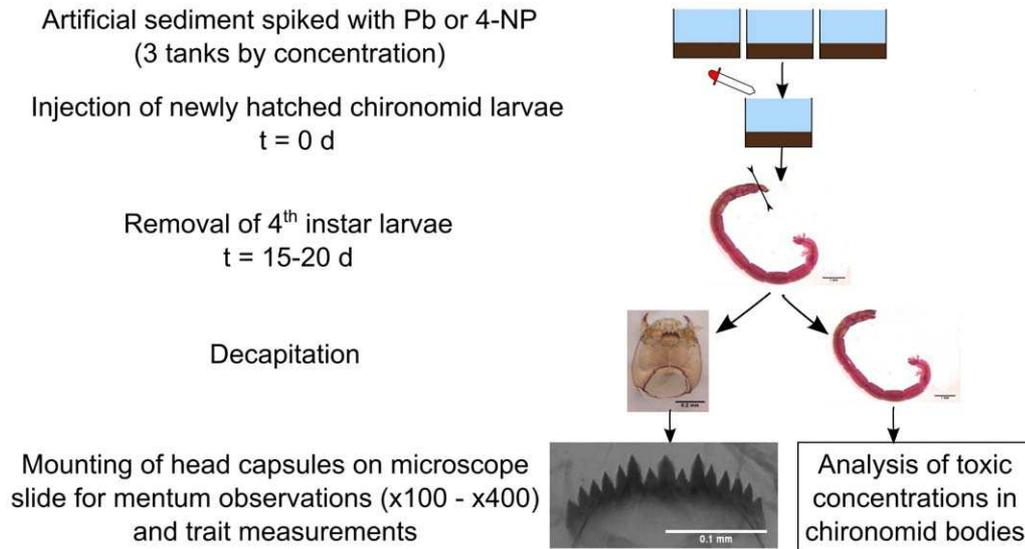


Figure 1. Experimental design of the bioassays conducted. Measurement performed on mentum: 1) frequency of deformities, 2) length FA, 3) shape FA and 4) mean shape changes.
doi:10.1371/journal.pone.0048844.g001

Experimental Aquaria

Tanks were maintained at 156 μ C, on a 16:8 h light:dark photoperiod. A 1.5 centimeter layer of artificial sediment was provided as a substrate and a volume of rearing water four times greater was added. Water and sediment were left for two days to allow toxic equilibration and settlement of suspended solids. Two hours before larvae injection, overlying water was aerated. The study design included 3 aquaria for each concentration and 3 control aquaria.

Chironomid Samples and Preparation

Four days before injection, to obtain a sufficient number of organisms, five egg masses were taken from lab culture and placed in Petri dishes containing rearing water. Each egg masses contained between 265 and 722 eggs [44]. We monitored them to assure that egg hatched and first instar larvae dispersed. Then, we randomly took newly hatched larvae from these five egg-masses and injected them in test aquaria (Figure 1). Each larva had a mean of 2 cm^2 of sediment available [42]. The larvae were fed daily with 0.40 mg of fish food (TetraminH) per individual.

Measurements of the overlying water were taken for pH, temperature, conductivity, dissolved oxygen and nitrite at zero time and at subsequent 3 days intervals until the end of the test. At 15 μ C, larvae reach the 4th instar after 15 days. To make sure that individuals were at the 4th instar, we removed them between day 16 and day 20. Upon collection, chironomid larvae were rinsed in deionised water bath to remove particle bound to the external surface [45]. To kill them, they were placed on Petri dishes containing deionised water during 24 h in box with atmosphere saturated by formaldehyde. Chironomid head capsules were then removed and treated to remove internal tissues as recommended by Epler [46]. Finally, they were mounted to present a ventral view on microscope slide using EukittH medium. Head capsules were examined under microscope at 100 \times and 400 \times magnification (Microscope: Nikon Eclipse E600) and photographed with a (Sony – SSC-DC14) camera.

Determination of Pb in Chironomid Bodies, Sediments and Water

After decapitation, chironomid bodies were dried at 30 μ C during 24 hours. Then, they were digested in a mixture of 6 ml of HNO_3 , 2 ml of HCl and 2 ml of H_2O_2 . Samples were heated at 125 μ C in a fume-hood during two hours. Therefore, they were diluted to 40 ml with deionised water. Sediment samples were dried at 105 μ C during 24 hours, digested as chironomid bodies and diluted to 100 ml with deionised water. Water samples were filtered at 0.45 μ m with nitrocellulose filter, acidified with HNO_3 and stored at 4 μ C until analysis. Lead determination for all media was performed using furnace atomic absorption (Varian, GTA 120). Single element calibration standards and multielement quality control standards were utilized for calibration and quality assurance, respectively. Lead quantification limits were 1.00 mg/l for water, 0.23 mg/kg dw for chironomid bodies and 0.20 mg/kg dw for sediment.

Determination of 4-NP in Chironomid Bodies, Sediments and Water

After decapitation, chironomid bodies were lyophilized. The complete extraction of 4-NP was obtained by mixing chironomid bodies with 5 ml of ultra pure methanol. The mixture was placed two times in sonication bath for 15 minutes with 15 minutes rest time and diluted. Extract was preconcentrated using C-18 encaped Solid Phase Extraction (SPE) column (Macherey-Nagel) eluted with dichloromethane. Water samples were filtered at 0.45 μ m with glass fiber filter and was then preconcentrated using C-18 encaped SPE column eluted with dichloromethane. Complete extraction for lyophilized sediment was made by Soxhlet extraction with ultrapure methanol. Before extraction, an internal standard (4n-NP, Dr Ehrenstorfer) was added to calculate procedure efficiency. Analyses were made by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) equipped with a fluorescence detector (Waters 2475). The detector excitation and emission wavelengths were set at 230 and 290 nm, respectively. 50 μ l of sample was injected directly into the C-18 5 mm column (4.66 125 mm; Alltima) maintained at 30 μ C and eluted with an

isocratic mixture of water-acetonitrile (30:70) with a constant flow of 1 ml/min. To provide quality assurance, a quality control was injected during each analysis session. 4-NP quantification limits were 0.06 mg/l in water, 0.28 mg/kg dw in chironomids and 0.01 mg/kg dw in sediment.

Deformities Analysis

To assess the phenotypic effects of toxic treatments, we first examined the deformity rate. The mentum was considered as deformed if it had extra tooth, missing tooth, or fusing teeth (Figure 2). If missing tooth had rough surface as opposed to smooth surface, mentum was considered broken and not deformed. Cleft medial tooth was difficult to assess in several cases due to the slight size indentation. We thus did not consider this type of phenotypic variation as a deformity.

Trait Measurement

Left and right sides of the mentum were measured using ImageJ software [47]. To assess measurement error which is of prime importance in FA studies [24], all measurements were taken twice with one day interval. For mentum length FA, the distance between the apex of median tooth and the apex of the more external tooth was measured on both sides (Figure 3).

To assess shape FA and shape changes, we digitized 29 "type 1" landmarks [48] using TPSdig2 software [49]. Landmarks were defined as the apex and the base of teeth (Figure 4).

Geometric Morphometric Analyses

In order to get rid of the differences among configurations other than shape differences – position, orientation and size – all configurations were superimposed using generalized Procrustes superimposition method [50]. This method combines three transformations: (1) scaling: all configurations are scaled to a unit centroid size; (2) translation: all configurations centroids are superimposed; (3) rotation: the configurations are rotated around their centroid to achieve an optimal fit of corresponding landmarks.

Fluctuating Asymmetry Analyses

Analyses of length and shape FA were performed as recommended by Palmer and Strobeck [51] and Klingenberg and McIntyre [52] using a two-way mixed model ANOVA with side (fixed) and individual (random) as factors. Departure from ideal FA (the occurrence of either Directional Asymmetry (DA) or Antisymmetry (AS), two other kinds of asymmetry) was tested by comparing the observed distributions of signed right minus left differences (R-L) to a normal distribution centred on zero. Because measurement error can contribute in a large proportion to FA variation, we tested for the significance of FA (interaction term in

the ANOVA) relative to measurement error. This ANOVA also provides a test for DA (side effect).

For length FA analysis, data were log-transformed to avoid undesirable size-dependent heterogeneity [51]. To test for the symmetry of the distribution, we calculated skewness value. AS was assessed by calculating Kurtosis value. Following Palmer and Strobeck [51], to test for allometric effect, we assessed the relationships between absolute asymmetry ($|R-L|$) and trait size by nonparametric Spearman correlation test. A nonparametric test was preferred because it does not assume homogeneity of variance and it is less sensitive to outliers.

For shape FA analysis, the occurrence of AS was examined by scatter plots of vectors of shape asymmetry: a clustering would indicate AS phenomenon. To avoid making the assumption of isotropic variation at all landmarks, the occurrence of shape DA was tested using MANOVA statistics [53]. To test for size effects on shape asymmetry, we performed a regression between mean centroid size and vectors of shape asymmetry.

FA10 was used as a FA index [51]. This index describes the average difference between sides after measurement error has been partitioned out. Because FA10 is a variance estimate, we used F-test to compare differences in FA between two concentrations. Morphometric and statistical analyses were performed with R [54] and Morpho J [55] softwares.

Analyses of Mentum Shape Variations between Treatment Groups by Canonical Variate Analysis (CVA)

Shape variations among treatment groups were analyzed by Canonical Variate Analysis (CVA). For each bioassay session, we performed a CVA to assess shape differences between control and stressed groups. The Procrustes distance between each group was calculated and the significance was assessed by a permutation test (10 000 permutations). Similarly, mentum shape variation was evaluated between bioassay sessions.

Results

Physico-chemicals Variables

During exposures pH ranged from 7.3 to 9.1, temperature from 14.5 to 16.4°C, conductivity from 346 to 742 $\mu\text{S}/\text{cm}$, dissolved oxygen from 5.5 to 10.0 mg/l and nitrite from 0 to 6.1 mg/l. No significant differences were observed for pH, temperature, conductivity, dissolved oxygen and nitrite for any replicates of the four bioassays (pairwise Wilcoxon tests with Holm adjustment, all $p < 0.05$).

Toxic Concentrations in Sediment, Water and Chironomid Bodies

Toxic concentrations in chironomid bodies increased with toxic concentrations exposure (Table 1). Lead body burdens increased

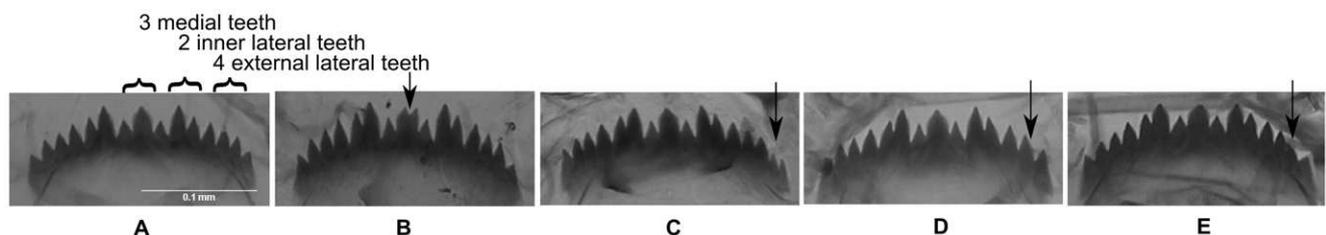


Figure 2. Normal and deformed mentum observed in chironomids exposed at lead and at 4-NP. Normal mentum (A), left median tooth (B), extra tooth (C), missing tooth (D), fusing teeth (E). Arrows indicate deformities. doi:10.1371/journal.pone.0048844.g002

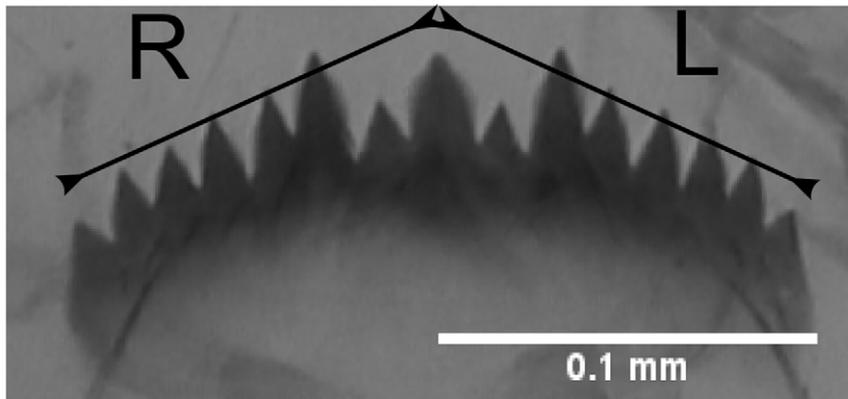


Figure 3. Trait selected to measure length FA.
doi:10.1371/journal.pone.0048844.g003

linearly with lead sediment concentrations from 2.4 mg/ kg dw to 274 mg/ kg dw. For 4-NP exposure, accumulation became significant for C3 (184.6 mg/ kg dw) (one-sided Wilcoxon test, $W = 0$, $p = 0.05$) and C4 (198.8 mg/ kg dw) groups (one-sided Wilcoxon test, $W = 0$, $p = 0.05$).

For lead bioassays, emergence rate was assessed for Control, C4 (220.5 mg/ kg) and C5 (456.9 mg/ kg) groups. No significant difference was observed (one-sided Wilcoxon test, $W = 5$, $p = 0.05$) suggesting a lack of lethal effect. For 4-NP bioassays, emergence rate was assessed for Control, C2 (115.4 mg/ kg) and C4 (198.8 mg/ kg) groups. We noticed a significant decrease (one-sided Wilcoxon test, $W = 9$, $p = 0.05$) for C4 group with a mean percentage of 25% against 76% for the control group, suggesting an increased larval mortality.

A slight decrease in 4-NP exposure was detected during the experiment. 10% decrease was detected in sediment for concentrations C2, C3 and C4 between the start and the end of exposure. Similarly, we observed a 4-NP degradation in water resulting in 4-NP decrease of 70% and 59% for C2 and C4 exposure, respectively. On the contrary, lead exposure was steady throughout the experiment (Wilcoxon tests, all $p = 0.05$).

Mentum Deformities

For deformities analyses, replicate test aquaria behaved similarly and were thus pooled. No significant difference between control and treated groups was observed (Table 2) (Proportion tests, all

$p = 0.05$). Detected deformities were essentially confined to the external teeth. We noticed a lack of fusing teeth for all control groups but also for C4-Pb and C1-4NP groups.

Fluctuating Asymmetry of Mentum Length

No departure from normality for any replicate test aquaria was detected for (R-L) values. No DA or AS was detected from the skewness and kurtosis values (not shown). This was confirmed by the non significant side effect in the ANOVA (Table 3). No effect of size on asymmetry was detected (Spearman tests, all $p = 0.05$). Repeatability, expressed with ME5 descriptor [51], is greater than 96%. As a result, the asymmetry observed was thus considered genuine FA in all cases. Individual effect and the side6 individual interaction were significant for all three replicate test aquaria (F tests, all $p = 0.05$).

No statistical differences were detected between any of the concentrations tested, including the controls (F tests, all $p = 0.05$). For both 4-NP and lead bioassays, FA values fluctuated around a mean value of $4.2 \cdot 10^{-2}$ (Figure 5).

Fluctuating Asymmetry of Mentum Shape

Replicate test aquaria were pooled so that the number of individuals would be larger than the number of landmarks. Shape FA was higher than measurement error in all samples (Side 6 Individual effect were highly significant). Shape DA was detected in some samples for 4-NP bioassay, side effect was significant only

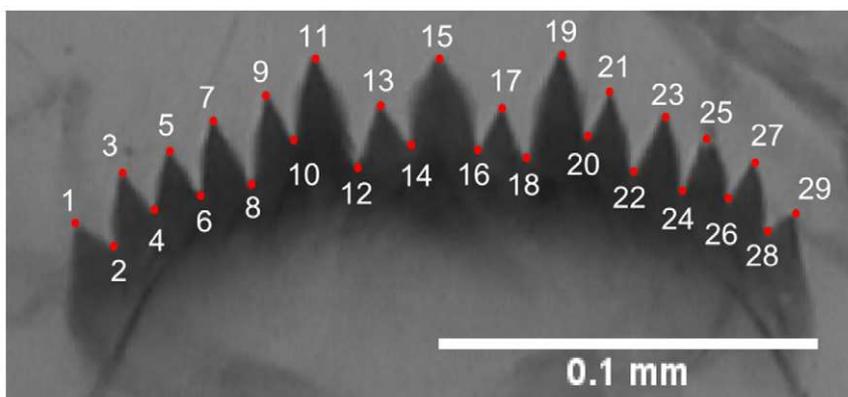


Figure 4. The 29 landmarks digitized on each mentum to measure shape FA.
doi:10.1371/journal.pone.0048844.g004

Table 1. Mean concentration in sediment (mg/kg dw.), water column (mg/l) and chironomid bodies (mg/kg dw.) and standard deviation from the three replicate test aquaria.

	C_{sediment}		C_{water}		$C_{\text{chironomid-bodies}}$
	Start	End	Start	End	End
Control 1 - Pb	3.36 0.1	3.36 0.2	# 1.0	# 1.0	2.66 0.9
Control 2 - Pb	3.06 0.2	4.76 0.5	# 1.0	# 1.0	2.46 0.2
C1 - Pb	18.16 1.8	21.26 0.4	10.26 1.6	13.76 4.4	14.46 2.8
C2 - Pb	46.46 2.4	51.16 7.3	11.06 5.6	19.06 3.9	40.86 10.4
C3 - Pb	112.86 7.9	145.66 12.0	71.36 32.6	83.56 13.5	115.96 24.7
C4 - Pb	220.56 28.2	266.76 40.01	21.86 5.1	24.06 7.6	169.76 44.2
C5 - Pb	456.96 65.1	432.06 64.5	93.56 64.8	40.06 4.9	274.06 99.3
Control 1 - 4NP	0.56 0.5	0.26 0.0	nd	1.46 0.5	2.56 4.2
Control 2 - 4NP	0.16 0.1	0.76 0.3	1.16 0.8	1.66 0.6	4.36 1.9
C1 - 4NP	67.16 8.3	81.26 11.5	nd	19.26 0.7	nd
C2 - 4NP	115.46 6.7	103.26 15.7	74.36 8.0	22.16 5.6	2.96 1.1
C3 - 4NP	184.66 19.2	169.56 13.7	nd	66.86 4.1	16.06 3.1
C4 - 4NP	198.86 25.3	176.86 8.6	123.46 56.2	50.56 8.1	12.66 2.4

nd: not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0048844.t001

for C3 group (Pillai Tr. = 0.49, p , 0.05). Moreover, for lead bioassay, side effect was significant for Control-1 (Pillai Tr. = 0.43, p , 0.05), C4 (Pillai Tr. = 0.66, p , 0.05) and C5 (Pillai Tr. = 0.48, p , 0.05) groups. Those results indicated the occurrence of DA (Table 4), which is commonly observed in insects [56]. Scatter plots of vectors of shape asymmetry did not reveal AS for any group. Permutation test performed on the regression between mean centroid size and vectors of shape asymmetry did not indicate any allometric effect on FA (Permutation tests, all p , 0.05). No statistical differences were detected for the centroid size (not presented) between any of the concentration tested (Wilcoxon test with Holm adjustment, all p , 0.05).

Two statistically significant differences in shape FA were observed (Table 4): an increase of FA with lead C5 concentration

($F_{2097, 1742} = 1.09$, p , 0.05) and a decrease of FA with 4-NP C3 concentration ($F_{2148, 2350} = 1.07$, p , 0.05).

Mentum Shape Comparison Among and within Assay

Results of the canonical analyses are shown on Figures 6 and 7. Unexpectedly, for both lead and 4-NP experiments, the first canonical axis clearly contrasted the two experimental sessions – including the respective controls – rather than the chemical treatments. The treatment effect was detected on the second axis and its amplitude varied depending both on the bioassay session and the concentration of the pollutant.

For lead bioassay, the first canonical axis accounted for 78% of the variation observed (Figure 6). Menta of the first session were more curved than menta of the second session. Within the first

Table 2. Mean percentage of mentum deformities and proportion of each type of deformities.

	n	Deformities (%)	Extra teeth (%)	Missing teeth (%)	Fusing teeth (%)
Control 1 - Pb	165	4.2	0.6	3.6	0.0
Control 2 - Pb	123	7.3	2.4	4.9	0.0
C1 - Pb	209	5.7	0.5	3.8	1.4
C2 - Pb	162	4.9	0.6	3.7	0.6
C3 - Pb	195	4.1	0.5	3.1	0.5
C4 - Pb	119	5.0	1.7	3.4	0.0
C5 - Pb	127	6.3	0.8	3.9	1.6
Control 1 - 4NP	144	2.1	0.7	1.4	0.0
Control 2 - 4NP	147	5.4	1.4	4.1	0.0
C1 - 4NP	147	4.8	4.1	0.7	0.0
C2 - 4NP	141	5.7	1.4	2.8	1.4
C3 - 4NP	147	5.4	1.4	2.7	1.4
C4 - 4NP	119	8.4	0.8	6.7	0.8

n indicates sample size.

doi:10.1371/journal.pone.0048844.t002

Table 3. Results of the two ways ANOVA (side 6 individual) for mentum length, measurement error descriptor (ME5) and FA level. Mean square average and standard deviation (10^{2-3}) between replicate.

Mean Square	Side	Individual	Side 6 Individual	Measurement error	ME5 (%)	FA10b (10^{2-2})
Control 1 - Pb	5.76 4.8	11.36 3.6 *	2.96 0.4 *	0.036 0.00	986 0	4.36 0.3
Control 2 - Pb	3.66 5.6	24.46 2.8 *	2.76 0.3 *	0.046 0.01	976 1	4.16 2.4
C1 - Pb	0.66 0.4	16.66 1.7 *	2.56 0.5 *	0.036 0.00	976 1	3.96 0.4
C2 - Pb	3.46 1.9	14.36 7.1 *	3.16 0.7 *	0.056 0.01	976 0	4.46 0.5
C3 - Pb	2.06 1.0	15.86 4.1 *	2.96 0.2 *	0.046 0.01	976 1	4.36 0.2
C4 - Pb	2.16 2.4	20.06 4.2 *	2.86 0.9 *	0.046 0.01	976 1	4.26 0.7
C5 - Pb	7.66 7.5	19.36 5.0 *	3.36 1.1 *	0.046 0.00	986 1	4.56 0.8
Control 1 - 4NP	3.26 0.6	21.96 0.9 *	3.06 0.6 *	0.036 0.01	986 1	4.36 0.4
Control 2 - 4NP	4.46 3.5	17.66 1.5 *	3.06 0.9 *	0.056 0.01	966 2	4.36 0.7
C1 - 4NP	4.46 4.9	18.76 4.7 *	2.76 0.3 *	0.046 0.01	976 1	4.16 0.2
C2 - 4NP	3.46 5.5	17.46 0.6 *	2.86 0.4 *	0.046 0.01	976 1	4.26 0.3
C4 - 4NP	1.56 1.9	22.36 5.0 *	2.56 0.6 *	0.036 0.00	986 0	3.96 0.5
C3 - 4NP	7.16 2.2	17.56 6.5 *	2.66 0.2 *	0.046 0.00	976 1	4.16 0.2

*Effect was significant for the three replicate test aquaria (F test, p, 0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0048844.t003

session, differences were detected between C1, C3 and Control groups, but were not perceptible on the projection on the second axis (Figure 6). Within the second session, the second axis (accounting for 8% of the variation) allowed to separate C5 group from Control group.

For 4-NP experiments, the first canonical axis (67% of variation), contrasted both sessions (Figure 6). The effect of the chemical treatment was again detected on the second axis (17% of variation), but only for the second session, separating C2 and C4

groups from Control group. Shape changes associated with the second axis suggest a change in lateral and external area with an increase in tooth size with 4-NP exposure. Moreover, we observed that the angle between the third and the second teeth of the external area decreased.

These results are confirmed by the canonical analysis focusing on the second session of 4-NP bioassay (Figure 7). The first axis (67% of variation) indeed mostly contrasted Control from stressed groups.

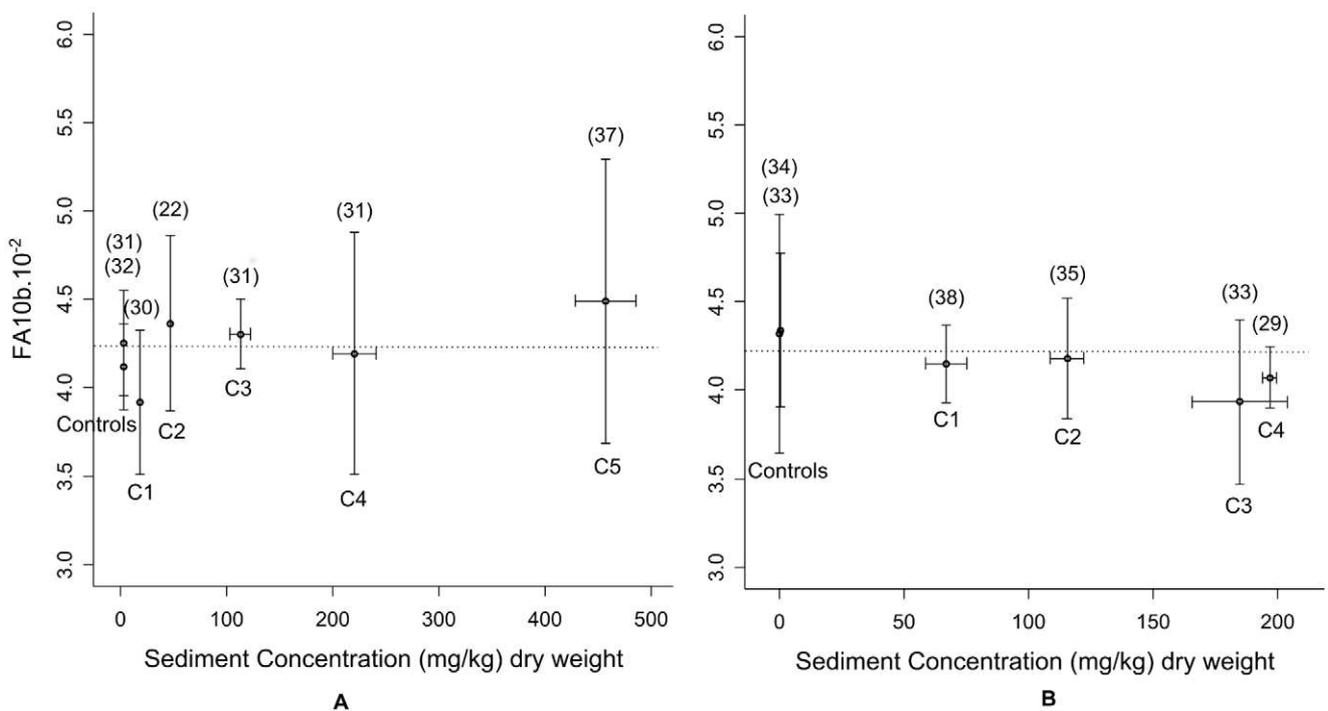


Figure 5. FA10b variations for lead and 4-NP bioassays. Lead bioassays (A) and 4-NP bioassays (B). Error bars indicate standard deviations between replicate test aquaria, Mean replicate sample size is indicated in brackets, Dotted lines indicate FA mean value.
doi:10.1371/journal.pone.0048844.g005

Table 4. Mean square values ($10^2 \cdot 5$) of the two ways ANOVA (side x individual) for mentum shape, measurement error descriptor (ME5) and FA level.

Mean Square	n	Side	Individual	Side 6 Individual	Measurement error	ME5 (%)	FA10a ($10^2 \cdot 3$)
Control 1 - Pb	93	3.1*	6.4*	3.0*	0.09	94	4.3
Control 2 - Pb	73	4.3	6.3*	2.8*	0.15	90	4.1
C1 - Pb	87	2.7	7.7*	2.7*	0.09	94	4.1
C2 - Pb	65	10.5	6.4*	3.1*	0.09	94	4.4
C3 - Pb	92	4.8	6.7*	2.7*	0.09	93	4.1
C4 - Pb	61	3.4*	5.1*	2.9*	0.12	92	4.2
C5 - Pb	85	7.0*	6.6*	3.2*	0.12	93	4.4*
Control 1 - 4NP	95	3.0	6.3*	2.8*	0.11	93	4.2
Control 2 - 4NP	91	2.8	6.4*	3.1*	0.14	91	4.3
C1 - 4NP	95	6.9	6.0*	2.9*	0.10	94	4.2
C2 - 4NP	102	6.9	7.0*	3.0*	0.13	92	4.3
C3 - 4NP	87	3.5*	5.7*	2.5*	0.10	93	3.9*
C4 - 4NP	85	13.4	8.0*	3.1*	0.14	91	4.3

*Effect was significant (p, 0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0048844.t004

Discussion

Surprisingly, despite toxic accumulation in chironomid bodies, no significant increase in the frequency of mouthpart deformities was observed for lead concentrations ranging from 3.3 to 456.9 mg/kg dw and for 4-NP concentrations ranging from 0.5 to 198.8 mg/kg dw.

A large number of deformities observed in this work, consisting of missing or extra teeth, were confined to the external teeth. This type of deformity being observed both in control and stressed groups cannot be attributed to the chemical treatment. It might rather be an effect of inbreeding in the stock culture as proposed by Bird et al. [16] who observed a high frequency of phenodeviants in control groups. In contrast, the deformity involving fusing teeth was never reported in untreated groups, suggesting an effect of the toxic exposure. This result points out the importance of separating background deformity level from typical toxic stress deformity [57]. The decrease of fusing teeth rate observed for C4-NP group could be the result of a selection acting during early developmental stages [58]. Indeed, emergence decreased for this concentration, probably due to larval mortality.

As observed for deformities, mentum length FA did not differ significantly between control and treated groups, in contrast with various studies in *Chironomus* reporting FA increase in contaminated sediment rivers [6], [9], [12], [25]. This was confirmed by shape FA analysis where no effect was detected in most cases.

Several hypotheses can be proposed to explain this weak phenotypic response.

First, it is conceivable that the species used is quite insensitive to the applied chemical stress. In other words, the choice of the model organism would be in cause.

Chironomus are indeed well-known to be adapted to highly polluted areas. Several mechanisms allow them to survive in polluted rivers. For example, larvae can regulate Cu, Ni, Zn and Mn [59]. Homeostatic control is provided by sequestering toxic and essential metals in metallothionein, a metal-binding protein [60]. These mechanisms allow larvae to survive in lead contaminated environment [16], [61] by accumulating this non essential metal [59]. Our results confirm this pattern of variation with a linear increase of lead chironomid body concentrations with

increasing sediment concentrations. Moreover, as observed in fish [62] and in some invertebrates [63], chironomids might be able to regulate 4-NP by biotransformation process. For instance, in our study accumulation of 4-NP only appeared at high concentrations (higher than 184.6 mg/kg). 4-NP concentrations detected in chironomid bodies were lower than concentrations measured in both water and sediment phase. These results indicate that part of the 4-NP was probably metabolized. A similar result was reported in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) by Mäenpää and Kukkoken [37] using similar concentrations. However, the resistance does not guarantee from detrimental effects of pollutants, as shown by the large number of studies documenting phenotypic variation in chironomid (and particularly *Chironomus riparius*) larvae in contaminated sediment rivers [9], [21] or exposed in the laboratory to metal [57] or organic substances [11], [38]. The mechanisms ensuring a resistance to toxic exposure are indeed energetically costly, and could lead to a reduction in the amount of energy allocated to development [2]. Phenotypic defects could thus appear as a trade-off between physiological resistance and developmental processes. Phenotypic sensitivity could thus be viewed as a cost of resistance to pollution. Our results nevertheless suggest that the stressors themselves or the cost of resistance might not always impact the development of *Chironomus riparius*. This species might thus not be the sensitive bio indicator of chemical stress it is usually considered to be.

Alternatively, the specific stock used might have somehow gained a particularly strong resistance against the tested pollutants. This nevertheless seems unlikely as the tested animals were never exposed to lead and nonylphenol since the strain was first established several years ago. It seems improbable that a strong resistance – necessarily ancestrally gained – would have been maintained through generations in the absence of a specific selective pressure. Inbreeding and genetic drift might even have the opposite effect, as Nowak et al. [64] showed that the loss of genetic variation in a population maintained in the laboratory had resulted in an increased sensitivity to environmental stress [65].

Second, the mentum might not be sensitive to the chemical treatment. The choice of the trait might thus be in cause. Response to stress is trait specific [66]. For example, in river

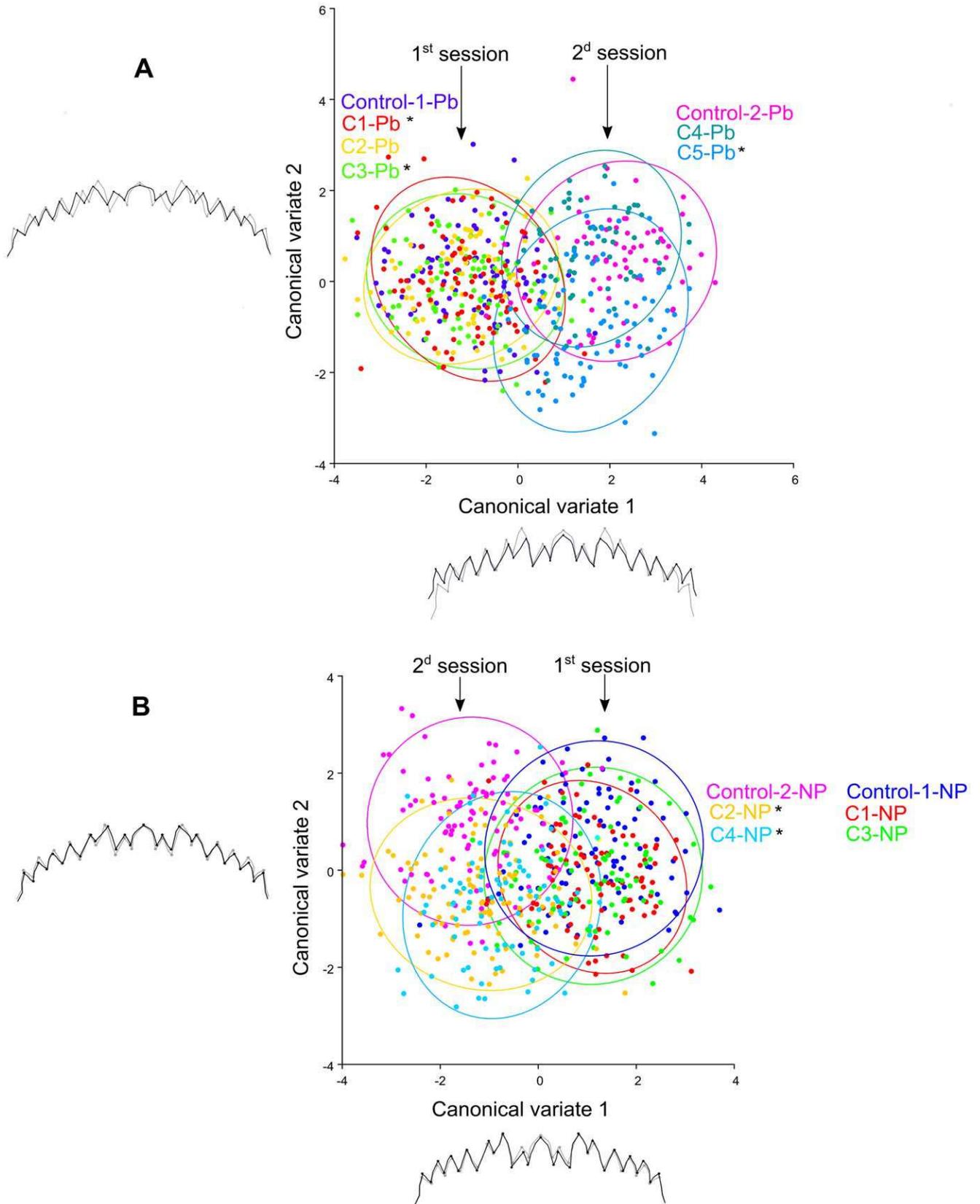


Figure 6. CVA showing the two discrimination vectors for lead and 4-NP bioassays and the associated patterns of mentum variation. Lead bioassays (A) and 4-NP bioassays (B). In grey extreme individuals in negative side, in black extreme individuals in positive side. *: Procrustes distance significantly different from the control group (Permutation test, $p < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0048844.g006

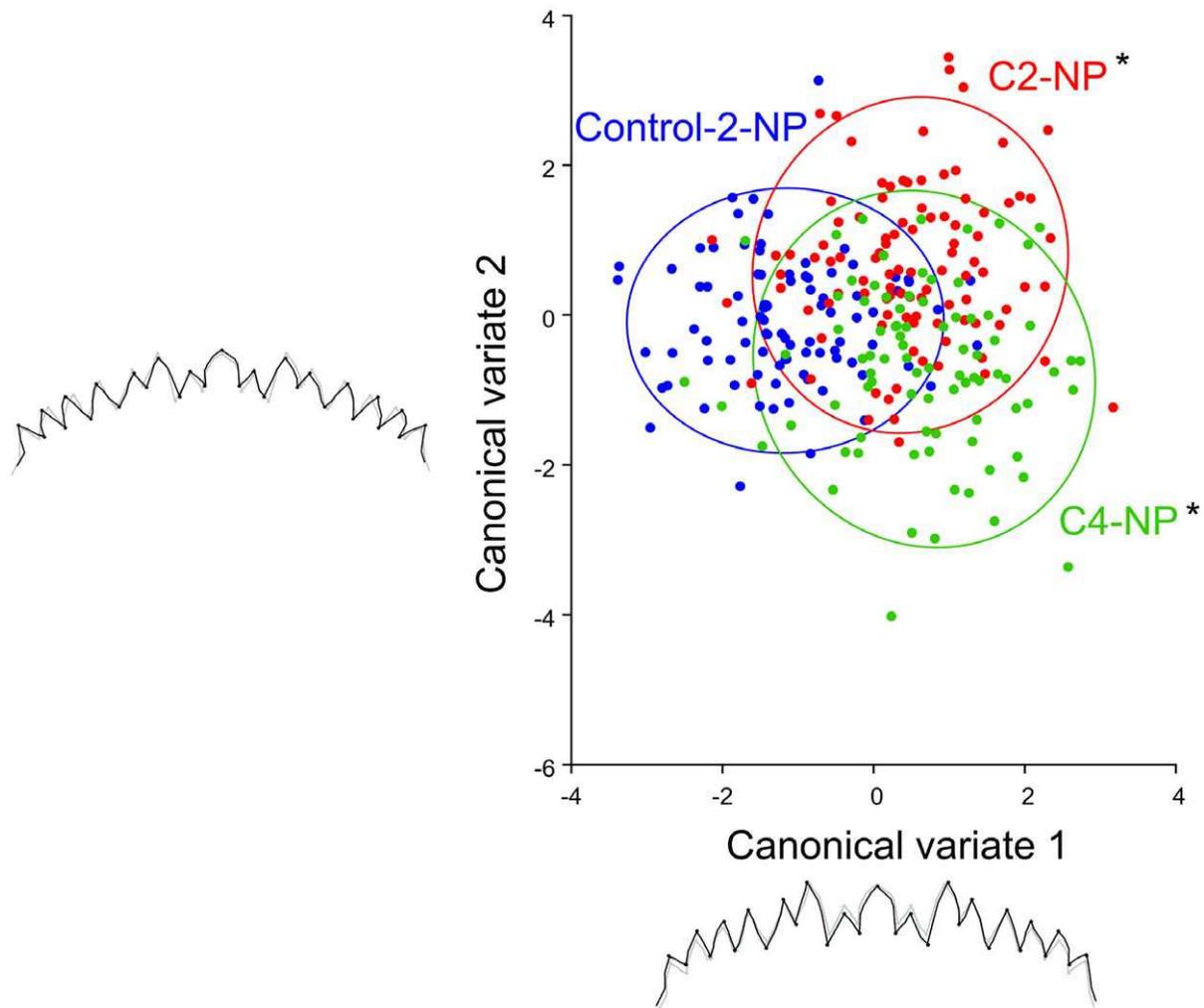


Figure 7. CVA showing the two discrimination vectors for the 2nd session of the 4-NP bioassay and the associated patterns of mentum variation. In grey extreme individuals in negative side, in black extreme individuals in positive side. *: Procuste distance significantly different from the control group (Permutation test, p , 0.05). doi:10.1371/journal.pone.0048844.g007

contaminated by urban and industrial discharges, Servia et al. [12] observed an increase of FA in chironomid antenna but none in chironomid mentum. Different developmental stability might be observed for different traits in Chironomids, and it is possible that the mentum might be under such a strong selection that its stability might prevent any phenodeviance even under strongly toxic and thus stressful environmental conditions. This nevertheless contrasts with the often reported sensitivity of this trait in *Chironomus riparius* [9], [21], [38].

Third, larvae might be less sensitive, i.e. developmentally more stable, than the adult insects. In other words, the observation of an inadequate developmental stage might explain our results. FA could appear after metamorphosis, which is an energetically costly phenomenon, possibly more prone to developmental errors than earlier stages [67]. Against this hypothesis, Campero et al. [68] observed that FA difference between control and stressed groups disappeared in damselfly after metamorphosis. Moreover, Piscart et al. [69] observed in a Trichoptera that the level of FA remains constant between the last larval instar and the adult.

Finally, an alternative explanation is that FA and shape variation might not be the sensitive and generic indicators of environmental stress in *Chironomus riparius* that they are often

claimed [70]. This idea is not new, and has been proposed to explain the well-known discrepancy among studies, traits and stressors in terms of FA patterns [71].

None of the above hypotheses nevertheless satisfactorily accounts for the discrepancy between our laboratory tests and what usually happens in wild conditions (i.e. weak vs. strong phenotypic effects). It is thus conceivable that the experimental treatment fundamentally differs from the natural situation. We do not know how many factors are involved in the developmental alterations found in the wild. The type of the substrate used seems to play a minor role in chironomid mentum deformities [72]. However, the type of stress applied might explain the difference between field and lab studies. Particularly, a single pollutant could be inefficient in inducing phenotypic effect and only a combination of stressful environmental conditions would be needed to generate a stronger reaction. This has indeed been documented on chironomid deformities with pesticide exposure [73] or on damselfly FA with both starvation and pesticide exposure [74]. To test this hypothesis, bioassays on natural sediment containing pollutant mixture will be performed.

Slight mentum shape changes were nevertheless detected. This is in accordance with Hoffmann et al. [26] who proposed that

shape might be more readily altered by environmental stress than trait symmetry. However, the shape response was not dose dependent but instead varied among bioassay sessions, that is likely among genotypes. Nowak et al. [64] suggested that bioassays performed on the same lab culture in constant laboratory conditions with different levels of inbreeding could result in different test outcomes because of the stochasticity of random genetic drift. This sets limits to the interpretation of shape changes recorded not only in natural populations but also between bioassays performed in the laboratory. In other words, genetic differences might affect bioassay reproducibility. This might explain the difference observed with nonylphenol exposure between our results and Meregalli et al.'s [38]. Indeed, the frequency of phenodeviant in their control group is very high (reaching 20%). This therefore suggests that the stock used in their

study was somehow prone to phenotypic effects and particularly sensitive to pollutants.

Further investigations are necessary to determine if the limited effects detected in this study are due to the biological model, the type of stress (single substance vs. mixtures), the studied trait or the morphometric data used (mentum FA and shape variation), or a combination of these. They nevertheless suggest that one should be very cautious in using *Chironomus riparius* FA and shape variation as a general bio indicator of toxic stress.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HA JNB PB. Performed the experiments: HA. Analyzed the data: HA VD JNB PB. Contributed reagents/ materials/ analysis tools: HA PB. Wrote the paper: HA VD.

References

- Moore MN, Livingston DR, Widdows J, Lowe DM, Pipe RK (1987) Molecular, cellular, and physiological effects of oil derived hydrocarbons on molluscs and their use in impact assessment. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B* 316: 209–214.
- Koehn RK, Bayne BL (1989) Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 157–171.
- Admiraal W, Barranguet C, van Beusekom SAM, Bleeker EAJ, van den Ende FP, et al. (2000) Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere* 41: 289–295.
- Carignan V, Villard MA (2002) Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 78: 45–61.
- Wene G (1940) The soil as an ecological factor in the abundance of aquatic Chironomid larvae. *The Ohio Journal of Science* 110: 193–199.
- Clarke GM (1993) Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environmental Pollution* 82: 207–211.
- Hare L, Carter JCH (1976) The distribution of *Chironomus* (s.s)? *quin* (*salinaris* group) larvae (Diptera: Chironomidae) in Parry Sound, Georgian Bay, with particular reference to structural deformities. *Canadian Journal of Zoology* 54: 2129–2134.
- Wiederholm T (1984) Incidence of deformed larvae (Diptera: Chironomidae) in Swedish lakes. *Hydrobiologia* 109: 243–249.
- Groenendijk D, Zeinstra LWM, Postma JF (1998) Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) from a metal contaminated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 1999–2005.
- Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2003) Exposure to 17 α -ethynylestradiol and bisphenol-A - effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 207–215.
- Park K, Bang HW, Park J, Kwak IS (2009) Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* 77: 359–367.
- Servia MJ, Cobo F, Gonzalez MA (2004) Multiple trait Analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: a case study using *Chironomus riparius* Meigen, 1804 larvae. *Environmental Monitoring and Assessment* 90: 101–112.
- Lenat DR (1993) Using mentum deformities of *Chironomus* larvae to evaluate the effects of toxicity and organic loading in streams. *Journal of the North American Benthological Society* 12: 265–269.
- Hudson LA, Ciborowski JH (1996) Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 297–304.
- Meregalli G, Ollevier F (2001) Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *The Science of the Total Environment* 269: 157–161.
- Bird GA, Schwartz WJ, Joseph DL (1995) The effect of ²¹⁰Pb and stable lead on the induction of menta deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 2125–2130.
- Bleeker EAJ, Leslie HA, Groenendijk D, Plans M, Admiraal W (1999) Effect of exposure to azaarenes on emergence and mouthpart development in the midge *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1829–1834.
- Zakharov VM (1992) Population phenogenetics analysis of developmental stability in natural populations. *Acta Zoologica Fennica* 191: 7–30.
- Debat V, David P (2001) Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 555–561.
- Hoffmann AA, Woods R (2001) Trait variability and stress canalization, developmental stability and the need for a broad approach. *Ecology Letters* 4: 97–101.
- Vermeulen A, Dall PC, Lindegaard C, Ollevier F, Goddeeris B (1998) Improving the methodology of Chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams. *Archiv für Hydrobiologie* 144: 103–135.
- Janssens de Bisthoven L, Postma JF, Parren P, Timmermans KR, Ollevier F (1998) Relation between heavy metals in aquatic sediments in *Chironomus* larvae of Belgian lowland rivers and their morphological deformities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 688–703.
- Martinez EA, Moore BC, Schaumlöffel J, Dasgupta N (2002) The potential association between menta deformities and trace elements in Chironomidae (diptera) taken from a heavy metal contaminated river. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 286–291.
- Palmer AR, Strobeck C (1986) Fluctuating asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 191–421.
- Al-Shami SA, Che Salmah MR, Abu Assan A, Siti Azizah MN (2011) Fluctuating Asymmetry of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae) Larvae in Association with Water Quality and Metal Pollution in Permatang Rawa River in the Juru River Basin, Penang, Malaysia. *Water Air and Soil Pollution* 216: 203–216.
- Hoffmann AA, Woods RE, Collins E (2005) Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insect. *Australian Journal of Entomology* 44: 233–243.
- Emlen DJ, Nijhout HF (2000) The development and evolution of exaggerated morphologies in insects. *Annual Review of Entomology* 45: 661–708.
- Renner R (1997) European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* 31: 316–320.
- Warren LJ (1981) Contamination of sediments by lead, zinc and cadmium: A review. *Environmental Pollution Series B, Chemical and physical* 2: 401–436.
- Bat L, Akbulut M (2001) Studies on Sediment Toxicity Bioassays using *Chironomus thummi* K., 1911 Larvae. *Turkish Journal of Zoology* 25: 87–93.
- Borgmann U, Norwood WP (1999) Assessing the toxicity of lead in sediments to *Hyalella azteca*: the significance of bioaccumulation and dissolved metal. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 1494–1503.
- Roulier JL, Tusseau-Vuillemin MH, Coquery M, Geffard O, Garric J (2008) Measurement of dynamic mobilization of trace metals in sediments using DGT and comparison with bioaccumulation in *Chironomus riparius*: First results of an experimental study. *Chemosphere* 70: 925–932.
- Grossell M, Gerdes RM, Brix KV (2006) Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates - *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 97–104.
- Ying GG, Williams B, Kookana R (2002) Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environmental International* 28: 215–226.
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT (2005) Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific Review. Applied Ecology and Environmental Research* 4: 1–25.
- Bettinetti R, Cuccato D, Galassi S, Provini A (2002) Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 46: 201–207.
- Mäenpää K, Kukkonen JVK (2006) Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4–52-dodecyl-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Aquatic toxicology* 77: 329–338.
- Meregalli G, Pluyms L, Ollevier F (2001) Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environmental Pollution* 111: 241–246.
- LeBlanc G, Mu X, Rider CV (2000) Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-Nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives* 108: 1133–1137.

40. Höss S, Jüttner I, Traunspurger W, Pfister G, Schramm KW, et al. (2002) Enhanced growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in the presence of 4-Nonylphenol. *Environmental Pollution* 120 : 169–172.
41. Pinder LCV (1986) Biology of freshwater Chironomidae. *Annual Review of Entomology* 31: 1–13.
42. OECD (2001) Guideline 218: Sediment-Water Chironomid toxicity test using spiked sediment. OECD Guidelines for testing of chemicals 21 p.
43. Vermeulen AC, Liberloo G, Dumont P, Ollevier F, Goddeeris B (2000) Exposure of *Chironomus riparius* larvae (diptera) to lead, mercury and b-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere* 41: 1581–1591.
44. Strenke K (1959) Revisin der gattung *Chironomus* Meig. 1. Die Images von 15 norddeutschen arten und unterarten. *Archiv für hydrobiologie* 56: 1–42.
45. Bervoets L, Blust R, Verheyen R (1996) Effect of temperature on Cadmium and Zinc Uptake by the Midge Larvae *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31: 502–511.
46. Epler JH (2001) Identification Manual for the Larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. Palatka: St. Johns River Water Management District. 53 p.
47. Rasband W (2012) Image J. Image processing and analysis in Java. Available: <http://rsbweb.nih.gov>. Accessed 13 January 2010.
48. Bookstein FL (1991) Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology. Cambridge: Cambridge University Press. 435 p.
49. Rohlf FJ (2010) TPS DIG, SUNY Stony Brook. Available: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. Accessed 9 September 2010.
50. Rohlf FJ, Slice D (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40–59.
51. Palmer AR, Strobeck C (2003) Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. In: Polak M, editor. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford: Oxford University Press. 279–319.
52. Klingenberg CP, McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 54: 678–688.
53. Klingenberg CP, Barluenga M, Mayer A (2002) Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56: 1909–1920.
54. R Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R foundation for statistical computing. Available: <http://www.R-project.org>. Accessed 15 September 2010.
55. Klingenberg CP (2011) MORPHOJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology* 11: 353–357.
56. Pelabon C, Hansen TF (2008) On the adaptative accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution* 62: 2855–2867.
57. Janssens de Bishoven L, Vermeulen A, Ollevier F (1998) Experimental Induction of morphological Deformities in *Chironomus riparius* Larvae by Chronic Exposure to Copper and Lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 249–256.
58. Dias V, Vasseur C, Bonzom JM (2008) Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: Effects on survival, development time, growth and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71: 574–581.
59. Krantzberg G, Stokes PM (1989) Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the genus *Chironomus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 389–398.
60. Fowler BA (1987) Intracellular Compartmentation of Metals in Aquatic Organisms: Roles in Mechanisms of Cell Injury. *Environmental Health Perspectives* 71: 121–128.
61. Lagrana C, Apodaca D, David CP (2010) Response of Chironomids to CU2+, Cd2+ and Pb2+ Metal ions Using 96-hour Toxicity Test and Evaluating Different Factors that Affect Metal Accumulation. *Journal of Trends in Chemistry* 1: 8–13.
62. Hugues EM, Gallagher EP (2004) Effects of 17- β estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137: 237–247.
63. Thibault R, Jumel A, Debrauer L, Rathahao E, Lagadic L, et al. (2000) Identification of 4-n-nonylphenol metabolic pathways and residues in aquatic organisms by HPLC and LC-MS analyses. *Analisis* 28: 793–801.
64. Nowak C, Vogt C, Diogo B, Schwenk K (2007) Genetic impoverishment in laboratory cultures of the test organism *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1018–1022.
65. Dahlgard J, Hoffmann AA (2000) Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conservation Biology* 14: 1187–1192.
66. Clarke GM (1998) The genetic basis of developmental stability. Individual and population asymmetry parameters. *Heredity* 80: 553–561.
67. Heyland A, Moroz LL (2006) Signaling mechanisms underlying metamorphic transitions in animals. *Integrative and Comparative Biology* 46: 743–759.
68. Campero M, De Block M, Stocks R (2008) Metamorphosis offsets the link between larval stress, adult asymmetry and individual quality. *Functional Ecology* 22: 271–277.
69. Piscart C, Moreteau JC, Beisel JN (2005) Decrease of fluctuating asymmetry among larval instars in an aquatic, holometabolous insect. *Comptes Rendus de Biologies* 328: 912–917.
70. Leary RF, Allendorf FW (1989) Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 214–217.
71. Leung B, Mineau P, Knopper L (2003) Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. In: Polak M, editor. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford: Oxford University Press. 415–426.
72. Bird GA (1997) Deformities in cultured *Chironomus tentans* larvae and the influence of substrate on growth, survival and mentum wear. *Environmental Monitoring and Assessment* 45: 273–283.
73. Langer-Jaesrich M, Köler HR, Gerhardt A (2010) Can mouth part deformities of *Chironomus riparius* serve as indicators for water and sediment pollution? A laboratory approach. *Journal of Soils and Sediments* 10: 414–422.
74. Bonada N, Vives S, Rieradevall M, Prat N (2005) Relationship between pollution and fluctuating asymmetry in a pollution-tolerant caddisfly *Hydropsyche øxallata* (Trichoptera, Insecta). *Archiv für Hydrobiologie* 162: 167–185.

Toxic stress and shape changes in *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera)

Abstract

Using traditional and geometric morphometrics, we analysed morphological variations of the mentum and the wings in *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) exposed to toxic stress. To understand both the causes and mechanisms involved in phenotypic changes, we studied: (1) the relationship between toxic stress, cellular response and shape variations, (2) the pattern of shape variations according to the type of stress: single vs toxic mixture, (3) the evolution of shape variations after metamorphosis and the transmission of the morphological defects to the next generation.

To achieve this, *Chironomus riparius* larvae were exposed during their entire larval life cycle, first to sediment spiked with lead (from 3 to 500 mg/kg dry weight) or 4-NP (from 0 to 200 mg/kg dry weight), second to two sediments sampled in the wild. The first of the latter was characterized by light urban pollution and the other by heavy urban and industrial pollution. We measured the effects of lead on three biochemical markers (energy reserve content, concentrations of metallothionein and cellular damages). Furthermore, for all the bioassays, we assessed shape variations (phenodeviations, fluctuating asymmetry and mean shape changes) of the mentum, a mouthpart structure of the chironomid larvae. For both the sediments sampled in the wild, we also assessed the shape changes of imago wings and the shape changes of the mentum affecting the next generation. At the station where the sediment was characterized by light urban pollution, we also measured morphological variations of the mentum in the Chironomid population belonging to the genus *Chironomus*.

Despite the adverse effects of lead observed at the biochemical level, only slight effects were observed in the mentum shape. Similarly, 4-NP exposure did not induce strong phenotypic defects. On the contrary, mentum deformities increased in Chironomid larvae exposed to slightly contaminated sediment sampled in the wild. This might have been due to the exposure to the toxic mixture. In the heavily contaminated sediment, the low levels of both deformities and fluctuating asymmetry observed might have been the result of selection acting during early developmental stages. This hypothesis could thus explain the increase of developmental instability observed in the next generation placed in a control sediment. In the imago from exposed larvae, no increases in fluctuating wing asymmetry were detected. We observed that the level of morphological variations observed in natural population was similar to that detected in the laboratory in our stock culture reared in the sediment from this station.

These results underlined the weak response of the shape biomarkers studied to toxic stress, whether related to multiple toxic exposure or not. Moreover, they highlighted the importance of genetics in shape changes. Consequently, the use of these ontogenic biomarkers as indicators of toxic stress in *Chironomus riparius* seems to be of limited interest.

Mots clés

Chironomus riparius, phenodeviation, shape, fluctuating asymmetry, toxic stress, geometric morphometrics.

Stress toxique et variations de forme chez *Chironomus riparius* (Insecte, Diptère)

Résumé

Les variations de forme affectant le mentum et les ailes de *Chironomus riparius* (Insecte, Diptère), en réponse à un stress toxique, ont été analysées par morphométrie traditionnelle et par morphométrie géométrique. Afin de comprendre les causes et les mécanismes impliqués dans la genèse de ces variations phénotypiques, nous avons étudié : (1) la relation entre stress chimique, réponse cellulaire et variations de forme, (2) l'importance des variations de forme selon que le stress soit simple ou multiple, (3) l'évolution des variations de forme après la métamorphose des organismes ainsi que leur transmission à la génération suivante.

Pour ce faire, nous avons exposé des larves de *Chironomus riparius* pendant l'intégralité de leur cycle larvaire, à du plomb (entre 3 et 500 mg/kg de MS), à du 4-nonylphénol (entre 0 et 200 mg/kg de MS), ainsi qu'à deux sédiments multi-contaminés provenant du milieu naturel : l'un caractérisé par une faible pollution d'origine urbaine, l'autre par une forte pollution d'origine urbaine et industrielle. Nous avons mesuré les effets du plomb sur la biochimie des organismes (réserves énergétiques, concentration en métallothionéines et dommages cellulaires). En outre, pour tous les essais, nous avons évalué les variations morphologiques (phénodéviation, asymétrie fluctuante et changement de la forme moyenne) affectant une pièce buccale du chironome : le mentum. Nous les avons également quantifiées, pour les essais portant sur les matrices provenant du milieu naturel, sur les ailes des adultes ainsi que sur le mentum des larves appartenant à la génération suivante. Enfin, dans la station dans laquelle le sédiment faiblement contaminé a été échantillonné, les variations phénotypiques affectant le mentum de la population en place, appartenant au genre *Chironomus*, ont été mesurées.

Si le plomb affecte la biochimie de la larve de chironome, son action est, en revanche, peu visible au niveau de la forme du mentum. De même, nous n'observons que peu de variations morphologiques de cette pièce buccale après une exposition au 4-nonylphénol. Au contraire, nous notons une augmentation des phénodéviation du mentum chez les larves ayant crû dans le sédiment faiblement contaminé provenant du milieu naturel, ce qui suggère un effet toxique de cette matrice. Dans le sédiment fortement pollué, les faibles niveaux de phénodéviation et d'asymétrie fluctuante observés pourraient être expliqués par la sélection au cours du développement larvaire des individus présentant les phénotypes les plus stables. Cette hypothèse expliquerait, en outre, la ré-augmentation des instabilités de développement que nous observons chez la génération suivante placée dans un sédiment témoin. Aucune augmentation du niveau d'asymétrie fluctuante n'est détectée sur les ailes des adultes provenant de larves exposées. Enfin, nous remarquons que le niveau d'anomalies du mentum relevé dans le milieu naturel est similaire à celui observé sur la souche de laboratoire exposée au sédiment provenant de cette station.

Les résultats obtenus mettent en évidence la faible réponse des biomarqueurs de forme étudiés en présence d'une pression toxique, qu'elle soit unique ou multiple. Ils soulignent, en outre, l'importance de la génétique de la population dans la réponse morphologique observée. Ces résultats suggèrent un intérêt limité de ces marqueurs ontogéniques pour révéler un stress chimique chez *Chironomus riparius*.

Mots clés

Chironomus riparius, phénodéviation, forme, asymétrie fluctuante, stress toxique, morphométrie géométrique.