

Thèse
Présentée à
L'Université de Provence Aix-Marseille I
École doctorale
ED 251 Sciences de l'Environnement
Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Provence Mention Sciences de l'Environnement
Spécialité
Bioéco – Biologie des Populations, Écologie

Par **Victor DIAS**

**Étude des réponses adaptatives d'une population d'invertébré
benthique (*Chironomus riparius*) soumise à une exposition métallique
chronique : le cas de l'uranium**

Thèse dirigée par Jean-Marc BONZOM, Denis REALE, & Jacqueline GARNIER-LAPLACE

Soutenue le 14 décembre 2010

Devant le jury d'examen composé de:

Rapporteurs:

- Mme Jeanne Garric, CEMAGREF, Lyon
- M. Laury Gauthier, Université Paul Sabatier, Auzeville-Tolosane

Examineurs:

- Mme Marie-Agnès Coutellec, INRA, Rennes
- Mme Jacqueline Garnier- Laplace, IRSN, Saint Paul lez Durance
- Mme Laetitia De Jong, Université de Provence, Marseille
- M. Jean-Marc Bonzom, IRSN, Saint Paul lez Durance
- M. Alexandre Pery, INERIS, Verneuil-en-Halatte
- M. Denis Réale, Université du Québec à Montréal, Canada

"L'étudiant en lettre ou en sciences se caractérise par une sorte de refus qu'il oppose aux exigences du groupe. Une réaction presque conventionnelle l'incite à se replier temporairement ou de façon plus durable, dans l'étude, la préservation et la transmission d'un patrimoine indépendant de l'heure qui passe. Quant au futur savant, son objet est commensurable à la durée de l'univers seulement. Rien n'est donc plus faux que de les persuader qu'ils s'engagent; même quand il croit le faire, leur engagement ne consiste pas à accepter un donné, à s'identifier à une de ses fonctions, à en assumer les chances et les risques personnels ; mais à le juger du dehors et comme ils n'en faisaient pas eux mêmes partie; leur engagement est encore une manière particulière de rester dégagé. L'enseignement et la recherche ne se confondent pas, de ce point de vue, avec l'apprentissage d'un métier. C'est leur grandeur et leur misère que d'être soit un refuge, soit une mission".

(Claude Lévi-Strauss, Tristes Tropiques, chapitre 6)

A Roland et Marceau...
... sans qui beaucoup de choses ne me seraient pas arrivées...

Étude des réponses adaptatives d'une population d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) soumis à une exposition métallique chronique : le cas de l'uranium

Résumé

L'intensité de la pression de sélection engendrée par une pollution excède souvent celle à laquelle sont soumises des populations dans un environnement non pollué. Par conséquent, des changements micro-évolutifs peuvent survenir en réponse à cette force directionnelle anthropique, et ce sur une courte période. Dans ce contexte, cette thèse a porté sur l'étude des modifications phénotypiques de populations de *Chironomus riparius* exposées durant plusieurs générations consécutives à des sédiments contaminés à l'uranium. Des expériences en conditions contrôlées ont été menées sur des populations de même origine exposées à une gamme de concentration en uranium induisant des effets toxiques. Le suivi des traits d'histoire de vie au cours des huit générations d'exposition a révélé chez les populations exposées des micro-évolutions conduisant notamment à une amélioration du succès reproducteur des adultes. D'autres expériences (test de toxicité aiguë, expérience en jardin commun) réalisées en parallèle ont permis de relier ces micro-évolutions à l'acquisition d'une tolérance à l'uranium, conséquence d'une adaptation génétique. Cependant, cette adaptation a également été synonyme de coût en termes de *fitness* et de diversité génétique pour les populations pré-exposées. Ces résultats conduisent à l'hypothèse d'une sélection par l'uranium qui aurait agi de manière séquentielle sur les populations. Ils soulignent également la nécessité de comprendre les mécanismes adaptatifs afin d'appréhender au mieux les conséquences écologiques de l'exposition chronique d'une population à un polluant.

Mots clés: sélection, tolérance, adaptation génétique, métaux lourds, invertébré benthique, pollution, micro-évolution, écotoxicité, uranium.

Adaptive response of *Chironomus riparius* populations exposed to uranium-contaminated sediments during consecutive generations

Abstract:

The intensity of selection on populations caused by polluted environment often exceeds which is caused by an unpolluted environment. Therefore, micro evolution can occur in response to this anthropic-directional force over a short period. In this context, this thesis focused on studying phenotypic changes in *Chironomus riparius* populations exposed during several consecutive generations to uranium-contaminated sediments. In laboratory-controlled conditions experiments were conducted with same origin populations exposed to a range of uranium concentration inducing toxic effects. Over eighth-generations of exposure, life-history traits measures revealed micro evolution in exposed populations, including increase of adult reproductive success. Other experiments (acute toxicity test, common garden experiment) performed in parallel enabled to link these micro evolution with a tolerance induction, as a consequence of genetic adaptation. Nonetheless this adaptation also induced cost in terms of fitness and genetic diversity for pre-exposed populations. These results lead to the hypothesis of a selection by uranium that acted sequentially on populations. They also underline the need to better-understand the adaptive mechanisms to better assess the ecological consequences of chronic exposure of populations to a pollutant.

Keywords: sélection, tolerance, genetic adaptation, heavy metal, benthic invertebrate, pollution, microevolution, ecotoxicity, uranium.

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), IRSN-DEI-SECRE-LRE, Cadarache, bâtiment 186, 13115, Saint Paul lez Durance, France.

Remerciement

Au terme de ce travail effectué au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie de l'IRSN, je voudrais remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé, soutenu, et supporté au cours de ces longues années de thèse.

Je tiens à remercier tout d'abord mes co-encadrants Jean-Marc Bonzom, Denis Réale, et Jacqueline Garnier-Laplace, qui ont toujours été disponibles, très patients et encourageants avec moi. Merci pour votre soutien, votre confiance, et pour la grande liberté que vous m'avez laissé dans mon travail.

Toute ma reconnaissance va ensuite à Jeanne Garric et Laury Gauthier qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Marie-Agnès Coutellec, Laetitia De Jong, et Alexandre Pery d'avoir accepté de participer au jury de celle-ci.

Merci à Nelly Dal Pos et Philippe Signoret pour le travail énorme qu'ils ont effectué lors de leur stage de Master. Sans vous, j'avoue ne pas trop savoir comment j'aurais pu mener toutes les expériences et analyses de front.

Mes remerciements vont également à tout le LRE, chercheurs, ingénieurs, techniciens, thésards, post docs, stagiaires pour leur dynamisme et leur bonne humeur et qui ont participé de près ou de loin à mes travaux de thèse. Merci tout particulier à Virginie Camilleri pour les dosages à l'ICP-AES, Gaella Grasset pour la minéralisation du sédiment, Nadine Cauvin pour les coups de main dans l'entretien des élevages, Claudine Van Crasbeck pour sa disponibilité, son aide précieuse dans les démarches administratives, et sa bonne humeur.

Impossible pour moi de ne pas remercier Sandra Lagauzère, Christophe Vasseur pour l'aventure à leur côté, et pour bien plus encore...

Merci enfin à mes proches, ma famille pour leur soutien sans faille. Merci à toi Valérie d'avoir été à mes cotés au cours de cette thèse, et d'être toujours là, car il est reste encore pleins de choses à faire !...

Merci enfin à tous ceux que j'ai oublié de mentionner...

Sommaire

Remerciement.....	6
Sommaire.....	8
Introduction Générale.....	12
1.Contexte général.....	12
2.Contamination métallique et adaptation	16
2.1.Stress environnemental et mécanismes adaptatifs.....	16
2.2.Adaptations locales aux métaux lourds.....	20
2.3.Évolution expérimentale.....	28
2.4.Conclusion.....	45
3.L'uranium dans les écosystèmes aquatiques.....	46
3.1.Propriétés chimiques et physiques.....	46
3.2.Origine et comportement de l'uranium dans les écosystèmes aquatiques continentaux.....	49
3.3.Toxicité de l'uranium vis à vis des invertébrés benthiques.....	53
Objectifs.....	60
Expérience 1: Effets de l'uranium sur les larves de chironome.....	64
1.Introduction.....	64
2.Matériels et méthodes.....	66
2.1.Origine des organismes.....	66
2.2.Contamination du sédiment.....	66
2.3.Plan expérimental.....	70
2.4.Mesures biologiques.....	71
2.5.Analyses statistiques.....	74
3.Résultats.....	75
3.1.Survie.....	75
3.2.Temps de développement.....	78
3.3.Croissance.....	80

3.4.Pourcentage de larves malformées et intensité des malformations.....	82
4.Discussion.....	85
4.1.Survie.....	85
4.2.Temps de développement.....	87
4.3.Croissance.....	87
4.4.Conséquences au niveau de la population.....	88
4.5.Malformations.....	89
4.6.Hypothèse de la mortalité différenciée.....	93
5.Conclusion.....	96
Expérience 2: Modifications phénotypiques d'une population exposée à l'uranium pendant huit générations.....	97
1.Introduction.....	97
1.1.Micro-évolution.....	97
1.2.Niveau de stress et réponse évolutive.....	99
1.3.Asymétrie fluctuante.....	100
1.4.Effet de l'uranium sur <i>C. riparius</i>	103
2.Matériels et méthodes.....	104
2.1.Plan expérimental.....	104
2.2.Échantillonnages, montages et mesures morphométriques sur les adultes....	108
2.3.Mesures physico-chimiques.....	114
2.4.Mesures biologiques.....	114
2.5.Analyses statistiques.....	118
3.Résultats.....	119
3.1.Nombre d'émergences.....	120
3.2.Temps d'émergence.....	128
3.3.Tailles des adultes.....	132
3.4.Asymétrie fluctuante des adultes.....	138
3.5.Fécondité des femelles.....	143
3.6.Succès d'éclosion.....	146
3.7.Analyse en Composante Principale.....	148
4.Discussion.....	161

4.1.Effets de l'uranium sur les adultes <i>Chironomus riparius</i>	161
4.2.Modifications phénotypiques au fil des générations – réponses évolutives...	169
5.Conclusion.....	185
Expérience 3: conséquences d'une pré exposition à l'uranium sur le niveau de tolérance d'une population de <i>Chironomus riparius</i>	187
1.Introduction.....	187
2.Matériels et méthodes.....	189
2.1.Origine des organismes.....	189
2.2.Plan expérimental.....	190
2.3.Analyses statistiques.....	190
3.Résultats.....	190
4.Discussion.....	194
5.Conclusion.....	196
Expérience 4: conséquences génétique d'une pré exposition à l'uranium.....	197
1.Introduction.....	197
2.Matériels et méthodes.....	199
2.1.Plan expérimental.....	199
2.2.Échantillonnages, montages et mesures morphométriques sur les adultes....	200
2.3.Mesures physico-chimiques.....	200
2.4.Mesures biologiques.....	201
2.5.Analyses statistiques.....	201
3.Résultats.....	202
3.1.Survie.....	204
3.2.Temps de développement.....	206
3.3.Taille.....	208
3.4.Reproduction.....	210
4.Discussion.....	212
5.Conclusion.....	218
Synthèse des résultats.....	219
Conclusion générale et perspectives.....	222
Glossaire.....	226

Références bibliographiques.....	238
Annexe 1.....	271
Annexe 2.....	275
Annexe 3.....	277
Annexe 4.....	283
Annexe 5.....	286

Introduction Générale

1. Contexte général

L'adaptation locale, qui est une cause importante des différenciations de populations, est l'un des principes de base de la biologie évolutive moderne. La sélection naturelle, mécanisme reconnu pour être responsable de changement évolutif, dirige ces processus adaptatifs. L'adaptation peut être définie comme la valeur phénotypique d'un trait qui accroît la valeur sélective (ou *fitness*) des individus, et qui est fixée ou stabilisée au sein d'une population à travers le processus de sélection naturelle (Danchin *et al.*, 2005). En conséquence, un état d'adaptation est en partie défini par l'action de la sélection naturelle qui agit directement sur le trait phénotypique considéré.

La pollution peut jouer un rôle important dans les pressions de sélection naturelle contemporaines (Postma *et al.*, 1995). L'intensité de la pression de sélection engendrée par une pollution excède souvent celle à laquelle est soumise une population dans un environnement non pollué. Par conséquent, des changements micro-évolutifs peuvent survenir en réponse à une force directionnelle anthropique, et ce durant une courte période (quelques générations) (Groenendijk *et al.*, 1999; Reznick *et al.*, 2005). En effet, une évolution rapide de la tolérance d'organismes à un polluant a déjà été démontrée dans la littérature (Eränen *et al.*, 2008; Vedamanikam *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 2007; Dechamps *et al.*, 2007; Piola *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2005; Bijlsma *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2003; Reznick *et al.*, 2001; Raymond *et al.*, 2001; Shirley *et al.*, 1999; Posthuma *et al.*, 1993). Néanmoins, dans la plupart des cas, il n'a pas été prouvé que l'augmentation de tolérance était due à des modifications génétiques au sein de la population. En effet, en présence d'une force sélective directionnelle forte, les modifications phénotypiques que l'on peut observer sur un faible nombre de générations est la conséquence de deux phénomènes : (i) l'acclimatation qui fait intervenir la plasticité phénotypique des individus et/ou (ii) l'adaptation, impliquant des changements génétiques au sein de la population (Falconer et Mackay, 1996). En

fonction du mécanisme mis en place, les conséquences à long terme peuvent être très différentes. Dans le cas d'une acclimatation, les individus ont acquis, au cours de leur vie, un degré de tolérance suite à une pré exposition. Cette tolérance n'est pas transmise à la descendance. Elle peut donc être induite ou perdue au cours d'une seule génération. En revanche, une adaptation génétique implique que la population a évolué en augmentant la tolérance moyenne de ses individus; la sélection naturelle agissant sur les individus de tolérance génétiquement différentes. Dans ce cas, cette tolérance se transmet à la descendance.

Comprendre les mécanismes adaptatifs est une étape fondamentale pour toute étude cherchant à appréhender les conséquences écologiques de l'exposition chronique de populations à un polluant (Chapman *et al.*, 2003). Si depuis longtemps les écotoxicologues ont étudié les effets immédiats (intra-générationnels) d'un polluant sur les organismes, que ce soit sur leur physiologie, leur comportement, leurs traits d'histoire de vie, en revanche, les conséquences à plus long terme sur les populations ont été très peu étudiées. Ainsi, des connaissances sur les changements des caractéristiques phénotypiques et génétiques sur plusieurs générations d'une population face à une perturbation de son environnement nous permettraient d'évaluer les risques associés à l'exposition chronique à un polluant sur l'extinction de population et le maintien de la biodiversité (Medina *et al.*, 2007).

L'uranium est présent dans tous les compartiments de la biosphère. Les écosystèmes aquatiques continentaux sont particulièrement exposés à la contamination par l'uranium. Ils constituent en effet des sites d'accumulation des polluants, de par leur rôle de réceptacle des eaux de pluie, des eaux de drainage, des eaux usées et des rejets industriels et agricoles. L'utilisation de l'uranium en tant que combustible nucléaire et pour la fabrication d'armes militaires, a conduit à une contamination des milieux naturels dans de nombreux sites à travers le monde. A cela il faut rajouter une contamination liée au relargage de quantités traces d'uranium venant d'autres activités anthropiques (combustion du charbon, usage agricole d'engrais phosphatés naturellement riche en uranium, applications militaires, scientifiques et médicales)

(Markich, 2002). Dans les écosystèmes continentaux, c'est dans les sédiments que l'uranium va essentiellement s'accumuler (Hynes, 1990), compartiment servant également d'habitat pour de nombreuses espèces de macro-invertébrés dulçaquicoles. Or ces organismes, de par leur position dans le réseau trophique (consommateurs primaires ou secondaires, proies), ont un rôle majeur dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques d'eau douce. Se pose alors la question des effets écotoxiques de l'uranium sur ces macro-invertébrés. Or peu de données existent sur l'écotoxicité de sédiment contaminé à l'uranium vis-à-vis des macro-invertébrés benthiques, ainsi que sur la capacité des ces populations à s'adapter à sa présence.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'étudier les réponses adaptatives de populations d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) soumises à la présence d'uranium dans leur environnement.

Pour cela, nous avons choisi d'appliquer en conditions contrôlées une démarche originale en combinant deux approches, (i) une approche « écotoxicologique », consistant à exposer des populations à différents scénarios d'exposition à un sédiment contaminé à l'uranium. Ainsi il a été possible d'établir des relations de type dose-réponse entre la concentration en uranium dans le milieu, et les paramètres biologiques mesurés; (ii) une approche « évolutive », permettant de suivre l'évolution des paramètres biologiques mesurés au fil des générations, et d'identifier les mécanismes adaptatifs mis en place.

Le manuscrit se structure en deux volets principaux : 1) une revue de littérature sur la problématique abordée, 2) une présentation et une discussion de nos résultats.

Dans le volet revue de la littérature, une première partie fera état du rôle que peut avoir une contamination sur le processus de sélection naturelle, en décrivant principalement les mécanismes adaptatifs susceptibles d'être mis en place pour peut être permettre de s'adapter à leur environnement. Cette partie s'achèvera sur une présentation des méthodologies utilisées en évolution expérimentale, en insistant particulièrement sur

l'intérêt d'une telle approche dans la compréhension des mécanismes de la sélection naturelle. Une deuxième partie développera la problématique liée à l'uranium présent dans les écosystèmes aquatiques, en mettant l'accent sur son ecotoxicité vis-à-vis des macro-invertébrés benthiques. Enfin, une dernière partie clôturera cette synthèse bibliographique en énonçant les objectifs spécifiques de la thèse.

Dans le volet expérimental, chaque expérience fera l'objet d'une partie dans laquelle figurera tout d'abord une introduction brève rappelant l'objectif spécifique de l'expérience, suivie ensuite des parties matériels et méthodes, résultats et discussion. Enfin, nous concluons sur l'ensemble des résultats obtenus et rétrospectivement sur les approches mises en œuvre.

2. Contamination métallique et adaptation

2.1. Stress environnemental et mécanismes adaptatifs

Un stress environnemental peut être défini comme une condition environnementale qui, lorsqu'elle s'applique pour la première fois, engendre une diminution de la *fitness* des individus. Ce stress peut résulter de modifications des facteurs abiotiques d'un environnement, tels que la température, des facteurs climatiques, ou encore la présence de composés chimiques d'origine naturelle ou anthropique. Un stress environnemental peut également résulter de modifications de facteurs biotiques, telles que la compétition, la prédation, ou encore le parasitisme.

Pour compenser cette réduction de *fitness*, des mécanismes adaptatifs peuvent entraîner des modifications phénotypiques et génétiques dans la population. L'adaptation est alors un processus de changement qui se met en place afin de se conformer au mieux aux conditions environnementales. Dans ce cas, le groupe d'individus dont les caractéristiques (morphologiques, physiologiques, ou comportementales) leur permettent d'avoir une survie ainsi qu'un succès reproducteur élevés dans les conditions environnementales qui ont déclenché ce processus sera favorisé (Bijlsma et Loeschcke, 2005).

Ces changements peuvent être uniquement phénotypiques. On parle alors d'adaptation phénotypique ou d'acclimatation, qui est la conséquence de la plasticité phénotypique. C'est à dire la capacité d'un même génotype à donner différents phénotypes selon l'environnement dans lequel l'individu se développe. Un exemple spectaculaire d'adaptation phénotypique est donné par la daphnie en réponse à un stress biotique, la prédation (Agrawal, 2001). Chez *Daphnia lumholtzi*, la présence de prédateur va conduire chez les daphnies exposées à des modifications morphologiques au niveau du casque et de l'épine caudale qui lui conféreront une protection accrue (figure 1).



Figure 1. Plasticité phénotypique d'un clone de Daphnia lumholtzi. L'individu de gauche a été exposé à des signaux chimiques provenant d'un poisson prédateur, l'individu de droite n'a pas été exposé (contrôle). La forme du casque ainsi que la longue épine caudale chez l'individu exposé lui permettent d'être mieux protégé de la prédation (extrait de Agrawal, 2001).

La plasticité phénotypique est favorisée par la sélection naturelle lorsqu'elle permet aux individus d'une population de s'ajuster efficacement aux différents environnements qu'ils peuvent rencontrer (Anger, 2006). Il existe cependant certains coûts liés aux mécanismes et à la régulation nécessaire pour assurer un tel niveau de flexibilité, de telle sorte que la plasticité phénotypique reste limitée (DeWitt *et al.*, 1998).

L'adaptation peut également s'opérer à travers un changement des fréquences alléliques sous l'influence d'une pression de sélection engendrée par l'environnement. On parle alors d'adaptation génétique. L'adaptation génétique d'une population à son environnement est alors le résultat de l'action de la sélection naturelle sur la gamme de phénotypes disponibles dans une population. Les gènes conférant la meilleure valeur sélective aux individus qui les portent sont alors favorisés, et leurs fréquences tendront à s'accroître dans le temps si les conditions environnementales qui les sélectionnent sont maintenues (Boivin, 2003 ; Falconer et Mackay, 1996).

Les perturbations d'origine anthropique sont généralement considérées comme un moteur puissant de l'évolution des populations. Les modifications structurales et fonctionnelles du milieu qui en résultent vont conduire à de nouvelles cartes sélectives dans le jeu de l'adaptation. La résistance aux insecticides représente l'un des exemples les plus marquants des processus adaptatifs aux changements de l'environnement, d'autant que ce phénomène a émergé dans un intervalle de temps relativement court (~ 30 ans) au regard du temps évolutif (Hendry *et al.*, 2008).

L'étude de l'évolution de la tolérance aux insecticides chez le moustique *Culex pipiens* a par exemple permis de mieux comprendre la dynamique évolutive observée au cours du suivi de populations naturelles exposées ou non de manière chronique aux organophosphates, en caractérisant les mécanismes adaptatifs du gène à la population (boîte 1). Ces travaux ont alors permis d'élaborer une stratégie de lutte contre cette acquisition de tolérance chez le moustique, vecteur de maladies (Weill *et al.*, 2003).

Boite 1. Évolution de la résistance aux pesticides chez des populations de Culex pipiens du sud de la France.

L'évolution de la tolérance aux insecticides de type organophosphates (OP) chez des populations de moustiques Culex pipiens du sud de la France est un cas d'école (Bourguet et al., 2004 ; Weill et al., 2003 ; Raymond et al., 2001 ; Raymond, 1998 #765). Les OP inhibent l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine dans les synapses cholinergiques. Cette inhibition prolonge la durée de l'influx nerveux, qui conduit rapidement à la mort du moustique (Weill et al., 2003). Développer une tolérance aux OP implique une diminution, voir une suppression de l'inhibition de l'acétylcholinestérase. L'étude des différents phénotypes de tolérance et des changements génétiques qui leur sont associés a permis d'appréhender chez des populations de Culex pipiens comment s'est faite cette adaptation et comment elle s'est modifiée au cours du temps (Raymond et al., 2001).

Ainsi, seuls trois loci sont responsables de tolérance majeure, *Est-2*, *Est-3* et *Ace-1*. *Est-2* et *Est-3* forment un super locus (*Ester*) car très proches dans le génome; ces gènes codent pour des estérases qui métabolisent les OP avant qu'ils puissent inhiber l'acétylcholinestérase des synapses. Chez les phénotypes tolérants, ces estérases sont produites en excès grâce à un processus d'amplification du nombre de copies

des gènes les codant et/ou augmentant leur expression. En effet, certains allèles de tolérance comportent jusqu'à 50 copies d'*Ester*, alors que l'allèle sensible ne comporte qu'une seule copie (Weill et al., 2003). Le gène *Ace-1* code pour la cible des OP, l'acétylcholinestérase. Dans les cas de tolérance, cette cible est mutée, réduisant ainsi son affinité pour les OP.

Actuellement une dizaine d'allèles de tolérance au locus *Ester* et deux au locus *Ace-1* sont connus chez *Culex pipiens*. Cependant cette plus grande tolérance a un coût en terme de *fitness* pour les génotypes porteurs de ces allèles (Bourguet et al., 2004 ; Raymond et al., 2001). Dans un environnement sans insecticides, les moustiques résistants meurent plus jeunes que les moustiques dépourvus de mutations, se développent plus lentement, sont plus fréquemment capturés par des prédateurs, sont plus sensibles aux infections. Si les moustiques sauvages et mutés sont mis en compétition, les seconds perdent dans toutes les conditions testées. Évidemment, en présence d'insecticide, ils s'en sortent quand même car ce sont les seuls à survivre.

Notons que le coût se modifie avec le temps, certains allèles « tolérants » moins coûteux en remplaçant d'autres (Guillemaud et al., 1998 ; Lenormand et al., 1998).

L'application d'une telle démarche sur d'autres polluants, tels que les métaux, permettrait de mieux caractériser les effets chroniques d'une exposition de populations à ces toxiques (Klerks, 2002), notamment à travers l'étude des mécanismes adaptatifs mis en jeu selon la concentration. Or, à l'heure actuelle, aucune démarche d'évaluation du risque environnemental lié à la présence de métaux lourds n'en tient compte (Chapman *et al.*, 2003), et ce type d'étude est encore rare malgré le contexte environnemental.

2.2. Adaptations locales aux métaux lourds

Dans le monde entier, de nombreuses zones sont plus ou moins contaminées par des métaux provenant d'activités anthropiques (ex : exploitations minières, agriculture). Ces contaminations peuvent conduire localement à la disparition de plusieurs espèces végétales et animales sensibles (Klerks et Levinton, 1993 ; Clements, 1994 ; Kiffney et Clements, 1994). Cependant, d'autres espèces témoignent de leur plus grande capacité d'adaptation en survivant et en se reproduisant dans ces environnements pollués (pour une revue, voir Posthuma et Van Straalen (1993) pour les milieux terrestres, Klerks (1987) pour les milieux aquatiques, tableau 1 pour des exemples plus récents). Ces espèces se sont adaptées localement. On parle d'adaptation locale lorsque dans un certain habitat, les génotypes locaux présentent une *fitness* relative supérieure aux génotypes originaires d'un autre habitat (Sotka, 2005).

Tableau 1. Exemples d'études récentes sur l'adaptation locale aux métaux lourds.

Métal	Espèce	Origine	Plan expérimental ¹	Traits mesurés	Résultats	Acclimatation / Adaptation	Référence
Mélange de Cd, Zn (sédiment naturel)	<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Populations naturelles issues de sites contrôles et de sites contaminés	Test de toxicité	- Survie - Taux d'excrétion	- Adaptation locale en terme de survie des larves	n.d. ²	Leppanen et al., 1998
Mélange (effluent de mine de pyrite de cuivre)	<i>Ceriodaphnia pulchella</i> (crustacé)	Populations naturelles issues de sites contrôles et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie - Reproduction	Adaptation locale des populations issues du site pollué, même après maintien (>5 générations) dans des conditions de laboratoire optimales	Adaptation	Lopes et al., 2005
Mélange de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg (sédiment naturel)	<i>Chironomus februaryi</i> (diptère)	Populations naturelles issues de sites contrôles et de sites contaminés	Test de toxicité	- Survie	Adaptation locale en terme de survie	n.d.	Bahrndorff et al., 2006
Mélange de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg (sédiment naturel)	<i>Kiefferulus intertinctus</i> (diptère)	Populations naturelles issues de sites contrôles et de sites contaminés	Test de toxicité	- Survie	Pas de différence significative entre les populations	n.d.	Bahrndorff et al., 2006
Mélange de Cu et Ni (sol contaminé)	<i>Betula pubescens</i> (bouleau)	Populations naturelles issues de sites contrôles et de sites contaminés	Jardin commun	- Hauteur du plant - Longueur des feuilles - Fluorescence de la chlorophylle	Adaptation locale Coût de la tolérance	Adaptation	Eränen, 2008

<i>Métal</i>	<i>Espèce</i>	<i>Origine</i>	<i>Plan expérimental¹</i>	<i>Traits mesurés</i>	<i>Résultats</i>	<i>Acclimatation / Adaptation</i>	<i>Référence</i>
<i>Pb</i>	<i>Gambusia affinis</i> (poisson)	Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie	Adaptation locale: - différence significative entre les populations lors du test de survie 3 jours après le prélèvement - plus de différence significative entre les populations 34 jours après le prélèvement (individus maintenus en laboratoire dans un milieu non contaminé)	Acclimatation	Klerks et Lentz, 1998
<i>Zn</i>	<i>Gambusia affinis</i> (poisson)	Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie	Pas de différence significative entre les populations	n.d.	Klerks et Lentz, 1998
<i>Cd</i>	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> (oligochaète)	Populations naturelles issues d'un site contrôle et d'un site contaminé par du Cd et du Ni	Test de toxicité	- Survie	Adaptation locale: différence significative entre les populations après deux générations dans des conditions de laboratoire.	Adaptation	Klerks et Levinton, 1989
<i>Cd</i>	<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie - Croissance	Adaptation locale en termes de survie et de croissance pour certaines populations seulement Coût de tolérance en terme de croissance	n.d.	Postma et al., 1995
<i>Cd</i>	<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie - Temps de développement - Succès d'éclosion des œufs	Adaptation locale en termes de temps de de développement et de succès d'éclosion des œufs Coût de tolérance en termes de survie et de temps développement	n.d.	Postma et al., 1995
<i>Cu</i>	<i>Daphnia longispina</i> (crustacé)	Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés	Tests de toxicité	- Survie - Reproduction	Adaptation locale des populations issues du site pollué, même après maintien (>5 générations) dans des conditions de laboratoire optimales	Adaptation	Lopes et al., 2006

<i>Métal</i>	<i>Espèce</i>	<i>Origine</i>	<i>Plan expérimental¹</i>	<i>Traits mesurés</i>	<i>Résultats</i>	<i>Acclimatation / Adaptation</i>	<i>Référence</i>
<i>Cu</i>	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoaire)	<i>Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés</i>	<i>Test de toxicité</i>	- <i>Succès d'attachement</i> - <i>Croissance</i>	<i>Adaptation locale en terme de croissance</i>	<i>n.d.</i>	<i>Piola et Johnston, 2006</i>
<i>Cu</i>	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoaire)	<i>Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés</i>	<i>Translocation réciproque</i>	- <i>Survie</i> - <i>Croissance</i>	<i>Adaptation locale</i> <i>Coût de la tolérance</i>	<i>Adaptation</i>	<i>Piola et Johnston, 2006</i>
<i>Cu</i>	<i>Cognettia sphagnetorum</i> (oligochaete)	<i>Populations naturelles issues de sites contrôlés et de sites contaminés</i>	<i>Jardin commun (environnement contaminé)</i>	- <i>Survie</i> - <i>Croissance</i> - <i>Reproduction</i>	<i>Adaptation locale en termes de survie et de croissance</i> <i>Pas de différence de reproduction entre les populations</i>	<i>n.d.</i>	<i>Haimi et al., 2006</i>

¹ **Les tests de toxicité** permettent de déterminer pour chaque population étudiée leur seuil de tolérance à un ou plusieurs toxiques, en les exposant à une gamme de concentrations. Cette valeur seuil calculée pour un trait phénotypique, très souvent la survie, est considérée comme une mesure du niveau de tolérance de la population au toxique testé. Cette méthode présente l'avantage de donner une mesure quantitative du niveau de tolérance. **Les expériences de jardin commun ou de translocation réciproque** permettent la comparaison des performances entre au moins deux populations à l'histoire de vie différentes (Falconer et Mackay, 1996).

² n.d. : non déterminé.

Dans le cas d'une adaptation génétique, l'adaptation locale résulte d'un processus graduel de tri des organismes selon les conditions du milieu à travers la sélection naturelle (Danchin *et al.*, 2005). La sélection par les métaux lourds est considérée comme directionnelle¹, continue et forte. En effet, les métaux lourds sont des substances non dégradables, qui peuvent entraîner des effets toxiques. Ainsi leur présence dans un environnement peut être considérée comme un moteur important de la sélection naturelle. La sélection naturelle maximisant la *fitness*, on considère que son action se traduit par un accroissement de la tolérance des populations aux métaux lourds présents dans leur environnement (Posthuma et Van Straalen, 1993).

Plusieurs travaux ont permis de démontrer l'origine génétique de l'adaptation locale à la présence de métaux lourds (Klerks, 2002 ; Lopes *et al.*, 2005 ; Lopes *et al.*, 2006 ; Piola et Johnston, 2006 ; Eränen, 2008). Par exemple, à proximité d'un site fortement contaminé par du cadmium et du nickel (*Foundry Cove*, New York), Klerks et Levinton (1989) ont montré une adaptation locale d'une population autochtone d'oligochaète *Limnodrilus hoffmeisteri*. Lors d'un test de survie de 28 jours réalisé en laboratoire, les individus issus de cette population ont survécu en présence du sédiment contaminé prélevé à *Foundry Cove*, contrairement à ceux issus d'une population prélevée dans un site non contaminé. De plus, ce test a permis de démontrer l'origine génétique de cette adaptation locale, car réalisé sur les populations après deux générations de maintien en laboratoire dans des conditions non contaminées (*i.e.* pas de pré-exposition, éventuel effet maternel négligeable (Falconer et Mackay, 1996))².

De même, Lopes *et al.* (2005, 2006) ont démontré une tolérance accrue d'origine génétique chez des populations naturelles de daphnie *Ceriodaphnia pulchella* et

1 En sélection directionnelle, les génotypes qui sous-tendent les phénotypes à un des deux extrêmes de la distribution sont favorisés. La moyenne va donc changer dans cette direction entre deux générations, et la variance peut éventuellement diminuer (Danchin *et al.*, 2005).

2 Les auteurs ont également réalisé les mêmes tests sur une espèce de chironome (*Tanypus neopunctipennis*) sans pouvoir mettre en évidence une telle adaptation locale. De plus *in situ*, le suivi des populations n'a pas permis de montrer un quelconque effet de la pollution, que ce soit pour la population « adaptée » (*Limnodrilus hoffmeisteri*) et celle « non adaptée » (*Tanypus neopunctipennis*). En effet, dans la zone contaminée par *Foundry Cove* la densité des deux espèces était équivalente, voire supérieure, à celle dans un site contrôle (Klerks, 2002).

Daphnia longispina exposées à la contamination métallique d'une ancienne mine de cuivre dans le sud-est du Portugal, par rapport à des populations non exposées (test de toxicité après cinq générations de maintien en laboratoire dans des conditions non contaminées). Selon les auteurs, l'augmentation de la survie chez les populations exposées serait le résultat de la sélection directionnelle engendrée par l'exposition aux métaux. Cette hypothèse repose sur d'autres travaux ayant mis en évidence une acquisition de tolérance d'origine génétique (Klerks, 1987 ; Posthuma et Van Straalen, 1993)³. Cette sélection directionnelle aurait alors sélectionné les individus sensibles, initialement présents dans la population. Les auteurs proposent également qu'une perte de diversité génétique aurait pu conduire à un effet fondateur (Lopes *et al.*, 2006). Cependant, cette hypothèse n'a pu être vérifiée.

Piola et Johnston (2006) ont mené des études en laboratoire (test de toxicité) et *in situ* (translocation réciproque) afin de mesurer des différences de tolérance au Cu chez des populations du bryzoaire *Bugula neritina*, originaires d'un site contaminé au Cu et d'un site contrôle. La population originaire du site contaminé avait une tolérance au Cu supérieure à la population contrôle. L'expérience de translocation réciproque a également permis de montrer que cette accroissement de tolérance offrait un avantage en milieu contaminé, mais avait un coût dans un environnement non contaminé, probablement à cause du coût énergétique engendré par le ou les mécanismes physiologiques responsables de cette tolérance (boîte 2).

3 Posthuma et Van Straalen (1993) ont observé chez des populations de collemboles vivant sur un site contaminé par des métaux (Cd essentiellement) une plus grande tolérance ainsi qu'une meilleure capacité d'excrétion des métaux par rapport aux populations témoins. Selon les auteurs, une forte sélection directionnelle induite par le Cd aurait favorisé les traits liés à la tolérance, telle que la capacité d'excrétion.

Boite 2. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez les espèces animales.

La tolérance à un stress environnemental implique des mécanismes spécifiques ou non au type de stress (Posthuma et Van Straalen, 1993). Soumis à un stress les organismes peuvent réduire les impacts en modifiant leur comportement et/ou leur physiologie (Hoffmann et Parsons, 1991).

Comportement de fuite

Le comportement de fuite peut être la première réaction de l'organisme une fois le stress détecté (Hoffmann et Parsons, 1991 ; De Lange *et al.*, 2006 ; Lenihan *et al.*, 1995 ; West et Ankley, 1998 ; De Haas *et al.*, 2006 ; Wenstel *et al.*, 1977 ; Yeardley *et al.*, 1996). Il permet ainsi de réduire l'exposition de ces organismes au contaminant, et donc leur toxicité.

Plusieurs mécanismes physiologiques peuvent également être à l'origine d'une augmentation de la tolérance aux métaux, leur but étant de réduire les effets négatifs de l'exposition (Posthuma et Van Straalen, 1993).

Réduction de l'assimilation

La modification de la capacité d'assimilation du métal peut contribuer à l'adaptation. Par exemple, Xie et Klerks (2004) ont mis en évidence chez le poisson gambusie *Heterendria formosa* des modifications de l'absorption et de l'accumulation de cadmium comme des mécanismes responsables de la tolérance accrue au Cd. En effet les auteurs ont comparé l'accumulation de Cd de trois lignées contrôles avec trois lignées sélectionnées avec succès pour une plus grande tolérance au Cd (Xie et Klerks, 2003). Les individus des lignées tolérantes avaient un taux d'assimilation du Cd plus faible que celui des lignées contrôles. Ces résultats suggèrent que l'assimilation réduite ayant conduit à une accumulation de Cd dans les organismes plus lente est responsable de la tolérance accrue des poissons sélectionnés.

Induction de métallothionéines

Une fois dans la cellule, la distribution du métal dans les différents compartiments intra-cellulaires est déterminée par l'affinité du métal avec des ligands (Posthuma et Van Straalen, 1993). Chez les espèces animales, les ligands les plus

fréquemment étudiés pour les métaux sont les métallothionéines (MT). Le taux de synthèse de ces protéines est considéré comme un facteur clé dans la régulation des métaux, en séquestrant les métaux par la formation d'un complexe afin de diminuer son interaction avec d'autres structures, et de fait sa toxicité. De part ses propriétés d'inductibilité, cette protéine est la plus impliquée dans la résistance aux métaux lourds (Klerks, 1987; Shirley et Sibly, 1999 ; Gillis *et al.*, 2002 ; Piola et Johnston, 2006). Par exemple Gillis *et al.* (2002) ont exposé deux espèces d'invertébrés, *Tubifex tubifex* et *Chironomus riparius*, à des sédiments artificiellement enrichis en Cd. Les résultats ont montré pour les deux espèces une relation de type dose-réponse entre la concentration en Cd et la quantité de Cd accumulé dans l'organisme ainsi que la quantité de MT synthétisées, confirmant ainsi l'induction de la production de MT par le Cd.

Augmentation de l'excrétion

Tout comme l'assimilation, il existe des différences d'excrétion entre les individus (Posthuma et Van Straalen, 1993). Chez le collembole *Orchesella cincta*, l'excrétion de métal a été clairement mis en évidence à travers l'exfoliation de l'épithélium intestinal lors de chaque mue, composante importante de la tolérance au Cd pour cette espèce (Van Straalen *et al.*, 1987). Ce moyen d'excrétion lui permet ainsi de réduire la quantité de métal accumulé dans le corps.

Un autre moyen d'excrétion chez certaines espèces est l'autotomie (Terrail *et al.*, 2008). Chez les tubificidés notamment, ce mode d'excrétion consiste à éliminer les polluants qui s'accumulent dans leurs extrémités par une simple autotomie de la partie caudale du corps (Terrail *et al.*, 2008).

Ainsi, plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une tolérance accrue. Au sein d'une population exposée à un métal, toute variabilité intra-individuelle au niveau des performances du ou des mécanismes impliqués va donc conduire à une sélection (Hoffmann et Parsons, 1991).

Les exemples décrits ci-dessus illustrent ainsi la capacité d'un certain nombre d'espèces à s'adapter à un environnement contaminé par des métaux lourds. Ils montrent également comment l'approche comparative généralement employée permet d'étudier l'adaptation aux métaux lourds des populations naturelles. On compare, à travers la mesure de différents traits, le niveau de tolérance de populations issues de différents sites contrôles et contaminés. Selon Posthuma et Van Straalen (1993), « *cette démarche est déterminée par des considérations théoriques* :

- *L'adaptation locale est un bon indicateur de présence d'un effet toxique sur un site.*
- *Ces études permettent éventuellement la mise en évidence de variabilité génétique entre les populations étudiées, et renseignent donc sur leur potentiel adaptatif.*
- *Elles peuvent être une source d'information sur les mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance.*
- *Elles permettent d'identifier les conséquences d'une forte sélection directionnelle sur la fitness, en particulier en terme de coût de tolérance du fait des compromis entre les traits d'histoire de vie.*

Cette démarche comparative peut également se justifier de manière pratique :

- *L'interprétation est relativement simple en comparaison avec les études sur la sélection naturelle, l'agent principal de la sélection étant clairement identifié.*
- *La prise en compte de l'adaptation dans la détermination des niveaux de pollution jugés acceptables dans une démarche d'évaluation du risque.*
- *La détermination des espèces pouvant être utilisées pour un biomonitoring.*
- *La prise en compte de l'adaptation comme paramètre influençant la structure et le fonctionnement d'un écosystème, à travers les interactions entre les populations et les communautés. »*

Néanmoins une telle démarche ne permet pas à elle seule d'étudier la dynamique de cette adaptation, car celle-ci n'est faite qu'*a posteriori*. Si la plupart des auteurs

identifient clairement la présence de métal comme agent principal de la sélection passée ou en cours (Posthuma et Van Straalen, 1993), peu d'études ont réellement permis de le démontrer à ce jour, notamment à travers la mise en évidence d'une relation de type dose-effet entre la concentration en métal présent dans le milieu et l'intensité de la sélection agissant sur les populations exposées.

D'autres plans d'expériences empruntés à la biologie évolutive, tels que les expériences de sélection naturelle en laboratoire permettent d'étudier en temps réel cette évolution de la population soumise à un brusque changement d'environnement, telle qu'une contamination par des métaux lourds.

2.3.Évolution expérimentale

Dans la nature, la sélection naturelle et sexuelle agissent directement sur les phénotypes complexes (ex: les traits d'histoire de vie) qui sont polygéniques. Ainsi, les fréquences des allèles à de nombreux *loci* peuvent changer en réponse à la sélection (Falconer et Mackay, 1996). Les expériences de sélection permettent d'étudier l'évolution en action, mais dans des conditions contrôlées, reproductibles, et réalistes (Garland, 2003). La sélection se fait sur certains traits de l'organisme entier, tel que le comportement, la taille du corps, et/ou un trait d'histoire de vie (ex: croissance, fécondité). Ainsi avec un nombre suffisant de générations, ces expériences permettent d'observer d'éventuels changements fondamentaux dans l'architecture à la fois phénotypique et génétique d'une population, qui peuvent alors être attribués à la sélection qui a lieu de manière bien définie.

Pour comprendre l'action de la sélection, il existe deux types de sélection expérimentale : la sélection artificielle (*c.f.* §2.3.5., p.34), et la sélection naturelle en laboratoire (*c.f.* §2.3.6., p. 38 ; Falconer et Mackay, 1996 ; Lynch et Walsh, 1998). Quel que soit le choix du plan expérimental, plusieurs facteurs doivent être considérés (Garland, 2003) : (i) le choix de l'organisme ; (ii) le nombre de lignées et de répliquions ; (iii) l'origine de la population ; (iv) l'intensité de la sélection.

2.3.1.Choix de l'organisme

Il doit de préférence avoir un temps de génération court pour autoriser des expériences sur plusieurs générations. Il doit pouvoir être maintenu dans des conditions imposées par l'expérimentateur. Sa taille doit être petite pour permettre de travailler sur un grand nombre d'individus (plusieurs centaines par génération), ceci afin de réduire notamment l'influence de la dérive génétique.

La dérive génétique peut être définie comme une fluctuation aléatoire de la fréquence des gènes au cours des générations liés à un effet d'échantillonnage (Falconer et Mackay, 1996). La différence essentielle entre la dérive génétique et la sélection naturelle est à rechercher dans les conditions de leur enclenchement. Il n'est nullement nécessaire que la variation sur un trait ait des conséquences en terme de survie et de succès reproducteur pour que la dérive génétique opère. L'importance de la dérive génétique dépend en fait de la taille de la population. Lorsque la population est petite, les biais liés à la stochasticité des processus démographiques peuvent être importants. Comme toute population naturelle est d'effectif fini, la dérive exerce toujours une influence plus ou moins modeste en fonction de la taille réelle de l'effectif de la population et des autres forces évolutives (sélection, dispersion) en présence. De ce fait, dérive et sélection opèrent simultanément au sein de petites populations (Danchin *et al.*, 2005).

2.3.2.Nombre de lignées et réplication

Leur nombre doit être d'au moins deux, une lignée contrôle et une lignée sélectionnée. Ces lignées doivent également être répliquées. La réplication des lignées est indispensable pour attribuer la réponse de la population à la sélection, plutôt qu'à des effets aléatoires tels que la dérive génétique et/ou des mutations.

En dehors de la sélection imposée par l'expérimentateur, l'action d'autres forces de sélection non intentionnelles sont également à prendre en considération. On parle alors

de sélection inconsciente. Celle-ci peut se produire de plusieurs façons : (i) par des variations aléatoires ou accidentelles des conditions environnementales, de telle sorte que la sélection s'effectue soit sur le trait d'intérêt, soit sur un ou plusieurs autres caractères; (ii) par un protocole expérimental susceptible d'entraîner une sélection inconsciente. Par exemple, Postma et Davids (1995) ont étudié l'induction de tolérance chez une population de *Chironomus riparius* exposée en laboratoire à du cadmium durant 9 générations consécutives. Selon les auteurs le protocole expérimental a potentiellement favorisé les individus au temps de développement court en ensemençant chaque génération avec les œufs pondus en début de période de reproduction. Cette sélection inconsciente expliquerait alors l'absence de retard de développement chez les populations exposées par rapport aux populations contrôles. Les auteurs avancent cette hypothèse en se basant sur la théorie des traits d'histoire de vie qui prédit que l'exposition à un toxique qui entraîne une augmentation de la mortalité ou de l'effort de reproduction, comme c'est le cas dans l'étude de Postma et Davids, va favoriser au sein d'une population les individus à la maturité précoce (Sibly, 1994).

2.3.3. Origine de la population

Pour de nombreuses espèces, il est possible d'utiliser des individus issus soit de populations sauvages ou d'élevage. Les populations sauvages doivent au préalable avoir été maintenues dans les conditions de laboratoire pendant plusieurs générations afin qu'elles puissent s'être acclimatées à ces conditions. Sans cela l'adaptation aux conditions de laboratoire se fera au cours de l'expérience de sélection. En choisissant des populations d'élevage, des lignées particulières peuvent être disponibles. Évidemment, il est nécessaire d'utiliser une souche présentant une variabilité génétique importante, car d'elle dépend le potentiel adaptatif de la population, et donc sa réponse à la sélection (Reed *et al.*, 2003).

2.3.4. Intensité de la sélection

Tout trait soumis à la sélection y répondra proportionnellement à l'intensité de celle-ci. En considérant un seul trait (ex: lors de sélection artificielle), la formule permettant de

décrire la réponse phénotypique à la sélection est l'équation de l'éleveur (*breeder's equation*) : $R = h^2S$

où R est la réponse à la sélection, h^2 est l'héritabilité du trait, et S est le différentiel de sélection (*i.e.* la différence entre la moyenne de la population et la moyenne des parents qui contribuent à la génération suivante ; Falconer et Mackay, 1996). La composante génétique de cette équation est l'héritabilité h^2 , qui correspond au rapport de la variance génétique additive sur la variance phénotypique.

L'équation de l'éleveur simple peut s'étendre à plusieurs traits corrélés. L'équation prend alors en compte non seulement l'héritabilité de chaque trait, mais également le fait que les gènes qui contrôlent chaque trait peut également influencer d'autres traits étudiés (*i.e.* pléiotropie, déséquilibre de liaison). Ces influences sont mesurées grâce aux corrélations génétiques entre les traits. Ainsi dans le cas de deux traits corrélés X , Y , l'équation de l'éleveur étendue devient l'équation G :

$$R_x = \beta_x h_x^2 + \beta_y h_x h_y r_G$$

où R_x est la réponse du trait X lorsque la sélection s'applique aux traits X et Y . Les héritabilités de X et Y sont respectivement h_x^2 , h_y^2 , et r_G est la corrélation génétique entre les deux traits. Les équivalents multivariés du différentiel de sélection sont notés β_x et β_y , et sont appelés les coefficients de sélection (ou gradients de sélection). Cette équation de l'éleveur multivariée peut s'écrire de manière matricielle : $R = G.\beta$; où R est le vecteur réponse, G la matrice des variance-covariance génétiques, et β le vecteur incluant les gradients de sélection. La matrice G est symétrique, avec comme éléments sur la diagonale les variances génétiques, et en dehors les covariances génétiques (Lynch et Walsh, 1998).

Cette matrice de variance-covariance génétique détermine les trajectoires évolutives des traits soumis à la sélection (Roff, 2007). Elle peut notamment s'illustrer par les compromis évolutifs (boite 3).

Ainsi d'après cette équation, plus la sélection sera forte, plus la réponse des traits soumis sera grande⁴. Par conséquent pour une taille de population donnée, la réponse à la sélection au fil des générations augmentera en diminuant la proportion d'individus reproducteurs. Néanmoins, en diminuant cette proportion, la taille effective de la population va diminuer, augmenter la dérive génétique et la consanguinité, et par conséquent réduire le potentiel adaptatif de la population (Falconer et Mackay, 1996).

4 De même, plus le trait sera héritable et plus sa réponse sera grande. En revanche, l'évolution sera réduite pour deux traits corrélés génétiquement et sujets à des pressions de sélection antagonistes (gradient de sélection de signe différent si la corrélation génétique est positive).

Boite 3. Sélection et compromis entre les traits d'histoire de vie.

Lorsqu'ils sont soumis à la sélection naturelle les traits d'histoire de vie évoluent vers une optimisation de la *fitness*, selon une trajectoire définie par des compromis ou *trade-offs* (Roff, 2007). Un compromis existe lorsqu'une modification sur un trait entraîne une augmentation de *fitness*, et que de manière concomitante, la modification d'un autre trait entraîne une diminution de celle-ci. Ce terme de compromis s'utilise pour décrire à la fois une corrélation statistique entre les traits et/ou une relation fonctionnelle.

En génétique quantitative, les compromis sont considérés comme des covariances génétiques négatives entre deux traits qui peuvent être dues à des effets pléiotropes, antagonistes, ou encore d'un déséquilibre de liaison de plusieurs gènes (Roff et Fairbairn, 2007 ; Boivin, 2003).

D'un point de vue fonctionnel, le compromis peut être décrit selon un modèle d'acquisition/allocation, comme par exemple le modèle-Y de Van Noordwijk et De Jong (1986) (pour une description de ce modèle, voir Roff et Fairbairn, 2007). La compréhension de ces compromis fait l'objet actuellement de nombreux travaux de recherche en biologie évolutive, car si leur rôle dans l'évolution des traits d'histoire de vie ne fait aucun doute, les bases théoriques et les perspectives empiriques de leur évolution sont encore peu explorées (Agosta et Klemens, 2009 ;

Roff, 2007 ; Roff et Fairbairn, 2007 ; Roff *et al.*, 2006 ; Prasad et Amitabh, 2003).

Les traits d'histoire de vie, tels que l'âge de maturité sexuelle, le temps de développement, la fécondité, et la survie influencent directement la *fitness* des individus. Néanmoins d'autres traits contribuent également à la *fitness*, mais de façon indirecte (Roff, 2007). Par exemple, chez la plupart des invertébrés, plantes et petits mammifères, la fécondité augmente avec la taille du corps ; cette taille dépendant elle-même du temps de développement (Woods *et al.*, 2002).

Chez les diptères, la taille du corps et le temps de développement sont des traits corrélés positivement (Woods *et al.*, 2002 ; Tokeshi et Reinhardt, 1996 ; Xue et Ali, 1994). En effet, des études en laboratoire sur la drosophile ont permis de mettre en évidence lors d'expériences de sélection artificielle une corrélation positive entre la taille du corps et le temps de développement (voir références dans Woods *et al.*, 2002). Ainsi, chez des lignées de *Drosophila melanogaster* sélectionnées pour un temps de développement court, la taille du corps a diminué. Inversement, des lignées sélectionnées pour une taille de corps élevée ont vu leur temps de développement augmenter. Cette corrélation positive peut être considérée comme un compromis (Roff et Fairbairn, 2007).

2.3.5.Sélection artificielle

La sélection artificielle se fait sur des populations composées d'individus sur lesquels un ou plusieurs traits phénotypiques particuliers sont mesurés à chaque génération. A partir de ces mesures, les individus d'une certaine fraction de la population – généralement la fraction supérieure ou inférieure – sont sélectionnés comme reproducteurs à chaque génération (Falconer et Mackay, 1996). Ce type de sélection permet au manipulateur de choisir précisément le trait soumis à la sélection. S'en suivra une modification graduelle du trait dont la vitesse et l'amplitude dépendront de son héritabilité (h^2) et de l'intensité de la sélection (S).

Par exemple, Luckinbill et Mc Clare (1985) ont réalisé une sélection expérimentale sur *Drosophila melanogaster* pendant 29 générations. Deux lignées ont ainsi été sélectionnées selon la longévité des individus (courte et longue). Pour cela, les auteurs ont permis à chaque génération la reproduction des adultes à des âges spécifiques (précoce et tardif ; figure 2).

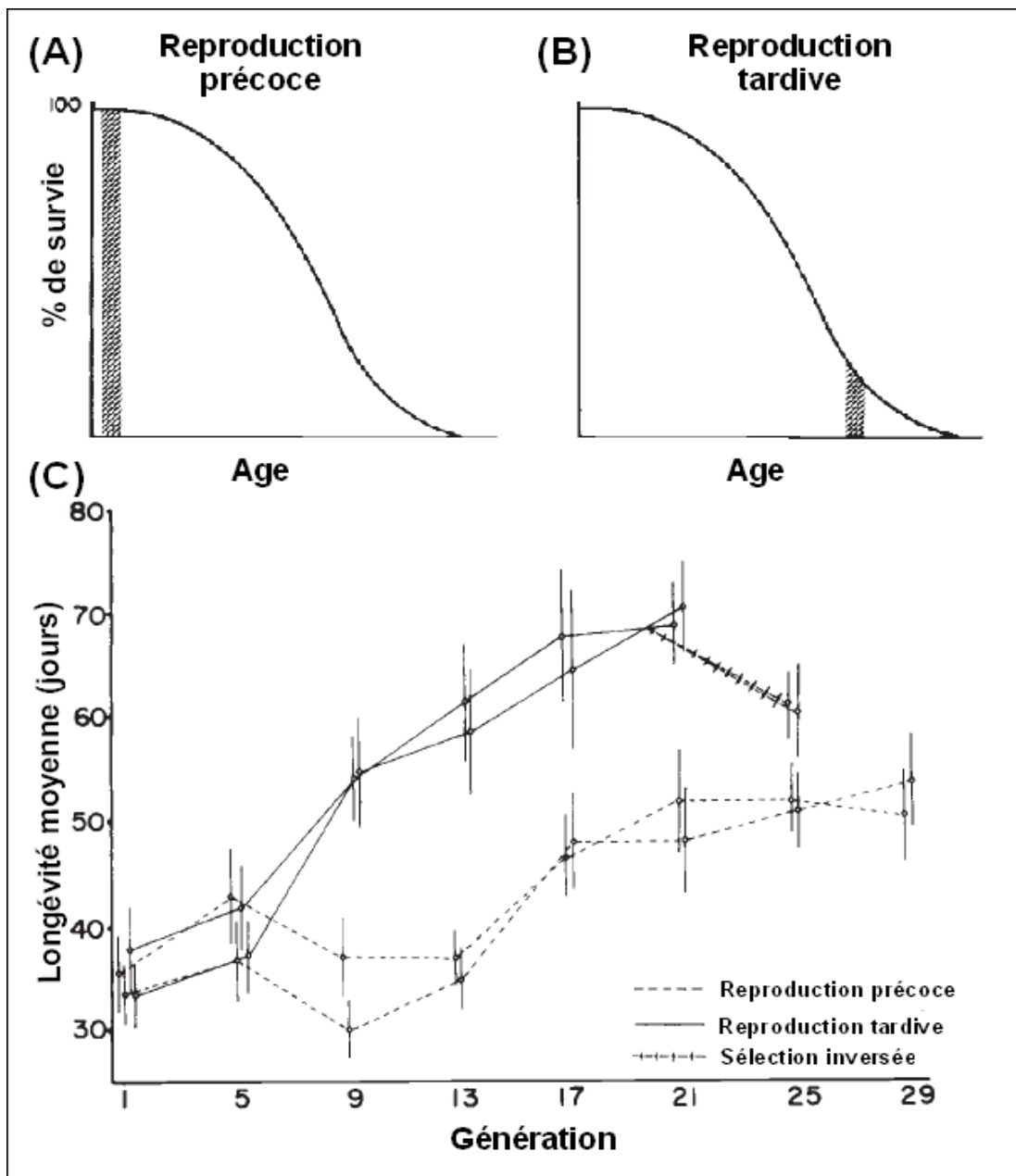


Figure 2. Chez *Drosophila melanogaster*, (A) sélection pour une longévité courte par sélection des individus se reproduisant précocement (partie hachurée); (B) Sélection pour une longévité longue par sélection des individus se reproduisant tardivement; (C) Évolution de la longévité selon les deux traitements (extrait modifié de Luckinbill et Mc Clare, 1985).

Une forte réponse à la sélection pour la reproduction tardive a été observée avec une augmentation de la durée de vie des individus supérieure à 50% au bout de 21 générations.

De même, Garland (2003) a réalisé sur des souris d'élevage une sélection artificielle, en sélectionnant les individus selon leur activité journalière (nombre de tours de roue par jour) pendant 24 générations. Une augmentation graduelle de l'activité a été observée au fil des générations chez les lignées sélectionnées (figure 3). Au cours de la sélection, les individus ayant une faible activité ont été éliminés des lignées.

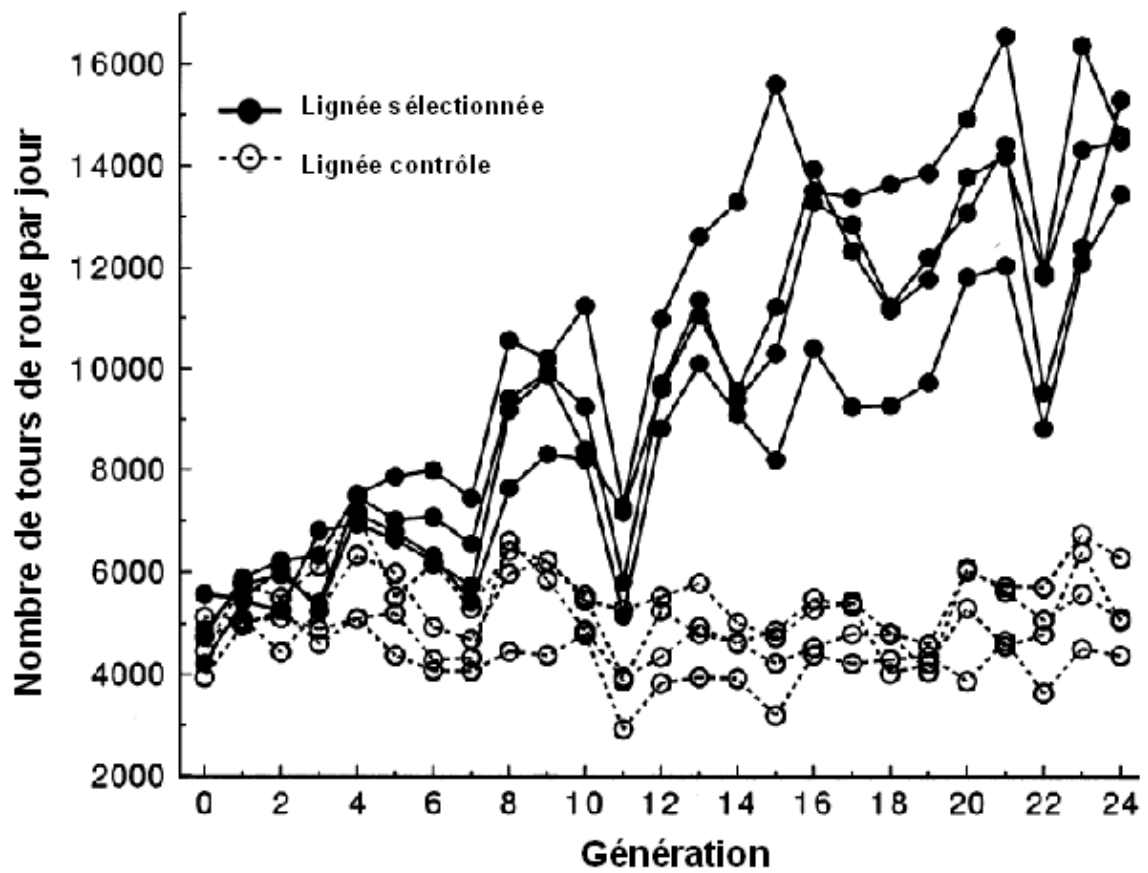


Figure 3. Niveau d'activité (nombre de tours de roue par jour) de souris femelles issues de lignées sélectionnées pour une activité élevée, et de lignées contrôles (extrait modifié de Garland, 2003).

2.3.6.Sélection naturelle en laboratoire

Lors d'une expérience de sélection naturelle en laboratoire, les populations sont soumises à une altération de leur environnement susceptible d'entraîner une réponse adaptative de la population⁵, en considérant qu'il existe une héritabilité significative pour des traits pertinents (ex: traits d'histoire de vie). La sélection naturelle en laboratoire peut être considérée comme le meilleur plan expérimental pour comprendre les mécanismes de la sélection naturelle (Reznick et Ghalambor, 2005).

Plusieurs expériences de sélection naturelle en laboratoire ont déjà été réalisées dans le but d'étudier l'acquisition de tolérance chez des populations d'insectes exposées à des métaux lourds (tableau 2).

5 Dans le cas d'une exposition à des métaux, Posthuma et Van Straalen (1993) considèrent qu'une concentration \geq LOEC pour le trait étudié peut entraîner une réponse adaptative de la population.

Tableau 2. Exemples d'évolution expérimentale de populations soumises à un stress métallique pendant plusieurs générations.

Espèce	Origine des individus	Stress	Traitements	Nombre de génération	Traits étudiés	Expériences complémentaires	Évolution des réponses	Autre résultat	Référence
<i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)	Élevage de laboratoire	Tétra-éthyle de Pb	- Contrôle - 60 µg g ⁻¹ de milieu (CL ₅₀)	25	- Fécondité - Succès d'éclosion - Viabilité des larves	Croisement des lignées après 25 générations, et comparaison des performances en milieu contrôlé et en milieu contaminé.	n.d.	<u>Milieu contaminé:</u> meilleure performance des populations pré exposées <u>Milieu contrôlé:</u> pas de coût de tolérance pour les populations pré exposées	Nassar, 1979
<i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)	Population constituée à partir de 4 souches plus ou moins tolérantes au mercure	Méthyle mercure	- Contrôle - Contaminé (~CL ₅₀) ³ - Contaminé (>CL ₅₀) ³	12	Niveau de tolérance à la génération 3, 7, et 12 (test de toxicité)		Augmentation de la tolérance au méthyle mercure chez les populations exposées	vitesse d'acquisition de la tolérance proportionnelle à la pression de sélection	Magnusson et Ramel, 1986
<i>Drosophila melanogaster</i> (diptère)	Élevage de laboratoire	Cd	- Contrôle - 80 µg mL ⁻¹ de nourriture	20	- Survie des juvéniles - Temps de développement - Poids des adultes - Fécondité	Jardin commun après 20 générations ¹ : - Environnement contrôlé - Environnement contaminé	n.d.	<u>Milieu contaminé:</u> Meilleures performances des populations exposées: - Meilleur survie - Temps de développement plus court - Meilleure fécondité - Adultes plus gros <u>Milieu contrôlé:</u> Meilleures performances des populations contrôlés: - Meilleure fécondité - Adultes plus gros	Shirley et Sibly, 1999

<i>Espèce</i>	<i>Origine des individus</i>	<i>Stress</i>	<i>Traitements</i>	<i>Nombre de génération</i>	<i>Traits étudiés</i>	<i>Expériences complémentaires</i>	<i>Évolution des réponses</i>	<i>Autre résultat</i>	<i>Référence</i>
<i>Heterandria formosa</i> (poisson)	Population naturelle	Cd	- Contrôle - 6 mg Cd L ⁻¹ pendant 36 hrs (CL ₅₀)	6	- Mortalité au cours de l'exposition - Mortalité post-exposition - Niveau de tolérance à chaque génération (test de toxicité)	- Niveau de tolérance au Cu à la génération 2, 3, et 6 (test de toxicité) - Résistance à la température	Augmentation de la survie et de la tolérance des populations exposées	<u>Populations exposées:</u> - Co-tolérance au Cu - Diminution de la résistance à la température (Coût de la tolérance au Cd)	Xie et Klerks, 2003
<i>Daphnia magna</i> (crustacé)	Population de laboratoire constituée d'individus issus de 8 souches différentes	Cd	- Contrôle - CL ₅₀ ³	8	- Durée de vie - Taille des pontes - Temps de 1 ^{ère} ponte - Taille de la 1 ^{ère} ponte - Fécondité des femelles - Taux de croissance de la population - Taille des daphnies - Niveau de tolérance à chaque génération (test de toxicité) - Diversité génétique des populations à la première et dernière génération ²	<u>Sur la 8^{ème}-génération:</u> - Jardin commun en conditions optimales, et stressantes (température élevée; manque de nourriture). - Niveau de tolérance au Cu, Pb, phénol, et malathion (test de toxicité)	- Augmentation de la tolérance des populations exposées jusqu'à la 6 ^{ème} génération. - Diminution significative de la diversité génétique de la populations exposée entre la première et la dernière génération.	<u>Jardin commun:</u> - En conditions optimales: différence de performance entre les populations uniquement en terme de croissance (croissance plus lente des populations exposées) - En conditions stressantes: pas de différence de performance entre les populations. <u>Tests de toxicité:</u> - Différence de tolérance entre les populations uniquement au Cd et au Pb (populations pré-exposées au Cd plus tolérantes)	Ward et Robinson, 2005
<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Élevage de laboratoire	Tributyl-étain (TBT)	- Contrôle - 4,46 µg Sn kg ⁻¹ de sédiment sec (< CL ₅₀)	11	- Survie - Taille des adultes - Temps de développement - Fécondité des femelle - Taux de croissance de la population - Diversité génétique ⁴ aux générations 0, 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11.	- Niveau de tolérance au TBT aux générations 3, 5, 8, 9, 10 (test de toxicité)	- Augmentation de la tolérance des populations exposées, significative à partir de la 9 ^{ème} génération. - Baisse de la diversité génétique de la population contrôle.		Vogt et al., 2007

<i>Espèce</i>	<i>Origine des individus</i>	<i>Stress</i>	<i>Traitements</i>	<i>Nombre de génération</i>	<i>Traits étudiés</i>	<i>Expériences complémentaires</i>	<i>Évolution des réponses</i>	<i>Autre résultat</i>	<i>Référence</i>
<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Élevage de laboratoire	Cd	- Contrôle - 1,9 µg Cd L ⁻¹ (NOEC) - 6,1 µg Cd L ⁻¹ - 17,9 µg Cd L ⁻¹ (CL ₅₀)	9	- Survie des larves - Temps de développement - Fécondité des femelles - Taux de croissance de la population	Niveau de tolérance des populations survivantes à la neuvième génération (test de toxicité) ⁵	- Diminution de la survie des larves chez les populations exposées - Augmentation de la fécondité des femelles dans les traitements 6,1 et 17,9 µg Cd L ⁻¹ au cours des dernières générations - Diminution du taux de croissance de la population dans tous les traitements	Au bout de 9 générations, différence de tolérance entre les populations contrôles et 17,9 µg Cd L ⁻¹ (populations pré-exposées au Cd plus tolérantes)	Postma et Davids, 1995

n.d. : non disponible.

CL₅₀ : Concentration entraînant 50% de mortalité.

NOEC : Dernière concentration testée n'ayant pas entraîné de différence significative avec le traitement contrôle (*Non Observed Effect Concentration*)

¹ Pour négliger l'influence d'éventuels effets maternels, la comparaison des performances des populations s'est faite sur la deuxième génération du jardin commun (Shirley et Sibly, 1999).

² Diversité génétique estimée par AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*) (Ward et Robinson, 2005).

³ Concentration recalculée pour chaque traitement à chaque génération grâce à un test de toxicité (Magnusson et Ramel, 1986 ; Ward et Robinson, 2005).

⁴ Diversité génétique mesurée par l'étude de la variabilité de marqueurs micro-satellites (Nowak *et al.*, 2006 ; Vogt *et al.*, 2007).

⁵ Au cours de l'exposition multi-générationnelle, la forte mortalité a contribué à l'extinction des populations exposées à 1,9 et 17,9 µg Cd L⁻¹ respectivement à la 7^{ième} et 9^{ième} génération. Seuls les niveaux de tolérances des populations contrôles et exposées à 6,1 µg Cd L⁻¹ ont été mesurées (Postma et Davids, 1995).

Chez *Drosophila melanogaster*, Nassar (1979) a mis en évidence après 25 générations d'exposition à une concentration de tétra-éthyle de plomb entraînant 50% de mortalité chez les larves, une amélioration de la *fitness* moyenne et de ses composantes (fécondité, éclosion, viabilité) chez des individus issus de la population exposée par rapport à la population contrôle. Pour expliquer cette amélioration de la *fitness* moyenne, l'auteur propose l'hypothèse suivante : à cause du stress induit par le tétra éthyle de plomb, la sélection ne s'est pas faite sur les gènes contrôlant la fécondité et l'éclosion, mais plutôt sur des gènes conférant une tolérance au tétra éthyle de plomb, avec des effets corrélés sur ces traits d'histoire de vie.

De même, Magnusson et Ramel (1986) ont étudié l'acquisition de tolérance au méthyle mercure de populations de *Drosophila melanogaster*. A partir d'une population issue de quatre lignées de drosophiles tolérantes au méthyle mercure, une expérience de sélection a été conduite sur douze générations. Trois niveaux de pression de sélection ont été testés – une pression nulle, une pression forte (exposition à une concentration en méthyle mercure entraînant 50% de mortalité), et une pression très forte (> 50% de mortalité). Les résultats ont mis en évidence chez les populations exposées au méthyle mercure une rapide augmentation au cours des douze générations de la tolérance. De plus, cette réponse a été proportionnelle à la pression de sélection, la population la plus tolérante après douze générations étant celle soumise à la plus forte pression de sélection (Magnusson et Ramel, 1986). Notons qu'au cours de l'expérience, avec l'augmentation de tolérance des populations et afin de maintenir des pressions de sélection constantes au fil des générations, les auteurs ont augmenté graduellement la concentration en méthyle mercure présent dans le milieu (Magnusson et Ramel, 1986). D'autres part, l'assimilation et l'excrétion de méthyle mercure ont été mesurées par scintillation liquide à l'aide de l'isotope radioactif ^{203}Hg , chez des individus des populations contrôles et soumises à la plus forte pression de sélection au bout des douze générations. La population contrôle exhibait une plus grande assimilation de méthyle mercure que la population soumise à la plus forte sélection. En revanche, les taux d'excrétion étaient identiques dans les différentes populations. Cette étude a ainsi permis

de mettre en évidence au bout de douze générations des différences de tolérance et d'assimilation du méthyle mercure entre les trois populations.

Lors d'une expérience de sélection naturelle en laboratoire, Shirley et Sibly (1999) ont exposé pendant 20 générations des populations de *Drosophila melanogaster* à un milieu contaminé ou non au Cd. Les lignées exposées au milieu contaminé ont développé au cours des 20 générations une tolérance au Cd. Les analyses de croisements entre les lignées ont permis d'étudier la base génétique de cette tolérance. Au vue de ces résultats, les auteurs ont suggéré la production de métallothionéines comme probable voie métabolique. L'un des mécanismes génétiques connus de la tolérance peut être alors la duplication des gènes. Maroni *et al.* (1987) ont en effet constaté à partir d'échantillons de populations naturelles de *Drosophila melanogaster* prélevés sur les quatre continents que les larves porteuses de plusieurs copies de gène codant pour des métallothionéines synthétisaient plus d'ARN « métallothionéine », ceci leur conférant une plus grande tolérance au Cd et au Cu par rapport au larves porteuse d'une seule copie.

Xie et Klerks (2003) ont exposé durant six générations successives des populations du poisson gambusie (*Heterandria formosa*) à une concentration de Cd correspondant à la CL50,72h. A chaque génération, une série de tests de toxicité aiguë réalisée sur les juvéniles a révélé chez la lignée pré-exposée une augmentation graduelle de la tolérance au Cd au cours des six générations, tolérance devenant significativement différente à celle de la population contrôle dès la seconde génération. Ainsi au bout de six générations, les poissons de la population pré-exposée vivaient trois fois plus longtemps en présence de Cd que ceux de la population contrôle.

De même Ward et Robinson (2005) ont réalisé une expérience de sélection en laboratoire sur des populations de *Daphnia magna* exposées au Cd pendant huit générations. Les auteurs ont alors mis en évidence chez les populations devenues tolérantes, des daphnies plus petites, une baisse significative de la diversité génétique, ainsi qu'une plus grande sensibilité à d'autres toxiques par rapport aux contrôles.

Vogt *et al.* (2007), en étudiant les effets multi-générationnels du tributylétain (TBT) sur *Chironomus riparius* ont également mesuré une augmentation significative de la tolérance au TBT chez les populations pré-exposées, au bout de 9 générations. En effet, les tests de toxicité aiguë réalisés sur les larves ont indiqué des CL50 similaires pour les deux populations à la troisième, cinquième et huitième génération. En revanche, à la neuvième et dixième génération, la CL50 de la population pré exposée au TBT a été plus élevée que celle de la population contrôle. Notons que le suivi des traits d'histoire de vie n'a pas permis de relier cette acquisition de tolérance avec une amélioration de la *fitness* moyenne des individus.

Enfin, Postma et Davids (1995) ont soumis une population d'élevage de *Chironomus riparius* à différentes concentrations en Cd pendant neuf générations consécutives. Les auteurs ont observé chez les populations exposées au Cd une modification au fil des générations de certains traits d'histoire de vie, tels que la survie (diminution de la survie des larves dans certaines conditions au point d'avoir une extinction), le temps de développement (augmentation lors des dernières générations) et la fécondité des femelles (augmentation du nombre d'œufs par masse pondue). L'exposition au Cd aurait entraîné une pression de sélection qui aurait conduit au bout de neuf générations à une augmentation de tolérance des populations pré-exposées, tolérance mise en évidence par un test de croissance (Postma et Davids, 1995).

Ainsi, l'ensemble des résultats présentés souligne la forte pression de sélection causée par la présence de métaux lourds dans l'environnement, qui peut conduire à une modification des traits d'histoire de vie au fil des générations, et une augmentation de la tolérance (Posthuma et Van Straalen, 1993). La rapidité de l'acquisition (de l'ordre de 10 générations) révèle également la forte pression induite par la présence de métaux à des concentrations stressantes.

2.4. Conclusion

Les perturbations d'origine anthropique sont généralement considérées comme des moteurs puissants de l'évolution. Au delà d'une certaine concentration dans le milieu, la présence de métaux peut induire sur les populations présentes un stress. Les conséquences à court terme vont être une réduction de la *fitness* des individus. Pour compenser cette réduction, des mécanismes adaptatifs sont susceptibles de se mettre en place sur plusieurs générations (acclimatation et/ou adaptation). Pour plusieurs métaux, des études ont d'ailleurs démontré des adaptations locales chez des populations naturelles. Cependant, d'un point de vue mécaniste, peu de données sont disponibles sur le rôle des métaux en tant que moteur de la sélection. En effet, si l'acquisition de tolérance a déjà été observée lors d'expériences de sélection en laboratoire, très peu d'entre elles ont permis de relier cette acquisition à la concentration d'exposition, ainsi qu'à l'évolution de la *fitness* moyenne des individus au fil des générations.

Le choix d'une approche combinant à la fois une démarche d'évolution expérimentale suivie d'une approche comparative permettrait de répondre à un grand nombre de questions sur le rôle de la présence de métaux lourds dans la sélection naturelle, les mécanismes adaptatifs mis en place par les populations exposées, et les conséquences pour celles-ci. L'exposition d'une même population à différents scénarios d'exposition, lors d'expériences multi-générationnelles en conditions contrôlées, permettrait de relier l'acquisition de tolérance à travers le suivi des traits d'histoire de vie, à la concentration présente dans le milieu. Ainsi, on s'attend au cours des générations à observer une diminution progressive de la toxicité du métal, l'acquisition de tolérance entraînant alors une amélioration des performances des populations.

3.L'uranium dans les écosystèmes aquatiques

L'uranium est un métal lourd, présent naturellement dans l'environnement, que l'on trouve sous diverses formes chimiques dans les sols, les eaux continentales, les océans, l'atmosphère et dans les organismes vivants.

3.1.Propriétés chimiques et physiques

L'uranium appartient au groupe des actinides. C'est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev, donc le plus lourd. Il possède dix sept isotopes, tous radioactifs, émetteurs de particules alpha, ainsi que d'un faible rayonnement électromagnétique (X et gamma).

A l'état pur, l'uranium est un métal caractérisé par une très forte densité (19 g cm^{-3}), ainsi qu'une grande pyrophoricité, c'est à dire la capacité à s'enflammer au contact de l'air quand il est sous forme de microparticules.

L'élément uranium se retrouve toujours associé à d'autres éléments tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, ou le carbone. On le retrouve par exemple en combinaison avec l'oxygène dans l'uranite et la pechblende, les principaux minerais d'uranium, constitués d'oxyde uraneux (UO_2). Enfin les ions uranyles (UO_2^{2+}) se dissolvent très bien dans la plupart des acides en donnant des sels d'uranyle tels que le nitrate d'uranyle.

L'uranium naturel est composé d'un mélange de trois isotopes, ^{238}U , ^{235}U , ^{234}U , dont les proportions sont pratiquement toujours les mêmes, quel que soit le milieu et sa teneur en uranium (tableau 3).

Tableau 3. Abondances, radioactivités, périodes, et activités des trois isotopes de l'uranium naturel (d'après Colle et al., 2001).

	Abondance relative en masse (%)	Radioactivité en relative (%)	Période (années)	Activité spécifique (Bq g ⁻¹)
²³⁸ U	99,27	48,9	4,5 10 ⁹	1,2 10 ⁴
²³⁵ U	0,72	2,2	7,1 10 ⁸	8,0 10 ⁴
²³⁴ U	0,01	48,9	2,44 10 ⁵	2,3 10 ⁸

L'uranium utilisé comme combustible nucléaire est enrichi en ^{235}U . C'est le seul isotope naturel fissible, donc capable d'entretenir une réaction en chaîne. Après séparation de la fraction enrichie, le métal restant est appelé uranium appauvri. Sa radioactivité correspond à 60% de celle de l'uranium naturel (Mitchell *et al.*, 2005).

3.1.1. Origine et répartition

En moyenne, la croûte terrestre contient 2,8 ppm d'uranium, ce qui en fait le 49^{ème} élément le plus abondant. L'uranium se concentre surtout dans certains granites (4 ppm) et certaines roches sédimentaires (2 ppm). Les gisements se forment le long de discontinuités géologiques, où l'on trouve de l'uranium dans de nombreuses roches (minerai à 0,1%, 1000 ppm). Cependant, il existe en quantité importante (20000 ppm) dans certaines roches (minerai à 2%) comme la pechblende et la carnotite (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

L'uranium se retrouve également sous forme de poussières atmosphériques et sous forme dissoute. L'eau de mer en contient environ quatre milliards de tonnes représentant ainsi son plus grand réservoir mondial. Les principaux fleuves mondiaux contiennent en moyenne $0,35 \mu\text{g U L}^{-1}$. Mais la concentration dans les eaux douces varie de 0,01 à $6,60 \mu\text{g U L}^{-1}$ selon le temps de contact avec des strates rocheuses contenant de l'uranium, le taux d'évaporation et la disponibilité d'agents ioniques complexants (Windom *et al.*, 2000 ; Markich, 2002). Dans les estuaires, les concentrations en uranium augmentent généralement de façon linéaire avec le gradient de salinité, jusqu'à atteindre une concentration de $3,0 \mu\text{g U L}^{-1}$ dans l'eau de mer (Windom *et al.*, 2000). Bien que l'uranium se comporte de façon conservative pendant le mélange estuarien, il peut aussi avoir un comportement non conservatif où l'uranium peut être piégé ou relargué par le sédiment (Windom *et al.*, 2000). Dans les sédiments aquatiques, la concentration peut varier entre 0,5 et $5,0 \mu\text{g U g}^{-1}$, avec une moyenne à $3,0 \mu\text{g U g}^{-1}$ (Markich, 2002).

Les valeurs référencées dans ce paragraphe pour les eaux et les sédiments continentaux correspondent au bruit de fond géochimique naturel pour les écosystèmes aquatiques qui ne se situent pas dans des terrains particulièrement riches en uranium ou qui ne sont

pas contaminés. Ce qui peut être le cas autour de sites miniers ou des sites de fabrication d'armes nucléaires. En effet, des valeurs cent voir mille fois supérieures ont été relevées dans certains de ces sites (Neame *et al.*, 1982 ; Lozano *et al.*, 2002 ; Landa, 2004 ; Mitchell *et al.*, 2005).

3.2.Origine et comportement de l'uranium dans les écosystèmes aquatiques continentaux

3.2.1.Origine de l'uranium dans les écosystèmes aquatiques continentaux

Les écosystèmes aquatiques continentaux sont des écosystèmes particulièrement exposés à la contamination par l'uranium et par les métaux en général. Ils constituent en effet des sites d'accumulation des polluants, de par leur rôle de réceptacle des eaux de pluie, des eaux de drainage, des eaux usées et des rejets industriels et agricoles. L'utilisation de l'uranium par l'homme depuis les années 1920, en tant que combustible nucléaire et pour la fabrication d'armes militaires, a conduit à une contamination des milieux naturels dans de nombreux sites à travers le monde. A cela il faut rajouter une contamination plus discrète, liée au relargage de quantités traces d'uranium venant de (i) la combustion du charbon qui relargue dans l'atmosphère divers radionucléides ; (ii) l'usage agricole d'engrais phosphatés naturellement riche en uranium ; (iii) toutes les applications militaires, scientifiques et médicales de l'uranium appauvri vues précédemment (Markich, 2002).

Dans les eaux de surface, une des caractéristiques les plus importantes de l'uranium est, comme d'autres métaux lourds, sa distribution entre les phases particulaires, colloïdales et dissoutes (Markich, 2002). Cette distribution est gouvernée par la solubilité de l'uranium et son affinité pour les particules qui dépendent du pH, du potentiel d'oxydoréduction, ou de la concentration en différents ligands (boite 4).

Boite 4. Spéciation de l'uranium dans les eaux de surface et dans les sédiments superficiels.

Dans les eaux de surface

D'un point de vue strictement chimique, l'uranium peut exister à plusieurs états d'oxydation, allant de (+III) à (+VI), les formes les plus stables étant U(+IV) en milieu réducteur et U(+VI) en milieu oxydant. La spéciation de l'uranium est principalement liée aux valeurs du pH et du potentiel d'oxydoréduction Eh (Langmuir, 1978). Elle dépend aussi fortement de nombreux autres paramètres physico-chimiques comme l'alcalinité, la pression partielle de CO₂, la force ionique, la teneur en matière organique (Ragnarsdottir et Charlet, 2000 ; Markich, 2002 ; Denison, 2004), ainsi que l'activité microbienne (Lovley *et al.*, 1991).

L'adsorption joue également un rôle-clé dans la distribution de l'uranium au sein des écosystèmes aquatiques (Curtis *et al.*, 2004). En effet, cette adsorption particulière, sur des minéraux et sur de la matière organique, réduit la mobilité de l'uranium. On considère que cette adsorption particulière augmente avec le pH jusqu'à un seuil, qui dépend de la concentration en uranium, en adsorbant, en ions en compétition (ex: carbonates), en agents chélateurs, et à la force ionique (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

Globalement les formes uranyles UO₂²⁺ sont les formes les plus solubles, donc les plus mobiles de l'uranium. Pour ces raisons, elles sont souvent considérées comme les plus biodisponibles. Ces caractéristiques font que leur présence dans les écosystèmes constitue un risque potentiel pour les biocénoses (Colle *et al.*, 2001).

Dans les sédiments superficiels

Dans les milieux d'eau douce, la colonne d'eau est généralement oxygène. L'uranium peut arriver à l'interface eau/sédiment, soit sous une forme dissoute (ion uranyle ou complexé), soit lié à la matière en suspension qui sédimente. Dans le premier cas, il va alors diffuser dans le sédiment. Dans le second cas, comme les autres métaux, l'uranium peut être (i) intégré dans la structure cristalline des minéraux, (ii) intégré à la matière organique (fèces, débris animaux et végétaux), (iii) précipité ou co-précipité, ou (iv) adsorbé sur des particules. Au cours de son incorporation dans le sédiment, l'uranium va subir des transformations biogéochimiques (ex: complexation/dissociation ; oxydation/réduction ; adsorption/désorption ; dissolution/précipitation) qui vont jouer sur ses transferts entre les différents compartiments biotiques et abiotiques (Markich, 2002).

Dans la zone oxygène du sédiment, l'uranium est sous la forme uranyle. Plus bas dans la colonne sédimentaire, le milieu devenant de plus en plus réducteur, l'uranium va être réduit en U(+IV) et va tendre à s'accumuler et être immobilisé dans les couches les plus profondes par précipitation et par adsorption sur des sulfures ou sur des minéraux authigènes (Lovley *et al.*, 2004). Ce processus de réduction peut également être réalisé de façon biotique par des bactéries métallo-réductrices (Lovley *et al.*, 1991). Cependant, des perturbations peuvent survenir et modifier cette stratification verticale (ex: remise en suspension lors de crues, bioturbation). L'uranium peut être ainsi de nouveau oxydé, et être par conséquent resolubilisé et remobilisé vers l'eau interstitielle et la colonne d'eau.

3.2.2. Contamination du sédiment

Malgré la forte solubilité de l'uranium dans les eaux de surfaces, ce sont les sédiments qui présentent les plus fortes concentrations dans les écosystèmes aquatiques continentaux (Hynes, 1990). Compte tenu de son comportement biogéochimique dans les sédiments (réduction vers une forme U(IV) peu soluble ; boîte 4), l'uranium tend comme la plupart des métaux, à s'accumuler dans ce compartiment (Ribera *et al.*, 1996). Si le bruit de fond biogéochimique naturel dans les sédiments d'eau douce est estimé inférieur à $10 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec, des valeurs bien supérieures ont été relevées dans différents sédiments impactés par l'activité minière actuelle ou passée (tableau 4).

Tableau 4. Tableau non exhaustif des concentrations en uranium considérées comme naturelles (sites non impactés) en comparaison avec des concentrations maximales relevées à proximité de mines d'uranium (sites impactés)(d'après Lagauzere, 2008).

Pays	[U] $\mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec	Références
Sites non impactés		
Albanie	0,65 - 2,18	Tsabarlis <i>et al.</i> , 2007
Algérie	0,89 - 2,02	Benamar <i>et al.</i> , 1997
France	0,73 - 5,00	Lambrechts <i>et al.</i> , 1992
Italie	3,39 - 5,65	Doretto <i>et al.</i> , 1992
Turquie	1,29 - 9,11	Kurnaz <i>et al.</i> , 2007
Sites impactés (valeurs maximales)		
Canada	110	Swanson, 1985
Australie	450	Lottermoser <i>et al.</i> , 2005
Espagne	810	Lozano <i>et al.</i> , 2002
Canada	~1000	Mc Kee <i>et al.</i> , 1987
Canada	~3000	Joshi <i>et al.</i> , 1989
France	5160	IRSN, 2007
Canada	5650	Neame <i>et al.</i> , 1982
Canada	18000	Hart <i>et al.</i> , 1986

Dans ce dernier cas, c'est essentiellement au niveau des sédiments que se manifeste encore l'influence minière, les eaux surnageantes ne présentant plus de teneurs en uranium remarquables après quelques années.

Par exemple, un rapport récent de l'IRSN (2007), constituant une expertise de l'impact d'une ancienne mine d'uranium exploitée par AREVA dans le limousin jusqu'en 1995, montre que dans le sédiment des cours d'eau et étangs en amont du site, les concentrations en uranium sont comprises entre 2,4 et 122 $\mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec tandis qu'elles atteignent des valeurs maximales de 13, 81, 444, et 5160 $\mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec respectivement dans les ruisseaux, rivières, lacs et étangs en aval de la mine. En revanche, les eaux de surface ne présentent plus de marquage significatif de l'impact minier, soit douze ans après la fin d'exploitation.

3.3. Toxicité de l'uranium vis à vis des invertébrés benthiques

L'uranium naturel présente essentiellement une chimiotoxicité pour les organismes aquatiques, du fait de sa très faible activité spécifique ($2,53 \cdot 10^4 \text{ Bq g}^{-1} \text{ U}$), ainsi que la faible pénétration des particules alpha. Ainsi sa radiotoxicité par exposition externe peut être considérée comme faible (Kuhne *et al.*, 2002)⁶.

La toxicité de l'uranium va dépendre directement de sa biodisponibilité pour les organismes vivants. Comme vu précédemment, celle-ci serait principalement liée à sa spéciation chimique, la forme uranyle présentant à priori le plus grand risque pour les biocénoses (Colle *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, un certain nombre de travaux portent sur l'amélioration des prédictions des interactions entre la spéciation, la biodisponibilité de l'uranium, et sa toxicité vis à vis des espèces aquatiques notamment. De façon globale, la toxicité de l'uranium diminue avec l'augmentation du pH, de la dureté, de l'alcalinité, et de la présence de ligands organiques dans les phases aqueuses (Ribera *et al.*, 1996 ; Labrot *et al.*, 1999 ; Franklin *et al.*, 2000 ; Markich *et al.*, 2000 ; Markich,

⁶ Cependant, sa radiotoxicité ne doit pas être négligée en cas d'internalisation, les particules alpha très énergétiques pouvant alors occasionner des dommages aux cellules et à l'ADN (Thomas *et al.*, 2001; Kuhne *et al.*, 2002).

2002 ; Charles *et al.*, 2002 ; Denison, 2004 ; Sheppard *et al.*, 2005). Cette diminution de toxicité reposerait sur une diminution de la biodisponibilité par compétition de l'ion uranyle avec les espèces cationiques, notamment les protons présents dans l'eau (pour une revue, voir Markich, 2002).

Les macro-invertébrés dulçaquicoles colonisent, parfois avec des densités très importantes, les sédiments superficiels. Or ces organismes, de par leur position dans le réseau trophique (consommateurs primaires ou secondaires, proies) et leur activité de bioturbation, ont un rôle majeur dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques continentaux. Leur présence dans des sédiments contaminés à l'uranium fait qu'ils sont susceptibles de subir des effets toxiques de l'uranium présent dans le compartiment sédimentaire et/ou la colonne d'eau.

Jusqu'à présent, très peu de données existent sur l'écotoxicité de sédiment contaminé à l'uranium vis à vis des macro-invertébrés benthiques (tableau 5).

Tableau 5. Synthèse des études écotoxicologiques publiées concernant la toxicité d'un sédiment contaminé à l'uranium vis à vis des invertébrés benthiques.

Espèce	U	Source de contamination	Nature du sédiment	Durée d'exposition	Critère d'effet	Mesures	Valeur en [U]eau mg L ⁻¹	Valeur [U]sédimen t µg g ⁻¹	pH de l'eau	Dureté de l'eau (mg L ⁻¹ de CaCO ₃)	Alcalinité de l'eau (mg L ⁻¹ de CaCO ₃)	Référence	
<i>Hyalella azteca</i>	<i>U_{naturel}</i>	Sédiment	Naturel	14 jours	Mortalité (juvéniles)	NOEC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	BEAK International Incorporated, 1998	
						LOEC		6,1					
						CL20		15					
						CL50		57					
					Mortalité (adultes)	NOEC	n.d.	250					
						LOEC		710					
						CL20		116					
						CL50		436					
<i>Hyalella azteca</i>	<i>U_{naturel}</i>	Sédiment	Naturel	28 jours	Mortalité (juvéniles)	CL50	0,01	4,61	6,91	n.d.	n.d.	Alves et al., 2008	
							0,05	6,51	7,16				
							0,04	9,33	7,23				
							0,20	10,74	7,58				
							0,13	5,29	7,97				
							0,66	12,79	7,93				
							>0,71	>14,08	8,00				
						Mortalité (adultes)	CL50	0,04	5,54	6,91			
								0,02	5,54	7,16			
								0,03	5,54	7,23			
								0,05	5,70	7,58			
								0,09	11,31	7,97			
								1,04	9,54	7,93			
	2,07	13,13	8,00										

					<i>Croissance (juvéniles)</i>	CE25	0,01 0,02 0,03 0,06 0,04 0,59 0,26	<i>n.d.</i>	6,91 7,16 7,23 7,58 7,97 7,93 8,00			
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>U_{naturel}</i>	<i>Sédiment</i>	<i>Naturel</i>	<i>12 jours</i>	<i>Mortalité</i>	NOEC LOEC CL50	<i>n.d.</i>	248 599 2910	8,00	152	<i>n.d.</i>	<i>Terrail et al., 2008</i>
					<i>Autotomie</i>	NOEC LOEC CE50	<i>n.d.</i>	1297 3340 3580				
					<i>Biomasse</i>	NOEC LOEC	<i>n.d.</i>	1297 3340				
<i>Chironomus riparius</i>	<i>U_{naturel}</i>	<i>Sédiment</i>	<i>Artificiel</i>	<i>10 jours</i>	<i>Mortalité</i>	NOEC LOEC CL20 CL50	<i>n.d.</i>	2,97 6,07 2,49 5,30	[6,75- 7,76]	<i>Nd</i>	<i>n.d.</i>	<i>Dias et al., 2008</i>
					<i>Temps de développement</i>	NOEC LOEC	<i>n.d.</i>	2,97 6,07				
					<i>Croissance</i>	NOEC LOEC	<i>n.d.</i>	- 2,97				

n.d. : non disponible.

NOEC (*Non Observable Effect Concentration*) : concentration la plus forte pour laquelle on ne détecte aucun effet significatif du traitement.

LOEC (*Lowest Observable Effect Concentration*) : concentration la plus faible pour laquelle on détecte un effet significatif du traitement.

CLx : concentration pour laquelle on observe X% de mortalité.

CEx : concentration pour laquelle on observe X% d'effet.

En 2005, Sheppard *et al.* ont réalisé une synthèse des données écotoxiques sur l'uranium disponibles dans la littérature, dans le but de calculer pour chaque type d'espèce, autres que l'être humain (plantes et autres espèces terrestres, plantes aquatiques, organismes aquatiques pélagiques et invertébrés benthiques) une valeur de PNEC (*Predicted Non Effect Concentration*). Concernant l'écotoxicité de l'uranium contenu dans des sédiments vis-à-vis des macro-invertébrés benthiques, seules trois études ont été répertoriées (BEAK International Incorporated, 1998 ; Liber, 2010 in preparation ; Thompson *et al.*, 2005).

La première étude concernait le taux de survie chez l'amphipode épi-benthique *Hyaella azteca* après 14 jours d'exposition à un sédiment naturel contaminé artificiellement à l'uranium (BEAK International Incorporated, 1998). Les valeurs de CL50 (concentration provoquant 50% de mortalité) calculées étaient pour les juvéniles et les adultes, respectivement de 57 et 436 $\mu\text{g U g}^{-1}$ de sédiment (poids sec).

Dans un autre travail, des larves de *Hyaella azteca* et de *Chironomus tentans* ont été exposées pendant dix jours à un sédiment naturel contaminé essentiellement à l'uranium (Liber, 2010 in preparation). La toxicité du sédiment a été évaluée par la mesure de croissance en comparaison à un sédiment témoin, et a permis de mettre en évidence pour le sédiment contaminé à 512 $\mu\text{g U g}^{-1}$ de sédiment (poids sec) une inhibition de croissance pour *H. azteca*, et *C. tentans* respectivement de 48% et 68%.

Enfin, la troisième étude portait sur une évaluation de la toxicité de l'uranium à partir de données de terrain (Thompson *et al.*, 2005). Pour l'estimation de la toxicité de l'uranium présent dans le compartiment sédimentaire, vis-à-vis des invertébrés benthiques, devant l'insuffisance de données écotoxicologiques, les auteurs ont déterminé des « concentrations de dépistage », qui correspondent à une estimation de la concentration maximale d'un contaminant qui peut être tolérée par une proportion donnée d'espèces benthiques. A partir de données de surveillance environnementale de sites miniers uranifères au Canada (*i.e.* concentration en uranium dans des sédiments et données sur les communautés d'invertébrés benthiques), la dose minimale ayant un effet (DME)

ainsi que le niveau d'effet grave (NEG) ont été calculés. En se basant sur des données récoltées dans le nord du Saskatchewan et les régions d'Elliot Lake et Bancroft (Ontario, Canada), les auteurs ont calculé des DME et des NEG, puis fixé une valeur estimée sans effet observé de $104 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec. C'est à partir de cette valeur que Sheppard *et al.* (2005) ont déterminé une PNEC sédiment de $100 \mu\text{g U g}^{-1}$ (poids sec) pour les invertébrés benthiques.

Depuis la revue de Sheppard *et al.* (2005), d'autres études sont venues apporter de nouveaux éléments quant à la toxicité d'un sédiment contaminé à l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques. Dias *et al.* (2008) ont réalisé un bioessai de dix jours sur des larves de *Chironomus riparius* exposées à un sédiment artificiel contaminé à l'uranium. Des effets significatifs sur la survie, le temps de développement et la croissance ont été détectés à de très faibles concentrations, respectivement $6,07$ (CL50 = $5,30 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec), $6,07$, et $2,97 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec. De tels niveaux de toxicité ont également été mesurés chez *Hyaella azteca*, placées dans différentes qualités d'eau et de sédiment, avec des CL50s après 28 jours d'exposition inférieures à $15 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids (Alves *et al.*, 2008). Ces valeurs sont très en deçà de la valeur de PNEC calculé par Sheppard *et al.* (2005).

Notons enfin les travaux de Terrail *et al.* (2008) sur une espèce d'oligochète très polluo-résistante, *Tubifex tubifex*, qui après 12 jours d'exposition montrent des effets toxiques pour des concentration supérieures à $599 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec (CL50 = $2910 \mu\text{g U g}^{-1}$ poids sec).

L'ensemble de ces résultats confirment la grande variabilité des réponses d'écotoxicité de l'uranium présent dans le sédiment selon les conditions, et les espèces de macro invertébrés benthiques considérées. Cependant, elles démontrent que des concentrations en uranium environnementalement réalistes peuvent engendrer des effets toxiques. Des études *in situ* ont d'ailleurs mis en évidence cette ecotoxicité (Kuhne *et al.*, 2002 ; Peck *et al.*, 2002 ; Antunes *et al.*, 2007). Notons que pour la plupart de ces études, à de rares exceptions, c'est la mortalité qui a été utilisée comme critère d'écotoxicité. Or comme le

démontre les travaux de Dias *et al.* (2008), ainsi que ceux de Terrail *et al.* (2008), l'utilisation de critères subléthaux (ex : croissance, malformations, temps de développement), généralement plus sensibles, permettraient une meilleure compréhension, et par conséquent une meilleure évaluation du risque lié à l'exposition des macro invertébrés benthiques à des sédiments contaminés à l'uranium. D'autant plus qu'il est connu que tout effet négatif sur certains de ces critères subléthaux peut avoir de grandes conséquences sur la dynamique de population (Forbes *et al.*, 2001).

Objectifs

L'uranium est un métal qui peut s'accumuler et persister en forte quantité dans les écosystèmes aquatiques, en particulier dans le compartiment sédimentaire. Les invertébrés benthiques sont donc particulièrement exposés à ses effets potentiellement toxiques. En réponse à un tel stress, la mise en place de mécanismes adaptatifs se traduirait par un maintien de la *fitness* de la population dans les nouvelles conditions de milieu. En l'absence de réponse adaptative, la population pourrait tout simplement s'éteindre. Comme déjà démontré sur d'autres métaux, l'uranium peut donc représenter un facteur élevé de sélection naturelle à un niveau local.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été d'étudier la réponse adaptative d'une population d'invertébré benthique (*Chironomus riparius*) exposée à un sédiment contaminé à l'uranium.

Pour cela, quatre expériences ont été réalisées afin de répondre à quatre objectifs spécifiques.

Objectif 1 : Caractériser les effets d'une exposition à un sédiment contaminé à l'uranium sur la survie, la croissance et le développement des larves.

L'étude des réponses adaptatives d'une population exposée à un toxique implique des conditions stressantes. La toxicité de l'uranium est fortement influencée par les conditions physico-chimiques du milieu. Par conséquent, il est nécessaire en premier lieu de déterminer les concentrations sublétales induisant une toxicité suffisante pour entraîner une diminution significative de la *fitness* des individus sans néanmoins engendrer une trop forte mortalité ($\leq 50\%$).

Ainsi un bioessai de sept jours a été réalisé sur des larves de *Chironomus riparius* exposées à un sédiment contaminé à l'uranium (*c.f.* Expérience 1: Effets de l'uranium sur les larves de chironome, p.64). Au cours de ce bioessai, différents traits

phénotypiques ont été mesurés sur les larves (survie, temps de développement, taille, malformations) afin de déterminer des seuils de toxicité. Dans le cas d'une exposition à des métaux, une concentration \geq LOEC (concentration la plus basse pour laquelle un effet significatif a été observé), pour le trait étudié, peut entraîner une réponse adaptative de la population (pour une revue, voir Posthuma et Van Straalen, 1993).

Ces différents seuils de toxicité obtenus selon les traits phénotypiques mesurés ont servi à fixer la gamme de concentrations qui a été utilisée lors de l'expérience suivante.

Objectif 2 : Étudier les réponses adaptatives d'une population soumise pendant plusieurs générations à un sédiment contaminé à différentes concentrations en uranium.

Notre hypothèse est que l'intensité de sélection induite par l'uranium est proportionnelle à sa concentration dans le milieu. Plus la concentration en uranium sera élevée, plus la réponse des traits soumis à la sélection sera grande.

Pour cela, nous avons réalisé une expérience de sélection naturelle en laboratoire (*c.f.* Expérience 2: Modifications phénotypiques d'une population exposée à l'uranium pendant huit générations, p.97). Des populations de même origine ont été exposées à différentes concentrations d'uranium. Plusieurs traits phénotypiques – principalement des traits d'histoire de vie – ont été mesurés sur les adultes à chaque génération. Dans un premier temps, les résultats obtenus lors de la première génération ont permis de caractériser les effets de l'uranium au niveau des adultes. Dans un second temps, la réponse adaptative a été quantifiée grâce au suivi des modifications phénotypiques au fil des générations.

Si l'uranium joue un rôle important dans la sélection, agissant sur les populations exposées – sélection de nature forte et directionnelle – et qu'au sein de nos populations il existe des différences de tolérance génétiques, des mécanismes adaptatifs devraient conduire à une amélioration progressive de la *fitness* moyenne des individus au fil des générations, par sélection des individus les plus tolérants.

Objectif 3: Évaluer le niveau de tolérance à l'uranium des populations après plusieurs générations d'exposition.

Comme décrit précédemment, la sélection par les métaux lourds est considérée comme directionnelle, continue et forte. En réponse à cette sélection, les populations exposées sont susceptibles de voir leur niveau de tolérance moyen à l'uranium augmenter.

Au cours de l'expérience 2, nous avons pu comparer la réponse adaptative des populations en fonction de la concentration d'exposition. Nous avons posé comme hypothèse que l'intensité de sélection, induite par l'uranium, était proportionnelle à la concentration d'exposition, et qu'elle favoriserait les individus les plus tolérants. Ainsi, nous avons testé une autre hypothèse : à la sixième génération, les individus sont d'autant plus tolérants à l'uranium, que les concentrations d'exposition en uranium des générations précédentes sont importantes.

Afin de relier les modifications phénotypiques mesurées lors de l'expérience 2 à l'acquisition de tolérance chez les populations exposées à l'uranium, le niveau de tolérance des individus de la sixième génération a été évalué à l'aide d'un test de toxicité aiguë à l'uranium (*c.f.* Expérience 3: conséquences d'une pré exposition à l'uranium sur le niveau de tolérance d'une population de *Chironomus riparius*, p. 187). La mise en évidence d'une acquisition de tolérance serait la preuve du rôle majeur de l'uranium dans la sélection survenue lors de l'expérience 2.

Objectif 4: Mettre en évidence des divergences génétiques entre les populations de l'expérience 2 après six générations d'exposition à un sédiment contaminé à l'uranium.

Dans l'hypothèse où une sélection directionnelle et forte s'est opérée sur les populations exposées à l'uranium, les pressions de sélection ont été différentes entre le traitement contrôle et les traitements « uranium ». De fait, des divergences génétiques ont pu apparaître entre ces populations.

Afin de mettre en évidence ces divergences génétiques entre les populations, une expérience de jardin commun a été réalisée sur la sixième génération de l'expérience 2 (*c.f.* Expérience 4: conséquences génétique d'une pré exposition à l'uranium, p.197). Toutes les populations ont été placées dans un même environnement non contaminé et leur phénotypes ont été comparés afin de mettre en évidence des divergences génétiques. De par l'origine commune des populations et leur histoire de vie différente au cours de l'expérience 2, toute différence phénotypique significative aura une valeur adaptative, et sera la preuve qu'une adaptation génétique a eu lieu.

De plus, la plupart des traits phénotypiques mesurés étant des traits d'histoire de vie, un éventuel coût en terme de *fitness* de l'éventuelle augmentation de tolérance des populations exposées à l'uranium pourra être détectée, si ces populations présentent en milieu non contaminé une *fitness* inférieure à celle de la population contrôle.

Dans ce qui suit, chaque expérience fait l'objet d'un chapitre organisé selon la forme classique d'une publication.

Expérience 1: Effets de l'uranium sur les larves de chironome

1.Introduction

Les écosystèmes aquatiques continentaux peuvent être particulièrement exposés à la contamination par l'uranium. Comme la plupart des métaux, l'uranium tend à s'accumuler dans le compartiment sédimentaire des écosystèmes aquatiques (Ribera *et al.*, 1996). Si le bruit de fond naturel dans les sédiments d'eau douce est estimé inférieur à $10 \mu\text{g U g}^{-1}$ de sédiment (poids sec), des valeurs bien supérieures ont été relevées dans différents sédiments impactés par l'activité minière actuelle ou passée, allant jusqu'à plus de mille fois le bruit de fond (Swanson, 1985 ; Lottermoser *et al.*, 2005 ; Lozano *et al.*, 2002 ; Mc Kee *et al.*, 1987 ; Joshi *et al.*, 1989 ; IRSN, 2007 ; Neame *et al.*, 1982 ; Hart *et al.*, 1986).

Sachant que le compartiment sédimentaire sert d'habitat pour de nombreuses espèces animales et végétales, s'interroger sur les effets toxiques de telles concentrations sur ces espèces est une question légitime. Leur présence dans des sédiments contaminés à l'uranium fait qu'ils sont susceptibles de subir des effets toxiques de l'uranium présent dans le compartiment sédimentaire et/ou la colonne d'eau.

Jusqu'à présent, très peu de données existent sur l'écotoxicité de sédiment contaminé à l'uranium vis-à-vis des macro-invertébrés benthiques (*c.f.* §3.3.53. Toxicité de l'uranium vis à vis des invertébrés benthiques , p.53). Néanmoins l'ensemble de ces résultats confirment la grande variabilité des réponses d'écotoxicité de l'uranium présent dans le

sédiment selon les conditions, et les espèces de macro-invertébrés benthiques considérées. Elles démontrent aussi que des concentrations en uranium environnementalement réalistes peuvent engendrer des effets toxiques.

Comme tout stress environnemental, la présence d'uranium dans le milieu ne peut jouer un rôle majeur dans le processus de sélection naturelle qu'au delà d'une concentration entraînant une diminution significative de la *fitness* des individus (Posthuma et Van Straalen, 1993; Bijlsma et Loeschcke, 2005). L'action de la sélection naturelle va alors conduire à un tri des organismes susceptibles de modifier les caractéristiques phénotypiques et génétiques de la population, et réduire l'impact du stress (*c.f.* §2.1. Stress environnemental et mécanismes adaptatifs , p.16).

Dans le contexte de cette thèse visant à étudier la réponse adaptative d'une population d'invertébré benthique exposée à un sédiment contaminé à l'uranium, il est nécessaire, en premier lieu, de déterminer dans nos conditions d'exposition, les concentrations induisant une toxicité suffisante pour entraîner une diminution significative de la *fitness* des individus sans néanmoins engendrer une trop forte mortalité.

Ainsi un bioessai de sept jours a été réalisé sur des larves de *Chironomus riparius* exposées à un sédiment contaminé à l'uranium. Au cours de ce bioessai, différents traits phénotypiques liés à la survie, la croissance, et le développement des larves ont été mesurés afin de déterminer des seuils de toxicité.

2. Matériels et méthodes

2.1. Origine des organismes

La souche de *Chironomus riparius* (pour une description de la biologie et de l'écologie de l'espèce, *c.f.* Annexe 1) a pour origine un croisement de plusieurs souches de laboratoire. Elle se caractérise par une grande diversité génétique (analyse par marqueurs microsatellites, C. Nowak, communication personnelle). Cette souche a été maintenue pendant quatre générations au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (Cadarache, France), dans des conditions respectant les normes standards (Environnement Canada, 1997 ; EPA, 2000 ; OECD, 2001 ; AFNOR, 2004).

2.2. Contamination du sédiment

Un sédiment artificiel a été employé pour toutes les expériences. Sa composition est (en poids sec) à 88% de sable de Fontainebleau (granulométrie comprise entre 150 et 300 µm), et à 12% d'alpha-cellulose. Sa contamination s'est faite dans des récipients en plastique par contact avec une colonne d'eau synthétique (voir tableau 6 pour sa composition), en respectant un ratio en volume eau/sédiment de 1/1.

Tableau 6. Composition de l'eau synthétique utilisée pour la contamination du sédiment ainsi que pour toutes les expériences (d'après AFNOR, 2004).

<i>Sel</i>	<i>Concentration (mg L⁻¹)</i>
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	66,2
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	61,4
<i>NaHCO₃</i>	96
<i>KCl</i>	4
<i>CaSO₄·2H₂O</i>	63
<i>NaBr</i>	1
<i>pH</i>	8,0 ± 0,2
<i>Conductivité</i>	350 ± 60 μS cm ⁻¹ à 25°C
<i>Dureté</i>	110 ± 30 mg CaCO ₃ L ⁻¹

En fonction de la quantité de sédiment et du niveau de contamination, un volume d'une solution mère de nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 g U L^{-1}) a été ajouté (tableau 7). Pour permettre la sorption de l'uranium par le sédiment artificiel, le temps de contact du sédiment avec la colonne d'eau contaminée a duré sept jours à température ambiante, avec trois mélanges manuels quotidiens.

Tableau 7. Caractéristiques de la contamination du sédiment artificiel destiné à l'expérience 1.

<i>Traitement</i>	<i>Concentration nominale ($\mu\text{g U g}^{-1} \text{ps}$)</i>	<i>Quantité de sédiment à contaminer (g ps)</i>	<i>Volume de solution mère ajouté (mL)</i>
<i>U0</i>	<i>0</i>	<i>400</i>	<i>0,00</i>
<i>U1</i>	<i>32</i>	<i>400</i>	<i>1,30</i>
<i>U2</i>	<i>64</i>	<i>400</i>	<i>2,60</i>
<i>U3</i>	<i>128</i>	<i>400</i>	<i>5,12</i>
<i>U4</i>	<i>256</i>	<i>400</i>	<i>10,24</i>
<i>U5</i>	<i>512</i>	<i>400</i>	<i>20,48</i>
<i>U6</i>	<i>1024</i>	<i>400</i>	<i>40,96</i>

Le niveau de contamination a été mesuré après sept jours, par dosage à l'ICP-AES (limite de détection : $5 \mu\text{g U L}^{-1}$) de la quantité d'uranium restant dans la colonne (prélèvement de 10 mL, filtré à $0,45 \mu\text{m}$, puis acidifié à 2% d' HNO_3). La quantité d'uranium présent dans le sédiment a été calculée grâce à un bilan de masse, en négligeant l'uranium adsorbé sur les parois du récipient (Dias *et al.*, 2008).

2.3. Plan expérimental

Quatre jours avant le début de l'exposition des organismes, la colonne d'eau présente dans chaque récipient de contamination a été retirée. Le sédiment humide a alors été homogénéisé et distribué dans des bâteaux de 400 mL (80 mL de sédiment – 60 g ps ; cinq répliquats par traitement). Un volume de 310 mL a été ajouté de manière à avoir un rapport en hauteur sédiment/colonne d'eau de 1/4. Tous les bâteaux ont ensuite été placés de manière aléatoire dans un incubateur à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une photopériode de 16h jour : 8h nuit (Environnement Canada, 1997 ; EPA, 2000 ; AFNOR, 2004). Une légère aération de la colonne d'eau a été maintenue tout au long de l'expérience. Des ajouts d'eau synthétique ont permis de maintenir le niveau d'eau constant au cours des sept jours d'exposition.

Au premier jour d'exposition (J0), dix larves *Chironomus riparius* âgées de 48h ont été introduites dans chaque bâteau. Tous les bâteaux ont reçu $0,2 - 0,4 - 0,6 \text{ mg larve}^{-1}$ de nourriture (Tétramin®, Allemagne) respectivement à J0 et J1, J2 et J3, J4 à J6, soit des conditions de nourriture *ad libitum* (A. Pery, communication personnelle). A J7, dernier jour d'exposition, les larves survivantes ont été prélevées et préservées dans 70% d'éthanol.

La température, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés dans chaque bâteau à J0 et J7. Un prélèvement d'eau de 10 mL a également été effectué les mêmes jours dans chaque bâteau, filtré ($0,45 \mu\text{m}$) puis acidifié (2% HNO_3), et stocké à 4°C jusqu'au dosage de l'uranium.

Pour tous les échantillons d'eau, la concentration en uranium a été mesurée par ICP-AES, avec une limite de détection de 5 $\mu\text{g U L}^{-1}$.

2.4. Mesures biologiques

Après sept jours d'exposition, la survie, le temps de développement, la croissance, ainsi que les malformations au niveau des pièces buccales ont été étudiés.

Le pourcentage moyen de survie a été calculé à la fin de l'expérience par chaque traitement.

Les effets de l'uranium sur le temps de développement des larves ont été évalués grâce à la mesure de **largeur de capsule céphalique**. En effet, la capsule céphalique des chironomes ne grandit qu'au cours des mues que séparent les stades larvaires. Une larve avec une largeur de capsule céphalique comprise entre 430 et 600 μm a atteint le quatrième stade, entre 260 et 400 μm le troisième stade, entre 130 et 240 μm le second stade (Environnement Canada, 1997). Cette mesure permet donc de déterminer le stade atteint par la larve au bout de sept jours (Environnement Canada, 1997 ; Watts *et al.*, 2003). Ainsi les larves prélevées ont été décapitées. La capsule céphalique a ensuite été placée sur une lame de microscope, face ventrale, afin d'en mesurer la largeur à l'aide d'une loupe binoculaire reliée à une caméra et un ordinateur muni d'un logiciel d'analyse d'image (NIH image program : <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Pour chaque traitement a été calculée la largeur moyenne de la capsule céphalique des larves survivantes.

La mesure de **la longueur de larves** a permis d'évaluer les effets de l'uranium sur leur croissance après sept jours d'exposition. La longueur des larves survivantes a été mesurée après un montage sur lame de microscope, juste avant la décapitation. La longueur moyenne des larves survivantes a été calculée pour chaque traitement (Environnement Canada, 1997).

Pour l'étude des **malformations des pièces buccales**, après la mesure de sa largeur, la capsule céphalique a été éclaircie à l'aide d'un bain d'une solution à 10% de KOH à 95°C pendant dix minutes, puis déshydratée à l'éthanol à 95% (Watts *et al.*, 2003). La capsule céphalique a ensuite été montée face ventrale sur une lame de microscope à l'aide d'Eukitt® (Carlo Erba, Italie). L'identification des malformations sur les pièces buccales s'est faite à l'aide d'un microscope de faible grossissement (10x à 40x). L'analyse des malformations s'est basée sur le système de score décrit par Vermeulen *et al.* (1998). Chaque dent du mentum et des mandibules a été divisée en quatre parties. Le nombre d'unité malformée a servi de score (figure 4).

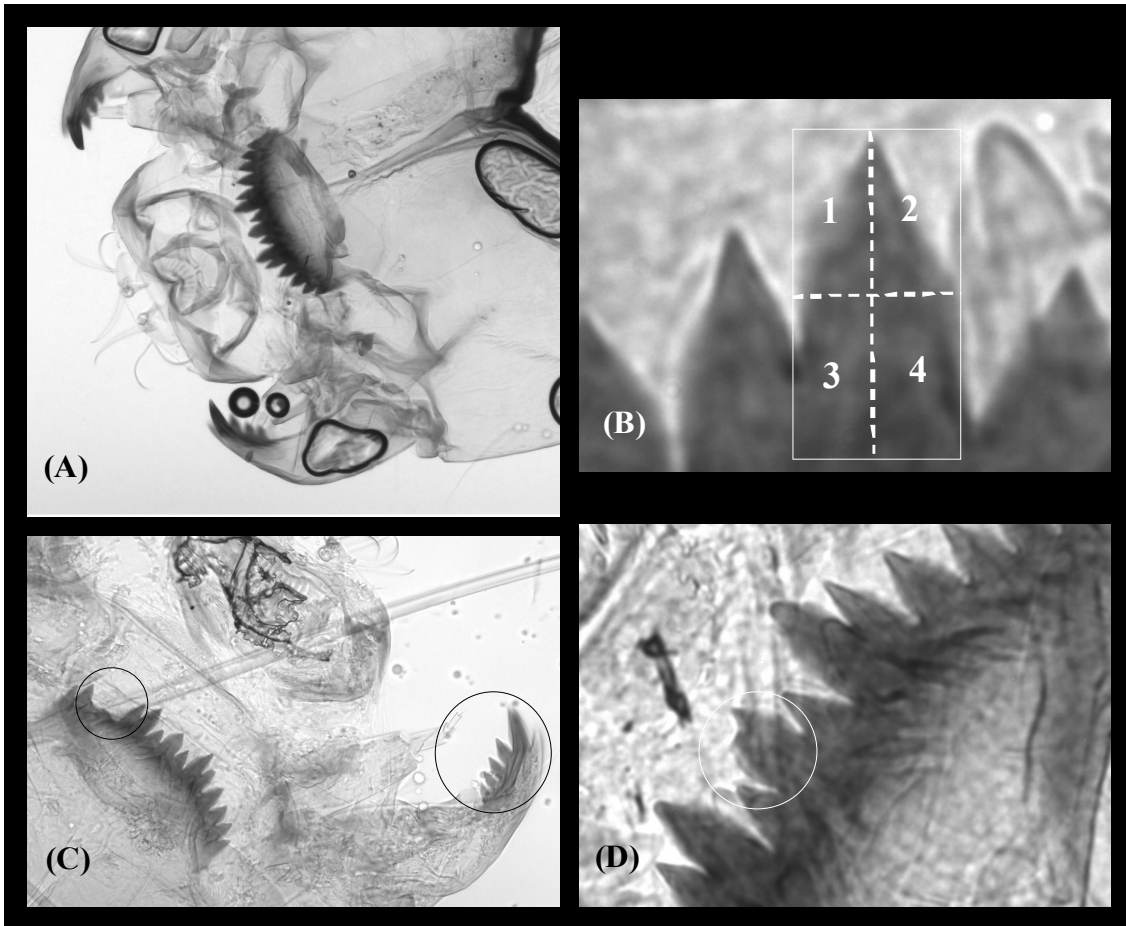


Figure 4. Mesures des malformations des pièces buccales chez des larves *Chironomus riparius*. (A) Pièces buccales ne présentant aucune malformation. (B) Photo illustrant la division des dents en quatre parties, et servant de base au système de score des malformations (d'après Vermeulen et al., 1998). (C) Score du mentum = 8 (2 dents entières manquantes); score des mandibules = 4 (une dent surnuméraire). (D) score de la dent = 1.

Pour chaque stade larvaire et chaque traitement, deux indices de malformation ont été calculés : (i) le pourcentage de larves malformées (score ≥ 1 au niveau du mentum ou des mandibules) ; (ii) l'intensité des malformations, c'est à dire le score moyen des larves malformées (Vermeulen *et al.*, 1998).

2.5. Analyses statistiques

Après vérification de la normalité ainsi que de l'homogénéité de variance des données, les différences entre les traitements pour toutes les mesures biologiques ont été calculées par des analyses de variances à un facteur, suivie d'un test de Tukey pour les comparaisons deux à deux (Zar, 1999). Le pourcentage de survie, et le pourcentage de larves malformées ont préalablement subi une transformation arc-sinus et racine carré. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), en prenant comme seuil de signification 5%.

En complément, afin d'estimer les concentrations pour laquelle on mesure 50% d'effet (CE50) pour la survie et la croissance, un modèle logistique a été ajusté sur ces données en fonction de la concentration en uranium présent dans le sédiment sec à l'aide du logiciel R et du package DRC (Ritz et Streibig, 2005).

3.Résultats

Les résultats de la contamination du sédiment artificiel, ainsi que le suivi physico-chimique au cours des sept jours d'exposition sont décrits en annexe 2. Les analyses statistiques sur les données physico-chimiques n'ont révélé aucune différence significative entre les traitements (ANOVA, $p > 0,05$). Par simplification, chaque traitement est référencé selon la concentration nominale en uranium présent dans le sédiment sec.

3.1.Survie

Après sept jours d'exposition, le pourcentage moyen de survie a été de 78% dans le traitement contrôle ($0 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps ; figure 5, tableau 8). Le pourcentage de survie a diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium, jusqu'à atteindre 0% dans le plus fort traitement ($1024 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps).

Tableau 8. Synthèse des mesures biologiques (moyenne \pm ES) obtenues lors de l'expérience 1 sur des larves de *Chironomus riparius* après sept jours d'exposition à un sédiment contaminé à l'uranium.

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}\text{ ps}$)	Survie	Temps de développement ²			Croissance	Malformations	
	% de survie ¹	Largeur moyenne de capsule céphalique (μm) ¹	% de stade 2	% de stade 3	% de stade 4	Longueur moyenne des larves (mm) ¹	% de larves malformées ¹
0	78 \pm 7 (a)	386 \pm 13 (a)	-	74,5	25,6	7,7 \pm 0,1 (a)	29 \pm 2 (a,b,e)
32	66 \pm 5 (a,b)	368 \pm 12 (a,b)	-	87,5	12,5	7,8 \pm 0,1 (a)	63 \pm 11 (a,b,c,d,e)
64	84 \pm 7 (a)	349 \pm 6 (b,c)	-	100	-	7,7 \pm 0,1 (a)	72 \pm 4 (b,c,d)
128	76 \pm 5 (a,c)	336 \pm 3 (b,c)	-	100	-	7,3 \pm 0,1 (a)	76 \pm 4 (b,c,d)
256	68 \pm 11 (a,d)	325 \pm 4 (c)	3,1	96,9	-	6,1 \pm 0,2 (b)	28 \pm 18 (a,b,e)
512	48 \pm 4 (b,c,d)	247 \pm 4	52,9	47,1	-	3,8 \pm 0,1 (c)	0 (a,e)
1024	0	-	-	-	-	-	-
CL50 ($\mu\text{g U } 562$ (IC95%: 470-655) $\text{g}^{-1}\text{ ps}$)					CE50	377 (IC95%: 154-601) longueur	

¹ Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les traitements (test de Tukey; $p < 0,05$).

² Les pourcentages de larves survivantes ayant atteint les stades larvaires 2, 3, et 4, ont été calculés à partir des mesures de largeur de capsule céphalique (Environnement Canada, 1997).

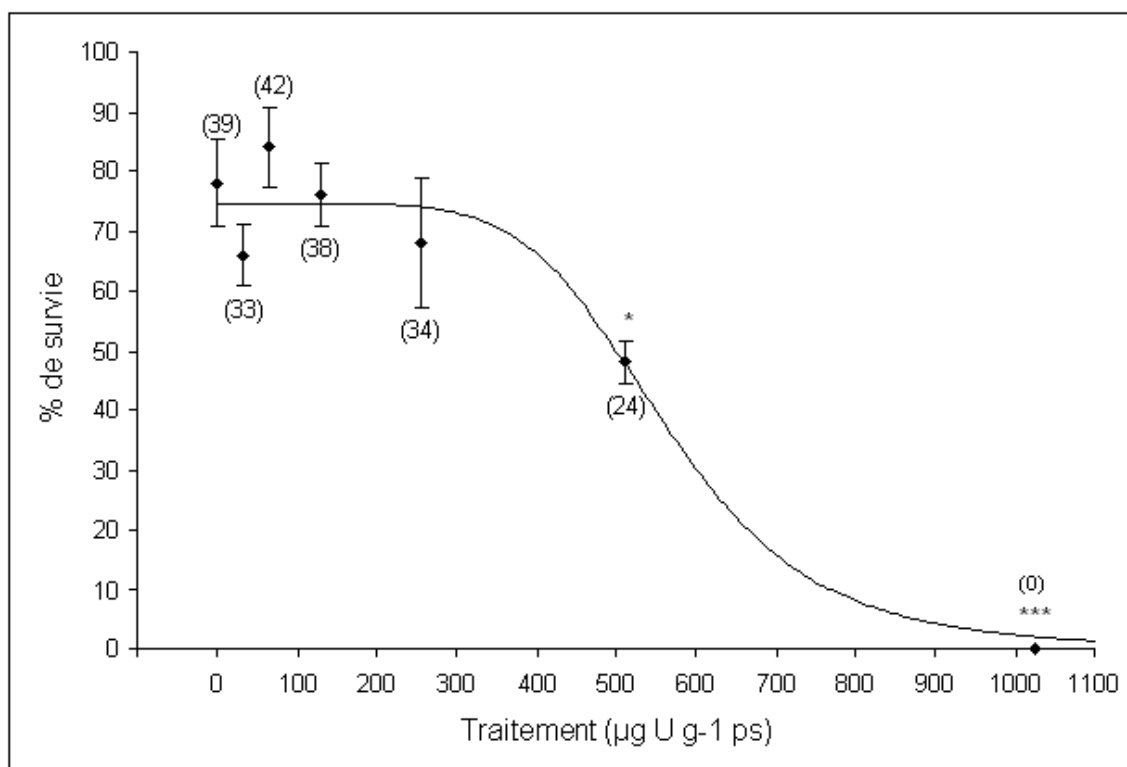


Figure 5. Effet de l'uranium sur le pourcentage de survie (moyenne \pm ES) après sept jours d'exposition. Le nombre total de larves survivantes est indiqué entre parenthèses. * et *** indiquent que le traitement est significativement différent du traitement contrôle ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) respectivement au seuil 5% et 0,1%. La courbe représente le modèle logistique ajusté.

L'analyse ANOVA a révélé un effet significatif du traitement sur le pourcentage de survie ($F_{6,28} = 20,83$; $p < 0,001$). Le pourcentage de survie a significativement diminué à partir du traitement $512 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, où le pourcentage de survie est de 48% (figure 5). L'ajustement d'un modèle logistique aux données a permis de calculer une CL50 de $562 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 8).

3.2. Temps de développement

Au bout de sept jours, la largeur moyenne de la capsule céphalique des larves survivantes dans le traitement contrôle ($0 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps) était de $386 \mu\text{m}$ (tableau 8, figure 6). Le traitement a eu un effet significatif sur la largeur de capsule céphalique (ANOVA : $F_{5,193} = 19,88$; $p < 0,001$). En effet, celle-ci a diminué de manière significative avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, jusqu'à atteindre une valeur moyenne de $247 \mu\text{m}$ dans le traitement $512 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 6).

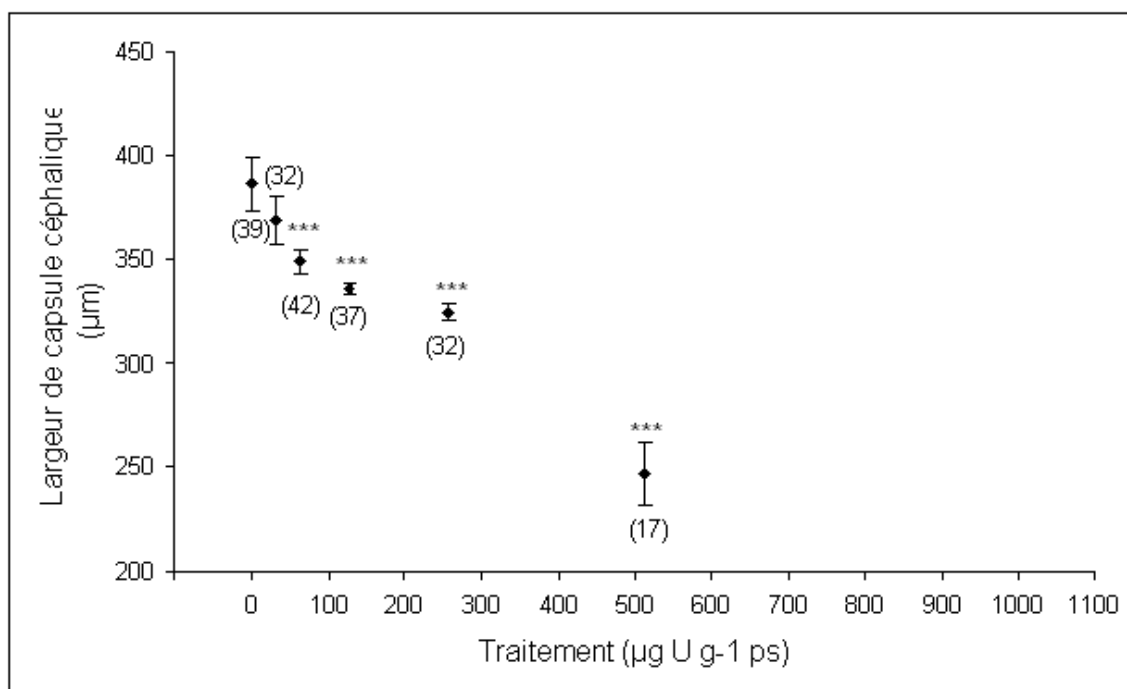


Figure 6. Effet de l'uranium sur la largeur de capsule céphalique (moyenne \pm ES) des larves survivantes après sept jours d'exposition. Le nombre de larves mesurées est indiqué entre parenthèses. *** indique que le traitement est significativement différent du témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ps}$) au seuil 0,1%.

Dans le traitement contrôle ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$), le pourcentage de larve ayant atteint le troisième et quatrième stade larvaire était respectivement de 74,5% et 25,6%. Dans le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$, le pourcentage de larve ayant atteint le troisième et quatrième stade larvaire était respectivement de 87,5% et 13,5%. Dans les traitements 64 et $128 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$, 100% des larves survivantes étaient au troisième stade larvaire. Dans les traitements 256 et $512 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ respectivement 3,2% et 52,9% des larves n'ont pas atteint le troisième stade (tableau 8).

3.3.Croissance

La longueur moyenne des larves survivantes après sept jours dans le traitement $0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ a été de 7,7 mm (tableau 8, figure 7). Le traitement a eu un effet significatif (ANOVA : $F_{5,201} = 99,62$; $p < 0,001$), avec une diminution significative de la longueur des larves à partir du traitement $256 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$. Une $CE50_{\text{longueur}}$ de $377 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ a été calculé (tableau 8).

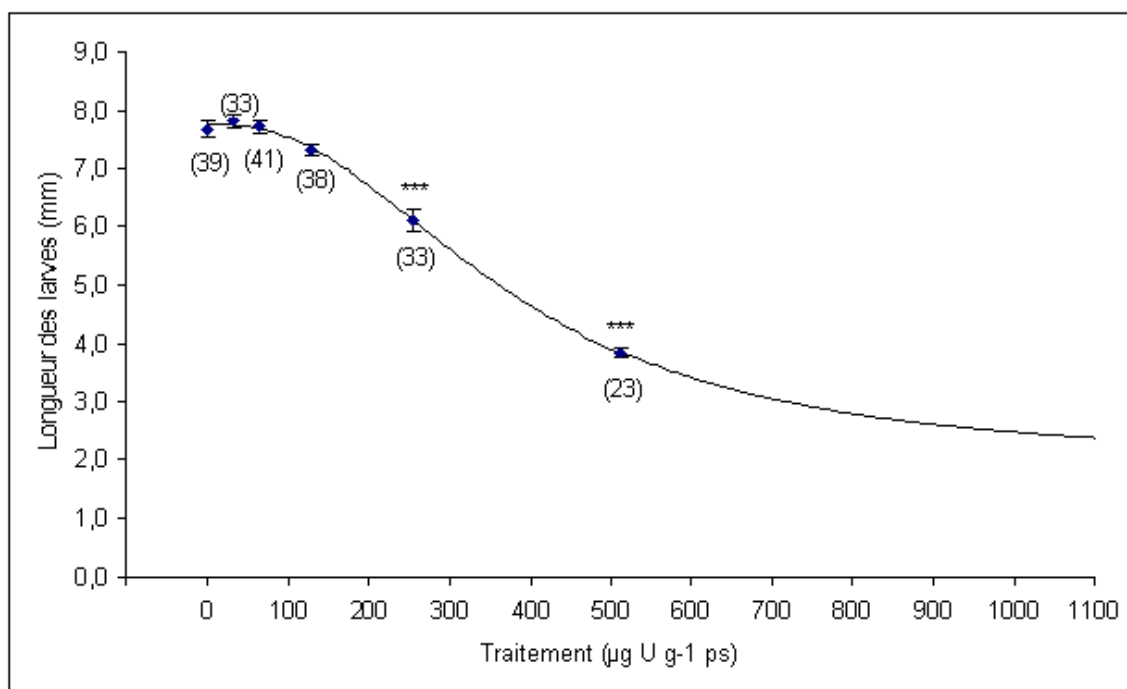


Figure 7. Effet de l'uranium sur la longueur (moyenne \pm ES) des larves survivantes après sept jours d'exposition. Le nombre de larves mesurées est indiqué entre parenthèses. *** indique que le traitement est significativement différent du témoin (0 $\mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) au seuil 0,1%. La courbe représente le modèle logistique ajusté.

3.4. Pourcentage de larves malformées et intensité des malformations

Dans le traitement $0 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps après sept jours d'exposition, le pourcentage de larves malformées a été de 29% (tableau 8, figure 8). C'est dans le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps que le pourcentage moyen de larves malformées a été le plus élevé (76%). Dans le plus fort traitement où des larves ont survécu ($512 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps), aucune d'entre elles n'était malformée. Les analyses statistiques ont mis en évidence un effet significatif du traitement (ANOVA : $F_{5,22} = 8,80$; $p < 0,001$), avec une augmentation significative du pourcentage de larves malformées par rapport au traitement contrôle pour les traitements 64 et $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 8).

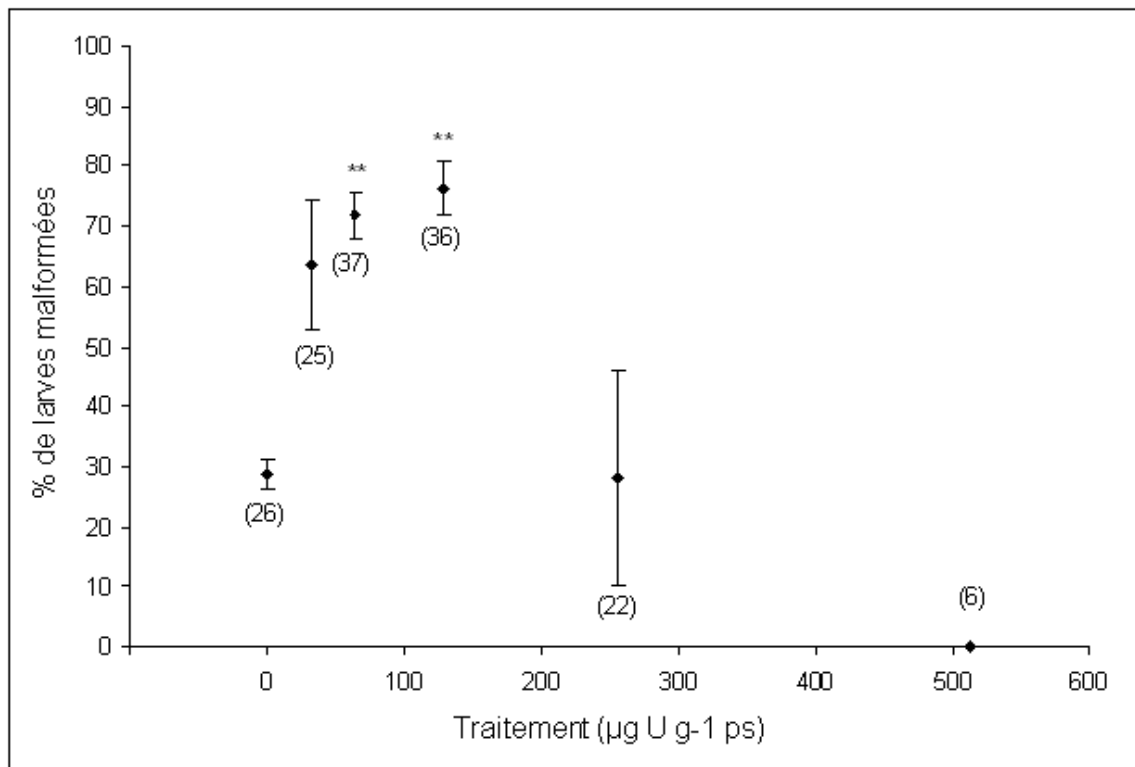


Figure 8. Effet de l'uranium sur le pourcentage de larves malformées (moyenne \pm ES) après sept jours d'exposition. Le nombre de larves mesurées pour chaque traitement est indiqué entre parenthèses. ** indique que le traitement est significativement différent du témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) au seuil 1%.

Les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence d'effet significatif du traitement sur l'intensité des malformations (ANOVA : $F_{4,82} = 1,61$; $p = 0,18$).

4. Discussion

L'expérience 1 a permis d'étudier les effets d'une exposition de sept jours à un sédiment contaminé à l'uranium sur la survie, le développement et la croissance de larves de *Chironomus riparius*. L'analyse de l'ensemble des mesures physico-chimiques décrit en annexe 2 a permis de considérer tous les effets biologiques observés comme la conséquence de la présence d'uranium dans le milieu, en considérant deux voies de contamination: le sédiment et la colonne d'eau. De plus, le pourcentage de survie des larves après sept jours dans le traitement contrôle supérieur à 70% a validé les conditions d'exposition (AFNOR, 2004).

4.1. Survie

Les résultats de survie ont montré un effet négatif du traitement pour des concentrations en uranium $\geq 512 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, traitement dans lequel 48% des larves introduites ont survécu (tableau 8; figure 5). Ce résultat ainsi que la CL50 de $562 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps sont très supérieures au seuil de létalité obtenu lors de précédents travaux sur les effets de l'uranium sur des larves de *Chironomus riparius* (Dias *et al.*, 2008). Dans cette première étude, nous avons mis en évidence un effet significatif de l'uranium sur la survie des larves après dix jours d'exposition, pour des concentrations en uranium $\geq 6,1 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (28% de survie; CL50 = $5,3 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps). Deux explications peuvent être données face à ces différences: (i) la diversité génétique plus faible de notre précédente souche (marqueurs micro-satellites, Carsten Nowak, communication personnelle); (ii) les conditions d'exposition différentes, synonymes de spéciation différente de l'uranium.

(i) En exposant à un sédiment contaminé au Cd des larves de *Chironomus riparius* issues de populations de diversité génétique différente, Nowak *et al.* (2007) ont observé chez les larves des performances de survie différentes entre les populations. Les larves issues d'une population très consanguine mouraient plus que celles issues d'une population non consanguine lorsqu'elles étaient soumises à une forte concentration en Cd. Dans notre cas, la souche qui a été utilisée pour toutes les expériences décrites

dans ce manuscrit présentait une diversité génétique supérieure à la précédente (Carsten Nowak, communication personnelle). Ainsi la plus grande diversité génétique pourrait expliquer en partie le seuil de létalité plus élevé dans la présente étude.

(ii) La toxicité de l'uranium va dépendre directement de sa biodisponibilité pour les organismes vivants. Or celle-ci est principalement liée à sa spéciation chimique, dans les écosystèmes aquatiques la forme uranyle présenteraient le plus grand risque pour les biocénoses (Colle *et al.*, 2001). De façon globale, la toxicité de l'uranium diminue avec l'augmentation du pH, de la dureté, de l'alcalinité, et/ou de la présence de ligands organiques dans les phases aqueuses (Ribera *et al.*, 1996; Labrot *et al.*, 1999; Franklin *et al.*, 2000; Markich *et al.*, 2000; Markich, 2002; Charles *et al.*, 2002; Denison, 2004; Sheppard *et al.*, 2005). Entre notre présente étude et la précédente, seule la composition de la colonne d'eau a été modifiée (Dias *et al.*, 2008; tableau 6). Cette différence a conduit à des conditions physico-chimiques différentes notamment en terme de pH, qui peuvent aussi expliquer en partie les seuils de toxicité différents.

Dans le cadre de ce travail de thèse aucune expérience a été réalisée afin de tester la validité de ces hypothèses pour expliquer les différences de toxicité entre ces deux expériences.

D'autres études se sont intéressées à l'effet létal d'une exposition à un sédiment contaminé à l'uranium sur des macro invertébrés benthiques. Une première étude a concerné le taux de survie chez l'amphipode épibenthique *Hyalella azteca* après 14 jours d'exposition à un sédiment naturel dopé à l'uranium (BEAK International Incorporated, 1998). Les CL50 calculées ont été pour des juvéniles et des adultes respectivement de 57 et 436 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Notons également les travaux de Terrail *et al.* (2008) sur une espèce d'oligochaete très polluo-résistante, *Tubifex tubifex*, qui après 12 jours d'exposition à un sédiment contaminé à l'uranium ont montré des effets toxiques pour des concentrations $\geq 599 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (CL50 = 2910 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps). Ces résultats confirment la grande variabilité des réponses d'écotoxicité de l'uranium présent dans le sédiment.

Dans notre étude, les résultats de survie des larves ont permis de fixer dans nos conditions expérimentales une gamme sublétale d'uranium comprise entre 0 et 256 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 8; figure 5).

4.2. Temps de développement

La largeur moyenne de la capsule céphalique a diminué avec l'augmentation de la concentration d'uranium présent dans le traitement de façon significative à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 8, figure 6), indiquant ainsi un retard de développement dû à l'uranium. Avec cette même mesure, d'autres études ont précédemment montré que l'exposition à certains polluants pouvait entraîner chez *Chironomus sp* une augmentation du temps de développement (ex: Hg et Pb (Vermeulen *et al.*, 2000); 17 alpha-ethinylestradiol et bisphenol A (Watts *et al.*, 2003); As (Martinez *et al.*, 2006); uranium (Dias *et al.*, 2008)). Dans notre traitement contrôle, 25,6% des larves survivantes ont atteint le quatrième stade larvaire, et 74,5% le troisième (tableau 8). Le pourcentage de larve ayant atteint le quatrième stade a diminué jusqu'à atteindre 0% au traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, où toutes les larves survivantes ont été au troisième stade. Au traitement 512 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, 52,9% des larves survivantes n'ont pas encore atteint le troisième stade. La largeur moyenne de capsule céphalique a diminué à mesure que la proportion de larve au troisième puis deuxième stade a augmenté (tableau 8, figure 6). L'exposition de larves de *Chironomus riparius* à l'uranium a entraîné un retard de développement, résultat déjà obtenu lors de nos précédents travaux (Dias *et al.*, 2008).

4.3. Croissance

La croissance a été significativement affectée par l'uranium à partir de 256 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 8, figure 7). Au cours des trois premiers stades larvaires, c'est la croissance somatique qui domine, le développement des gamètes ne débutant qu'au cours du quatrième stade (Postma et Davids, 1995). La larve doit atteindre une taille critique avant d'allouer de l'énergie à sa mue, ainsi qu'à la production des gamètes (Sibley *et al.*,

1997; Pery *et al.*, 2002). En étant exposée à de l'uranium, la larve aurait besoin de plus de temps pour atteindre cette taille critique, expliquant ainsi à la fois l'inhibition de croissance (figure 7) et le retard de développement mis en évidence grâce à la mesure de largeur de capsule céphalique (figure 6).

Dans ses modèles décrivant les effets des polluants sur la croissance et la reproduction de *Chironomus riparius*, Pery *et al.* (2003) ont considéré que seule la croissance était directement impactée par d'éventuels effets toxiques. Le polluant agissait sur cette croissance selon deux modes d'action: (i) une diminution de l'efficacité d'assimilation de la nourriture (Leppanen *et al.*, 1998); (ii) un coût de la croissance accrue, notamment par la mise en place de mécanisme de détoxification (ex: Synthèse de métallothionéines chez *Chironomus riparius* en présence de Cd (Gillis *et al.*, 2002)). Ainsi l'uranium agirait sur la croissance selon l'un de ces modes d'action. Cependant, cette étude n' a pas permis de le déterminer.

4.4. Conséquences au niveau de la population

Les mesures de survie, de largeur de capsule céphalique, de longueur des larves ont permis d'évaluer les effets de l'uranium sur deux paramètres de *fitness*: la survie et le développement de la larve, en incluant le temps de développement et les performances de croissance. Or tout effet négatif sur ces deux paramètres peut avoir des conséquences au niveau de la population. En effet, si un polluant entraîne une diminution de la survie des larves, alors le nombre d'adultes aptes à se reproduire va de fait diminuer. Pour l'espèce *Chironomus riparius*, comme toutes les espèces semelpares (espèces dont les individus ne se reproduisent qu'une fois dans leur vie), tout effet négatif sur la survie des juvéniles va induire des effets négatifs au niveau de la population de manière équivalente ou amplifiée (Forbes et Calow, 2002; Charles *et al.*, 2004).

De plus, tout retard de développement ou inhibition de croissance aura des effets sur la reproduction de *Chironomus riparius*. Postma et Davids (1995) ont montré qu'une exposition à du Cd entraînait une augmentation du temps de développement de

Chironomus riparius, et une diminution du taux de croissance de la population. Or la variation du temps de développement larvaire est la première source de variation du temps de génération chez les diptères, et le temps de génération est une composante fondamentale de la *fitness* de population en expansion (Moeur et Istock, 1980; Bourguet *et al.*, 2004). De nombreuses études ont également montré que l'inhibition de croissance chez les macro-invertébrés benthiques pouvait être associée à une diminution des performances de reproduction. Parmi elles, Sibley *et al.* (1997) ont étudié les effets de la quantité de nourriture sur la croissance et la reproduction de *Chironomus tentans*. Ils ont mesuré une corrélation positive entre l'inhibition de croissance et la diminution du succès reproducteur. Ce résultat a ensuite été confirmé par Pery (2003) en modélisant les effets des toxiques sur *Chironomus sp.*

Ainsi l'uranium a eu des effets négatifs sur la survie, le temps de développement et la croissance de *Chironomus riparius*, et qu'en conséquence, des effets au niveau de la population sont envisageables avec la diminution des performances et du succès de reproduction.

4.5. Malformations

Chez les larves *Chironomus riparius*, le pourcentage de larves malformées au niveau des pièces buccales est couramment utilisé pour évaluer leur stabilité du développement (Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998; Janssens de Bisthoven *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2000; Meregalli *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2008). La stabilité du développement est la capacité d'un génotype à produire un phénotype donné dans un environnement particulier. Elle regroupe les processus qui réduisent la variation phénotypique résultant d'accidents survenus au cours du développement (Clarke, 1995; Polak, 2003). Dans des conditions optimales, le développement se déroule selon une voie génétiquement prédéterminée. La moindre perturbation est neutralisée par les mécanismes de la stabilité du développement. La voie retrouve ainsi sa trajectoire originale. Le phénotype prédéterminé est alors produit. Dans des conditions stressantes, l'efficacité des mécanismes de stabilité du développement peut être si réduite, que la trajectoire

originale du développement ne peut être restaurée. Ceci conduit alors à des phénotypes aberrants, tels que la présence de malformations au niveau des pièces buccales des larves de chironomes.

Dans notre traitement contrôle, le pourcentage de larves malformées a été de 29% (tableau 8, figure 8). Cette valeur est similaire à celle obtenue dans de nombreuses études en laboratoire sur *Chironomus riparius* (pour une revue, voir Vermeulen *et al.*, 2000). Néanmoins ce pourcentage peut être jugé élevé. Certains auteurs considèrent que la consanguinité des souches maintenues en laboratoire est la principale cause d'un pourcentage de larves malformées élevé dans les populations contrôles (Vermeulen *et al.*, 1998).

En dépit de cette valeur élevée on observe une augmentation significative du pourcentage de larves malformées dans les traitements intermédiaires 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, pourcentages respectivement de 72% et 76% (tableau 8, figure 8). Ce résultat mettrait en évidence un effet négatif de l'uranium sur la stabilité du développement des larves de chironomes. D'autres études sur *Chironomus sp* ont mis en évidence une telle relation dose-réponse avec d'autres polluants: 4-nonylphenol (Meregalli *et al.*, 2001); 17 alpha-éthinyloestradiol et bisphénol A (Watts *et al.*, 2003); tebufenozide (Kwak et Lee, 2005); As (Martinez *et al.*, 2006). L'uranium a donc eu des effets tératogènes sur les larves de *Chironomus riparius*, effets observables dans une gamme de concentrations sublétales (figure 5).

A partir du traitement 256 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, le pourcentage de larves malformées a été équivalent au pourcentage dans le traitement contrôle (figure 8). Dans le traitement 512 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, aucune des larves survivantes ne présentaient de malformations au niveau de leurs pièces buccales. Lors de nos précédents travaux sur les effets d'une exposition à l'uranium de larves de *Chironomus riparius* (Dias *et al.*, 2008), nous avons également observé après dix jours, une diminution significative du pourcentage de larves malformées dans les traitements où la survie des larves avait significativement diminué par rapport au traitement contrôle (figure 9).

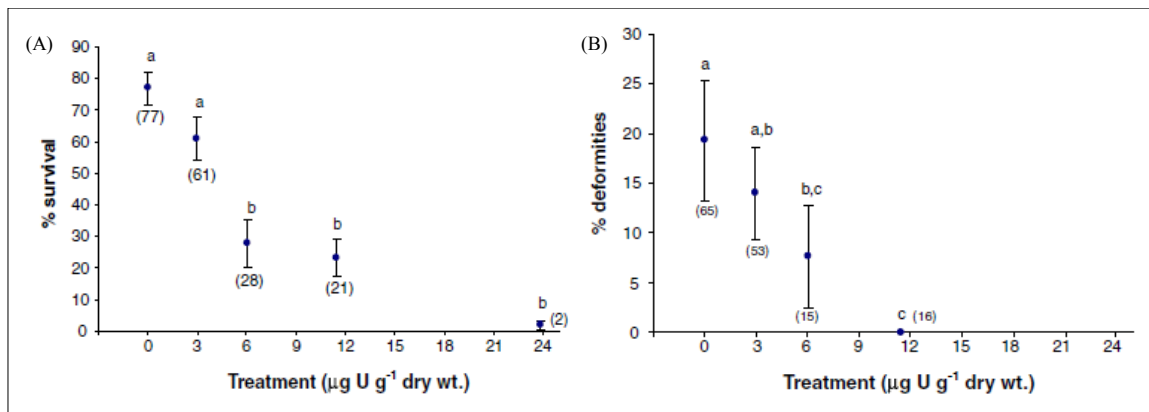


Figure 9. Effet de l'uranium (moyenne \pm ES) après dix jours d'exposition à différentes concentrations (A) au niveau de la survie, et (B) du pourcentage de larves malformées au niveau des pièces buccales. La taille de l'échantillon est entre parenthèses. Des lettres différentes indiquent des différences significative entre les traitement (test de Tukey; $p < 0,05$) (Extrait d'une figure de Dias et al. (2008)).

Pour expliquer ces résultats, nous avons proposé l'hypothèse que les larves malformées n'avaient pas survécu dans les forts traitements à cause de leur *fitness* plus faible, comparé aux larves non malformées. En effet, la stabilité du développement est une estimation indirecte du niveau de *fitness* des individus (Leary et Allendorf, 1989). Par conséquent, les individus avec une *fitness* faible auraient une moins bonne stabilité du développement par rapport aux individus de meilleure *fitness* (pour une revue, voir Clarke, 1995). Par exemple, lors d'une étude sur les effets d'un sédiment contaminé par des métaux lourds sur des larves de *Chironomus thummi*, Janssens De Bisthoven *et al.* (1998) ont montré en terme de survie et de temps de développement que les larves malformées étaient moins performantes que les larves non malformées.

Dans l'expérience 1, la mise en évidence d'un effet tératogène de l'uranium dans des conditions sublétales, avec l'augmentation significative du pourcentage de larves malformées (figure 8) – effet non observé précédemment à cause d'une gamme de concentration trop élevée (figure 9) - puis la chute de ce pourcentage à des concentrations où la survie des larves commençait à être impactée par l'uranium, tendrait à confirmer cette hypothèse. En effet, si le pourcentage de larves malformées a été significativement influencé par le traitement (tableau 8, figure 8); en revanche, les analyses statistiques n'ont pas révélé d'effet du traitement sur la gravité des malformations chez les larves malformées. Les malformations ayant été étudiés uniquement sur les larves survivantes, on peut émettre l'hypothèse d'un effet morbide des malformations au niveau des pièces buccales à partir d'un seuil de gravité (Swaddle, 2003), d'où l'absence de relation dose-réponse entre la concentration en uranium et la gravité des malformations.

Ainsi une *fitness* plus faible des larves malformées par rapport aux larves non malformées permettrait d'expliquer la réponse du pourcentage de larve malformées vis-à-vis du traitement à l'uranium selon l'hypothèse de la mortalité différencié.

4.6. Hypothèse de la mortalité différenciée

Cette hypothèse a été décrite par Floate et Fox (2000) en étudiant les effets d'un pesticide, l'ivermectine, sur la mouche domestique (*Musca domestica*), en particulier sur le niveau d'asymétrie des individus, une autre mesure de la stabilité du développement (Clarke, 1995; Polak, 2003). Cette hypothèse repose sur le constat que les individus sur lesquels étaient généralement étudiée la stabilité du développement ne représentaient qu'une partie des individus exposés aux stress (ex : exposition à un toxique), les survivants. Les individus les moins capables de maintenir un développement stable en présence d'un stress, seraient ceux qui ont le moins de chance de survivre (corrélation positive entre la *fitness* et la stabilité du développement).

Soit une population hypothétique composée d'une petite portion d'individus robustes dont le phénotype n'est pas impacté par la présence d'uranium (*i.e.* pas de malformations au niveau des pièces buccales). En soumettant cette population à un faible niveau de stress, la totalité des individus vont survivre, et le pourcentage de malformés va augmenter du fait des individus sensibles qui présenteront des malformations (figure 10). En soumettant cette population à un stress de niveau modéré, une partie des individus sensibles va mourir. Ainsi une large proportion des survivants sera composée d'individus robustes ne présentant pas de malformations, avec pour conséquence une diminution du pourcentage de malformés. En soumettant cette population à un stress élevé, seuls les individus robustes survivent, avec pour conséquence un pourcentage de malformés nul. Le pourcentage de malformés ne répondra plus à l'augmentation du niveau de stress. Ainsi la population exposée à une forte concentration en uranium peut présenter un pourcentage de larves malformées équivalent, voire inférieur à la population contrôle (figure 8).

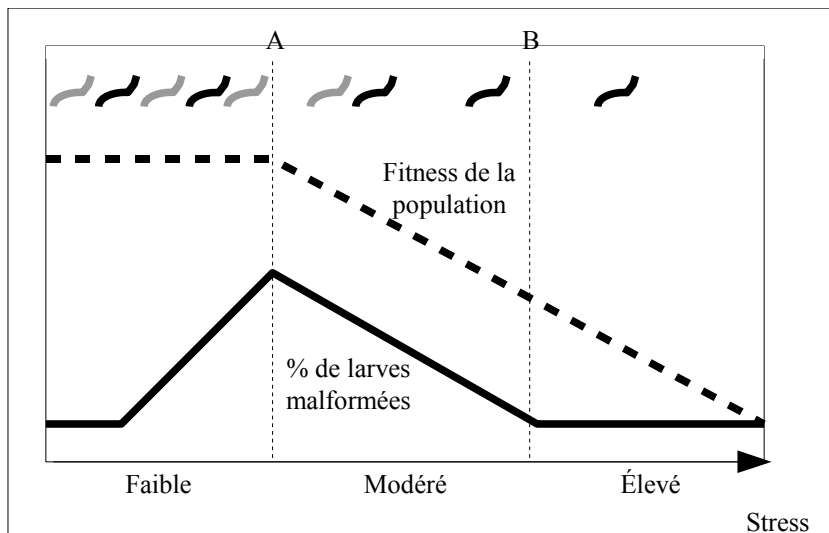


Figure 10. Hypothèse de la mortalité différenciée, illustrée schématiquement par l'interaction entre le niveau de stress et la fitness de la population (ligne pointillée), et entre le stress et le pourcentage de larves malformées (ligne pleine), pour une population constituée d'individus malformés (en gris) et non malformés (en noir) (modifié d'après Floate et Fox, 2000). Dans une gamme de stress faible, l'augmentation du niveau de stress va entraîner des malformations chez les individus sensibles, et par conséquent augmenter le pourcentage de larves malformées. Aucune larve ne meurt et les individus résistants ne présentent pas de malformations. Le point A est atteint lorsque tous les individus sensibles de la population présentent des malformations et survivent. Dans un gamme de stress modéré, le pourcentage de larves malformées diminue avec l'élimination au sein de la population des individus sensibles, et la survie des individus résistants au point B, seuls les individus résistants survivent. Désormais, toute augmentation du niveau de stress n'entraîne plus de variation du pourcentage de larves malformées.

Les résultats de pourcentage de larves malformées ainsi que de survie mettraient alors en évidence à partir du traitement $512 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps une contre sélection des individus sensibles à l'uranium, c'est à dire ceux présentant notamment des malformations au niveau de leurs pièces buccales (figures 5 et 8). En effet, l'exposition à l'uranium entrainerait des perturbations du développement telles que la stabilité du développement des individus les plus sensibles ne pourrait pas être maintenue à un niveau suffisant, avec pour conséquence leur mort au cours des sept jours d'exposition. Ainsi les individus capables de tamponner tout écart de développement, présenteraient un avantage sélectif dans un environnement contaminé à l'uranium (Wadington, 1957; Hendrickx *et al.*, 2003).

5. Conclusion

L'objectif de l'expérience 1 était de mesurer les effets d'une exposition de sept jours à un sédiment contaminé l'uranium sur la survie, le développement et la croissance de larves de *Chironomus riparius*. Les conditions d'exposition ont permis de montrer que l'uranium présent à la fois dans le sédiment et dans la colonne d'eau avait entraîné une diminution de la survie des larves, un retard de développement et une inhibition de croissance. En conséquence, des effets au niveau de la *fitness* de la population sont envisageables avec la diminution des performances et du succès de reproduction.

Un effet tératogène de l'uranium a également été mis en évidence uniquement dans une gamme de concentrations sublétales, avec une augmentation significative du pourcentage de larves malformées. Dans les traitements supérieurs, la chute du pourcentage de larves malformées laisse supposer un avantage sélectif des larves capables de résister à la présence d'uranium, en maintenant notamment un développement stable.

Expérience 2: Modifications phénotypiques d'une population exposée à l'uranium pendant huit générations

1. Introduction

1.1. Micro-évolution

De nombreux cas de micro-évolutions contemporaines chez des espèces animales et végétales ont été observés. Ceux-ci ont été répertoriés dans plusieurs revues de littérature (Hendry *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007; Stockwell *et al.*, 2003; Hendry et Kinnison, 2001; Bone et Farres, 2001; Pergams et Ashley, 2001; Hendry et Kinnison, 1999). Ces résultats soulignent notamment le rôle important des perturbations anthropiques sur l'occurrence et la vitesse des situations de micro-évolution contemporaine, en particulier celles engendrées par la présence de polluants dans l'environnement (Hendry *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007; Bone et Farres, 2001).

Certaines de ces études relatent de micro-évolutions sur une période inférieure à vingt générations chez des populations naturelles exposées à un ou plusieurs toxiques. Par exemple chez des plantes, Bone et Farres (2001) ont compilé plusieurs études mettant

en évidence des micro-évolutions rapides conduisant à une augmentation de la tolérance aux métaux lourds (*Plantago lanceolata* exposée au plomb (Antonovics et Bradshaw, 1970)) ou encore aux herbicides (*Lolium rigidum* exposée au glyphosate (Powles *et al.*, 1998); *Bromus tectorum* exposée au sulfuron (Mallory-Smith *et al.*, 1999)).

La présence de métaux lourds dans l'environnement peut influencer les processus évolutifs. Comme pour la plupart des polluants, la sélection induite par des métaux lourds est considérée comme directionnelle, continue, et forte. En effet, les métaux lourds sont des substances non dégradables, qui peuvent entraîner des effets toxiques. Les conséquences de cette sélection, si on considère un environnement stable, peut être notamment un accroissement de la tolérance des populations aux métaux lourds présents dans l'environnement (Posthuma et Van Straalen, 1993).

Plusieurs expériences de sélection naturelle en laboratoire ont déjà été réalisées dans le but d'étudier l'acquisition de tolérance chez des populations d'insectes exposées à des métaux lourds (tableau 2). Ainsi, en étudiant les effets d'un métal sur des populations exposées pendant plusieurs générations successives, certains auteurs ont pu mettre en évidence des micro-évolutions chez certaines espèces animales (Vogt *et al.*, 2007; Postma et Davids, 1995; Magnusson et Ramel, 1986; Nassar, 1979). Par exemple, chez *Drosophila melanogaster*, Nassar (1979) a mis en évidence après 25 générations d'exposition à une concentration de tétra-éthyle de plomb entraînant 50% de mortalité chez les larves, une amélioration de la *fitness* moyenne (fécondité, éclosion, viabilité) des individus issus de la population exposée par rapport à la population contrôle.

De même, Postma et Davids (1995) ont soumis une population d'élevage de *Chironomus riparius* à différentes concentrations en cadmium pendant neuf générations consécutives. Les auteurs ont observé chez les populations exposées une modification au fil des générations de certains traits d'histoire de vie tels que la survie (diminution de la survie des larves dans certaines conditions au point d'avoir l'extinction de certaines populations), le temps de développement (augmentation lors des dernières générations), et la fécondité des femelles (augmentation du nombre d'œufs pondus). Selon les auteurs,

cette exposition au cadmium a entraîné une pression de sélection qui a conduit à une augmentation du niveau de tolérance des populations pré-exposées (Postma et Davids, 1995).

La présence de métaux peut donc entraîner une forte pression de sélection directionnelle. La sélection directionnelle peut conduire au fil des générations à un déplacement de la valeur moyenne de ce trait vers cet extrême, le résultat de cette micro-évolution étant au bout d'un certain nombre de génération une adaptation locale de la population exposée (Sotka, 2005; Bahrndorff *et al.*, 2006).

Dans le cas d'une exposition à un métal sur plusieurs générations successives, la sélection va favoriser les individus les plus tolérants, c'est à dire ceux capables de mettre en place un mécanisme de tolérance leur permettant de maintenir en milieu contaminé un succès reproducteur élevé (*c.f.* Boîte 2. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez les espèces animales. p. 26).

1.2.Niveau de stress et réponse évolutive

Tout trait soumis à une sélection y répondra proportionnellement à l'intensité de celle-ci (*c.f.* § 2.3.4.Intensité de la sélection, p.30). Ainsi plus la sélection sera forte, plus la réponse des traits soumis sera grande. Si plusieurs expériences de sélection naturelle en laboratoire ont déjà été réalisées dans le but d'étudier l'acquisition de tolérance chez des populations d'insectes exposés à des métaux lourds (tableau 2, p.39), seul Magnusson et Ramel (1986) ont pu à ce jour mettre en évidence une relation de type dose-réponse entre la concentration en métal présent dans le milieu d'exposition et la réponse évolutive du niveau de tolérance.

Magnusson et Ramel (1986) ont étudié l'acquisition de tolérance au méthyle mercure de populations de *Drosophila melanogaster*. A partir d'une population issue de quatre lignées de drosophiles tolérantes au méthyle mercure, une expérience de sélection a été conduite sur douze générations. Trois niveaux de pression de sélection ont été testés –

une pression nulle, une pression forte (exposition à une concentration en méthyle mercure entraînant 50% de mortalité), et une pression très forte (> 50% de mortalité). Les résultats ont mis en évidence chez les populations exposées au méthyle mercure une augmentation de la tolérance au cours des douze générations proportionnelle à la pression de sélection. Notons qu'aucun trait d'histoire de vie n'a été suivi au cours de l'exposition. Les conséquences de cette acquisition de tolérance en fonction de l'intensité de la sélection sur la *fitness* des individus n'a de fait pas été étudiées.

Or la mise en évidence d'une telle relation entre la concentration en polluant et la vitesse de la réponse évolutive est une étape fondamentale dans la compréhension du rôle des métaux présents dans l'environnement comme agent de la sélection naturelle. L'influence de cette acquisition de tolérance sur les traits d'histoire de vie *via* les compromis (*c.f.* Boite 3. Sélection et compromis entre les traits d'histoire de vie., p.33) permettrait une meilleure évaluation du risque lié à l'exposition aux métaux lourds (Chapman *et al.*, 2003).

1.3. Asymétrie fluctuante

L'asymétrie fluctuante (AF) de traits morphologiques présentant un plan de symétrie bilatérale a été très largement utilisée comme une mesure de perturbation environnementale ou génétique survenue au cours du développement de l'organisme. En effet, cette mesure permet d'estimer la stabilité du développement, c'est à dire l'ensemble des processus qui vise à maintenir l'homéostasie, en réduisant la variation phénotypique résultant d'accidents survenus au cours du développement (Clarke, 1995).

Dans des conditions optimales, le développement se déroule selon une voie génétiquement prédéterminée. La moindre perturbation est neutralisée par les mécanismes de la stabilité du développement. La voie retrouve ainsi sa trajectoire originale, et le phénotype prédéterminé est alors produit. Néanmoins dans des conditions stressantes, l'efficacité des mécanismes de stabilité du développement peut

être si réduite que la trajectoire originale du développement ne peut être restaurée. On parle alors d'instabilité du développement. D'un point de vue énergétique, l'augmentation d'un stress va occasionner une augmentation des dépenses énergétiques de l'organisme (Sibly et Calow, 1989). Ce surcoût va réduire l'énergie allouée à l'homéostasie par le jeu des contraintes énergétiques, et ainsi entraîner une instabilité du développement (Clarke et McKenzie, 1992).

L'AF a été largement utilisée pour comparer le niveau d'instabilité du développement chez des populations exposées à un stress environnemental tel que la température, la nutrition, les radiations, les polluants, la densité, le bruit, le parasitisme, les conditions de lumière, la prédation, ou encore la structure de l'habitat (pour une revue, voir Hoffmann et Woods, 2003; Moller et Swaddle, 1997). Pour toutes ces études, l'AF est supposée plus élevée chez les populations les plus stressées. Ainsi, la tératogénicité de certains polluants a été mise en évidence par une augmentation de l'AF chez des populations exposées. Par exemple, Caldwell *et al.* (2005) ont mis évidence un effet tératogène du 2,4-decadienal – une molécule produite par les diatomées – sur des larves de *Psammechinus miliaris* (Echinoderme, échinide). De même, l'exposition de *Xathocnemis zealandica* (Insecte, odonate) à du carbaryl a entraîné au niveau des ailes une augmentation de l'AF (Hardersen, 2000; Hardersen et Frampton, 1999; Hardersen et Wratten, 1998). Ou encore les études sur des larves de *Chironomus riparius* ont permis de lier le niveau d'asymétrie des larves à différents types de perturbation (organique, chlorure, nitrite et ammonium, rejet industriel) (Servia *et al.*, 2004).

L'AF a aussi été particulièrement employée comme une mesure de *fitness*. Contrairement à la plupart des autres traits lié à la *fitness*, l'AF permet de définir un phénotype optimal – la symétrie parfaite (Palmer et Strobeck, 1986) – à partir duquel toute déviation est non-adaptative (Watson et Thornhill, 1994; Clarke, 1995; Moller, 1997; Gangestad et Thornhill, 2003). Cependant cette relation négative entre l'AF et la *fitness* n'est pas clairement démontrée, excepté chez des individus soumis au cours de

leur développement à un stress élevé (Woods *et al.*, 2002; Hendrickx *et al.*, 2003; Dongen, 2006).

Dans le cas d'étude sur des populations naturelles collectées dans différents environnements stressants, l'absence de relation AF-stress peut être la conséquence d'une adaptation (Hoffmann et Woods, 2003). Au sein d'une population qui s'est adaptée à un environnement au départ stressant, les génotypes "adaptés" devraient avoir un développement plus stable que les génotypes "non adaptés", avec pour conséquence une AF moyenne respectivement plus faible. L'étude de populations de *Lucilia cuprina* (Insecte, diptère) exposées au pesticide diazon est un bon exemple de modification de l'AF par des changements évolutifs (Hoffmann et Parsons, 1997). Après dix ans d'utilisation du diazon pour combattre cette espèce nuisible, des phénotypes résistants ont pour la première fois été découverts dans certaines populations de *Lucilia cuprina*. Dans ce cas, la résistance a été attribuée à l'action d'un seul gène (Hoffmann et Parsons, 1997). En revanche, lorsqu'ils étaient placés dans un environnement exempt de diazon, les individus porteurs de l'allèle conférant une résistance accrue au pesticide montraient une plus faible *fitness* ainsi qu'une AF plus élevée que les individus non porteurs de cet allèle. L'usage du diazon se poursuivant, un gène modifié a été sélectionné dans les populations naturelles, avec pour conséquence une diminution de l'AF et une meilleur *fitness* des individus résistants par rapport aux individus sensibles, même dans un environnement sans diazon.

Un faible niveau d'AF pourrait donc avoir une signification adaptative : la sélection naturelle réduirait l'AF, lorsque celle-ci atteint une valeur seuil sur un ou plusieurs traits morphologiques (Swaddle, 2003). Si cette hypothèse est vraie, on peut prédire une évolution vers la diminution de l'AF sur des traits liés à la *fitness* dans une population soumise à une sélection induite par un stress environnemental. Hoffmann *et al.* (2003) préconise de tester cette hypothèse à l'aide d'expériences de sélection en environnement toxique pendant plusieurs générations. Une réponse à la sélection devrait alors conduire

à un retour de l'AF à des niveaux comparables aux contrôles. Or à ce jour, une telle expérience n'a à notre connaissance pas été réalisée.

1.4.Effet de l'uranium sur *C. riparius*

Lors de l'expérience 1, nous avons mis en évidence chez des larves de *C. riparius* exposées à un sédiment contaminé à l'uranium des effets négatifs sur la survie, la croissance et le développement des individus. Ainsi comme toute exposition à un stress environnemental, l'uranium a engendré une diminution de la *fitness* moyenne des individus. Pour compenser cette réduction de *fitness*, des mécanismes adaptatifs peuvent se mettre en place au sein de la population afin de réduire l'impact du stress (*c.f.* §Stress environnemental et mécanismes adaptatifs, p.16). Dans le cas d'une adaptation génétique, une sélection va s'opérer au fil des générations en favorisant les individus porteurs des gènes leur conférant une meilleure *fitness*.

Au cours de l'expérience 1, les résultats sur les malformations des pièces buccales des larves laissent supposer qu'un processus de sélection peut s'opérer sur nos populations de *C. riparius* exposées à un sédiment contaminé à l'uranium, notamment en fonction de la stabilité du développement des individus, selon l'hypothèse de mortalité différenciée (*c.f.* §Hypothèse de la mortalité différenciée; p.93).

Dans ce contexte, l'objectif de l'expérience 2 a été d'étudier la réponse adaptative d'une population de *C. riparius* exposée à un sédiment contaminé à l'uranium, en suivant les modifications phénotypiques au cours d'une expérience de sélection naturelle en laboratoire sur huit générations. Pour cela, des populations de même origine ont été exposées à différentes concentrations d'uranium. Plusieurs traits phénotypiques – principalement des traits d'histoire de vie – ainsi que leur stabilité du développement ont été mesurés sur les adultes à chaque génération.

2. Matériels et méthodes

2.1. Plan expérimental⁷

La contamination du sédiment a été faite à chaque génération (tableau 9).

⁷ Concernant l'origine des organismes et le protocole de contamination du sédiment, le lecteur pourra se référer aux matériels et méthodes de l'expérience 1.

Tableau 9. Caractéristiques de la contamination du sédiment artificiel destiné à l'expérience 2. La contamination s'est faite en quadripliquâts.

<i>Traitement</i>	<i>Concentration nominale ($\mu\text{g U g}^{-1} \text{ps}$)</i>	<i>Quantité de sédiment à contaminer (g ps)</i>	<i>Volume de solution mère ajouté (mL)</i>
<i>U0</i>	<i>0</i>	<i>4*1300</i>	<i>4*0,00</i>
<i>U1</i>	<i>32</i>	<i>4*1300</i>	<i>4*4,16</i>
<i>U2</i>	<i>64</i>	<i>4*1300</i>	<i>4*8,32</i>
<i>U3</i>	<i>128</i>	<i>4*1300</i>	<i>4*16,64</i>

Quatre jours avant le début d'exposition des organismes, la colonne d'eau présente dans chaque récipient de contamination a été retirée. Le sédiment humide a alors été homogénéisé et distribué dans des aquariums (1300 g ps; quatre répliquats par traitement). Une colonne d'eau synthétique non contaminée a été ajoutée de manière à avoir un rapport en hauteur sédiment/colonne d'eau de 1/4. Tous les aquariums ont ensuite été placés de manière aléatoire dans un incubateur à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une photopériode de 16h jour:8h nuit (Environnement Canada, 1997; EPA, 2000; AFNOR, 2004). Une légère aération de la colonne d'eau a été maintenue tout au long de l'expérience. Des ajouts d'eau synthétique ont permis de maintenir le niveau d'eau constant au cours de l'exposition.

Au premier jour d'exposition (J0), 200 larves *Chironomus riparius* âgées de 48h ont été introduites dans chaque aquarium. Tous les aquariums ont reçu 0,2 – 0,4 – 0,6 mg larve⁻¹ de nourriture (Tétramin®, Allemagne) respectivement à J0 et J1, J2 et J3, J4 à J30, soit des conditions de nourriture *ad libitum* (A. Pery, communication personnelle).

A partir de J12, tous les aquariums ont été recouverts d'un filet évitant la fuite des adultes. Un suivi journalier des émergences adultes ainsi que des masses d'œufs pondus a été réalisé jusqu'au cinquième jour consécutif sans émergence, soit environ J30 (figure 11)(Benoit *et al.*, 1997; EPA, 2000).

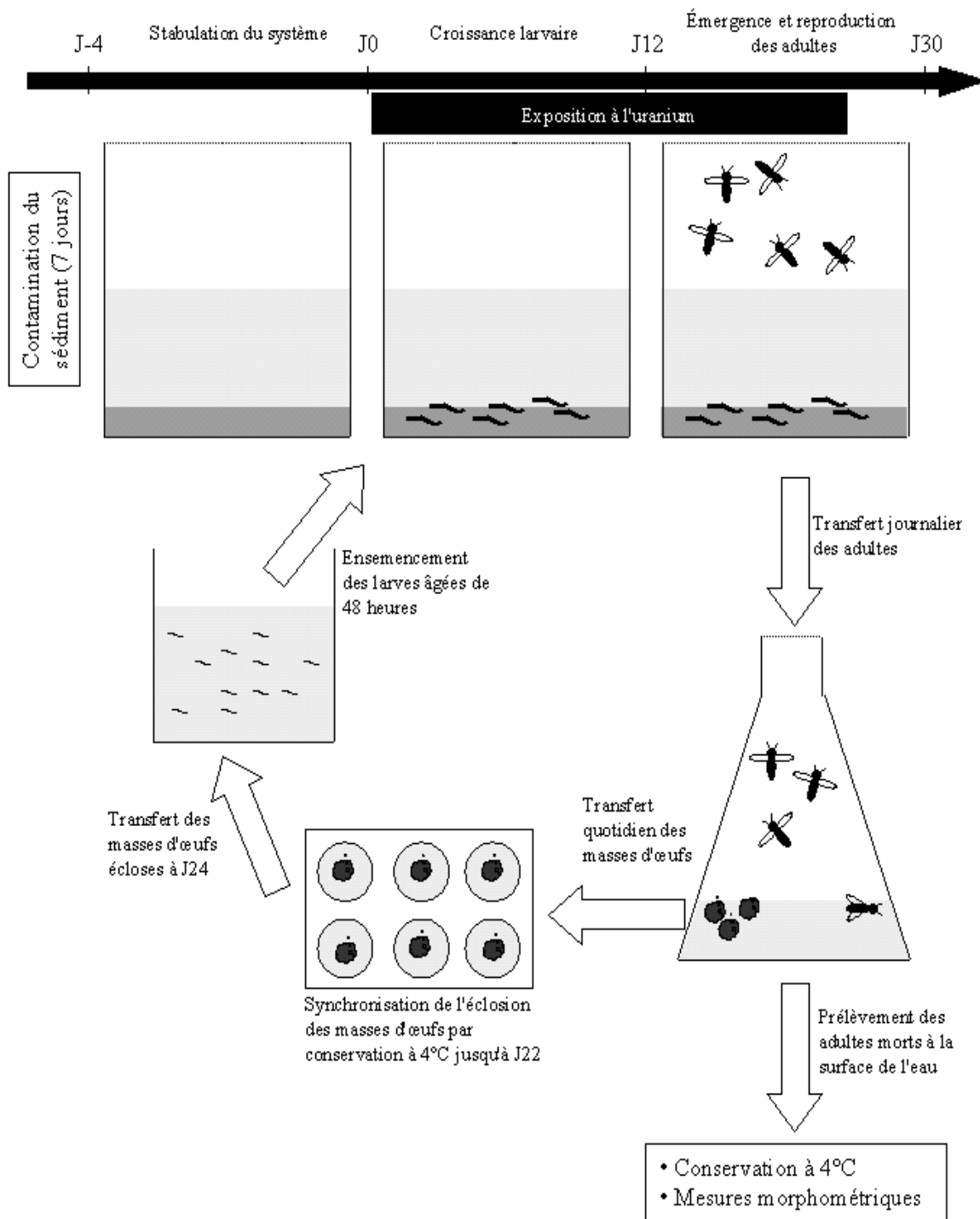


Figure 11. Déroulement d'une génération pour un aquarium de l'expérience 2.

Pour suivre la reproduction de chaque aquarium, les adultes émergés ont été transférés dans une fiole de 1L, obstruée par un filet, contenant 100 mL d'eau synthétique non contaminée. Chaque jour, le nombre de masses d'œufs pondues pour chaque aquarium a été comptabilisé, et placées individuellement dans 10 mL d'eau synthétique non contaminée. Afin de réduire les risques de sélection non intentionnelle liée à des différences de vitesse de développement, nous avons synchronisé l'éclosion des masses d'œufs servant à l'ensemencement de la génération suivante : les pontes produites entre J12 et J21 ont été placées à 4°C afin de ralentir leur développement de manière drastique, puis remises à 21°C à partir de J22⁸. Les masses pondues après J22 ont juste été comptabilisées. Les adultes retrouvés morts à la surface de l'eau ont été prélevés et placés à 4°C jusqu'aux mesures morphométriques.

A J24, toutes les masses écloses d'un aquarium ont été transférées dans un bêcher contenant 1L d'eau synthétique non contaminée et de la nourriture (environ 300 mg de nourriture Tétramin®). A J26, les larves alors âgées de 48h ont servi à l'ensemencement de la génération suivante. La génération suivante se déroule comme décrit ci dessus.

L'expérience s'est achevée après huit générations d'exposition.

2.2.Échantillonnages, montages et mesures morphométriques sur les adultes

Dans tous les traitements, pour chaque aquarium et à chaque génération, cinq mâles et cinq femelles ont été prélevés pour des mesures morphométriques sur les adultes. Afin d'éviter autant que possible une sélection inconsciente face au choix des individus, la technique d'échantillonnage illustrée par la figure 12 a permis d'obtenir un échantillon représentatif de la population. Ainsi pour chaque aquarium, pour les adultes mâles puis les adultes femelles, cinq prélèvements consécutifs de cinq individus ont été faits. Pour chaque prélèvement, un seul individu a servi aux mesures morphométriques.

8 Des essais préliminaires ont permis de mettre en évidence l'absence d'effet du passage des masses d'œufs à 4°C sur l'éclosion des œufs et la viabilité des larves fraîchement écloses.

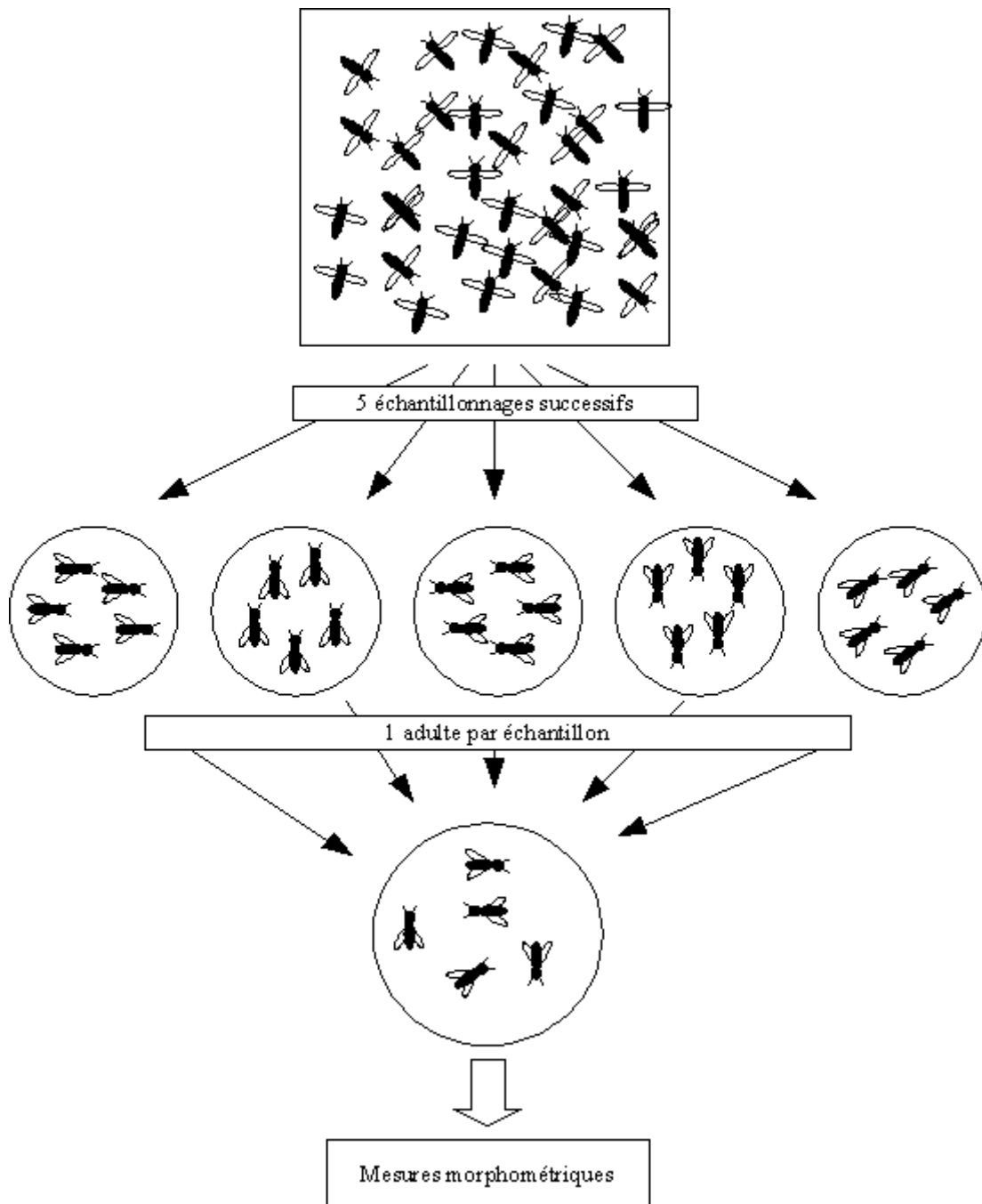


Figure 12. Schéma descriptif de la technique d'échantillonnage des mâles et des femelles adultes pour chaque aquarium à chaque génération permettant de limiter toute sélection inconsciente.

La paire d'ailes ainsi que la paire de pattes antérieures ont été prélevées et montées sur des lames de microscope recouvertes de scotch double face transparent, le tout surmonté d'un lamelle (figure 13).

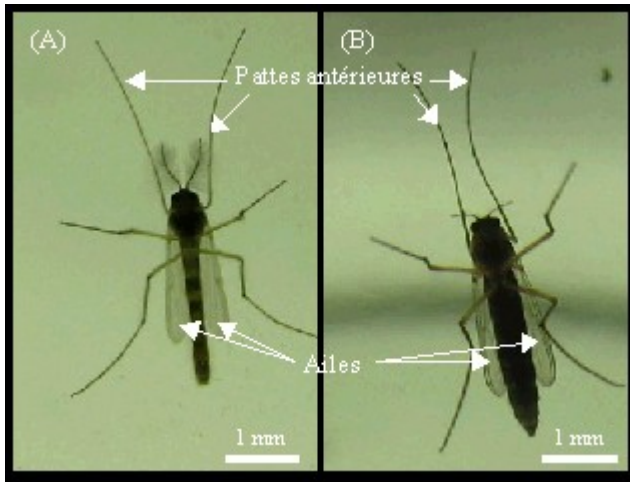


Figure 13. *Chironomus riparius* adulte mâle (A) et femelle (B).

Au total, sept caractères ont été mesurés à l'aide d'une loupe binoculaire reliée à une caméra et un ordinateur muni d'un logiciel d'analyse d'image: cinq au niveau des ailes, et deux au niveau des pattes antérieures (figure 14). L'adulte chironome présentant un plan de symétrie bilatérale, les mesures ont été faites à la fois du côté gauche et du côté droit.

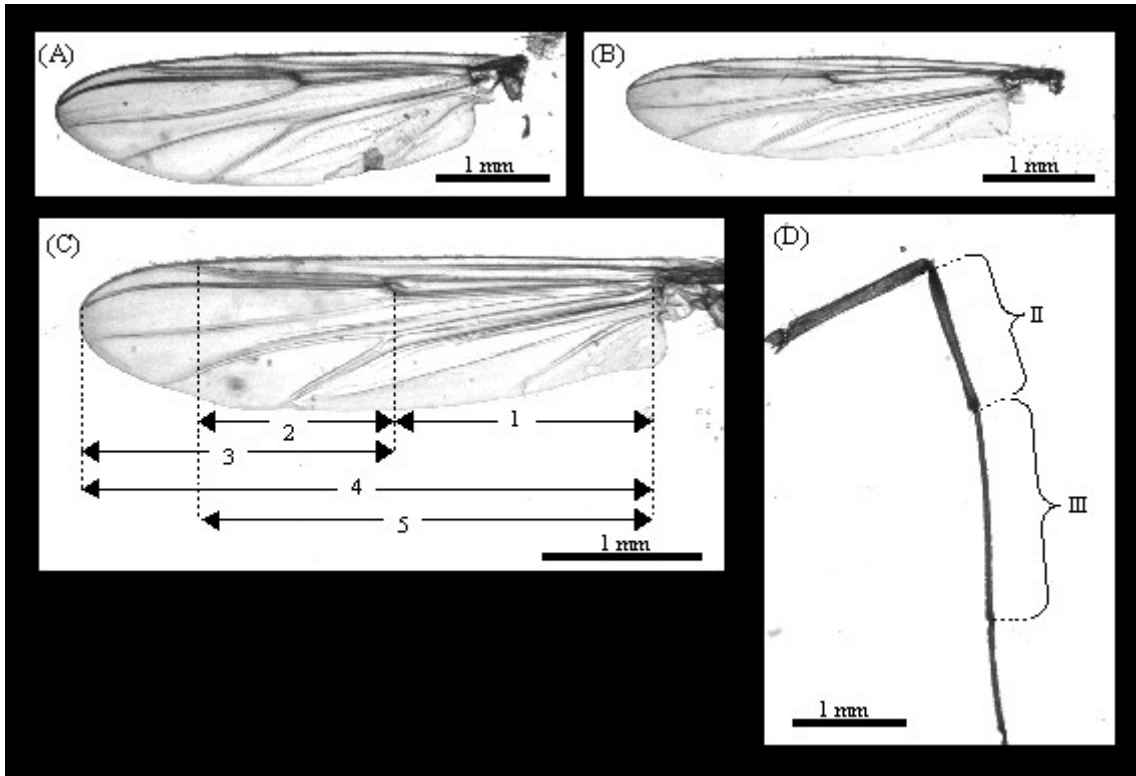


Figure 14. Détails d'une aile de *Chironomus riparius* (A) femelle, (B) mâle. (C) Caractères morphologiques mesurés sur les ailes. (D) Caractères morphologiques mesurés sur les pattes antérieures.

2.3.Mesures physico-chimiques

La température, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés dans chaque aquarium à J0, J6, et J14, avant l'ajout quotidien de nourriture. Un prélèvement d'eau (10 mL) a également été effectué les mêmes jours dans chaque aquarium, filtré (0,45 µm) puis acidifié (2% HNO₃), et stocké à 4°C jusqu'au dosage de l'uranium.

2.4.Mesures biologiques

2.4.1.Nombre d'émergences

A chaque génération et pour chaque aquarium, le nombre total d'adultes ayant émergé a été calculé.

2.4.2.Temps d'émergence des adultes

La période d'émergence étant de type bimodale (les mâles émergent plus tôt que les femelles), le temps d'émergence moyen a été étudié en distinguant le sexe (Armitage *et al.*, 1995; Ducrot, 2005).

A chaque génération et pour chaque aquarium, le jour où 50% des émergences ont eu lieu (EmT₅₀) a été calculé en ajustant un modèle logistique à quatre paramètres sur le nombre cumulé d'émergences quotidiennes entre J12 et J30. L'ajustement du modèle sur les données a été fait à l'aide du logiciel R et du package DRC (Ritz et Streibig, 2005).

2.4.3.Tailles des adultes

La taille de chaque caractère correspondait à la valeur moyenne entre le côté gauche et le côté droit. À partir des valeurs moyennes des sept caractères mesurés sur les ailes et les pattes, pour chaque aquarium à chaque génération, une Analyse en Composante Principale (ACP) a permis de calculer pour chaque observation une taille moyenne des

adultes mâles et femelles. L'ACP a permis d'extraire les indices indépendants de taille et de forme, la première composante principale correspondant à la taille, la seconde à la forme (Roff et Bradford, 1998; Gilchrist *et al.*, 2001; Akesson *et al.*, 2007). Ainsi pour chaque observation, la projection sur le premier axe principal de l'ACP a été la taille moyenne en unité PC1.

2.4.4. Asymétrie fluctuante des adultes

Pour chaque caractère, la différence entre le côté droit et le côté gauche (D-G) des individus a été calculée. Afin de considérer les différences (D-G) comme étant de l'asymétrie fluctuante (AF), une analyse statistique préalable a été faite en suivant la démarche suivante (Palmer et Strobeck, 1992; Palmer, 1994; Palmer et Strobeck, 2001; Signoret, 2008):

- (i) **L'élimination des points aberrants** a été réalisée à partir du graphique représentant la taille moyenne d'un trait d'un individu $(D+G)/2$, en fonction de la valeur absolue de la différence entre les côtés $|D-G|$, indépendamment pour chaque génération et chaque caractère.
- (ii) **L'évaluation des erreurs de mesures** a permis de vérifier si celles-ci étaient significativement inférieures à l'AF. Pour cela, un sous échantillon de 57 individus a été pris aléatoirement. Les caractères ont été mesurés trois fois. Une ANOVA à deux facteurs – facteur « côté » et facteur « individu » - a été faite pour chaque caractère (Palmer et Strobeck, 1992; Bonzom, 1999; Demers, 1999; Edwards, 2004; Piscart *et al.*, 2005). D'autre part, l'indice de reproductibilité des mesures ME4 et l'erreur de mesure ME3 définis par Palmer et Strobeck (2001) ont été calculés sur la base des résultats de l'ANOVA à deux facteurs, ainsi que ceux d'une ANOVA à un facteur (« individu »).
- (iii) **L'absence d'asymétrie directionnelle** a été vérifiée à l'aide d'un test-t en comparant (D-G) à zéro pour chaque caractère à chaque génération (Pither et Taylor, 2000; Estes *et al.*, 2005; Villisics *et al.*, 2005). Un test de Kolmogorov-Smirnov a permis également de vérifier la normalité de la distribution, et par conséquent

l'absence d'antisymétrie pour chaque caractère à chaque génération (Edwards, 2004; Piscart, 2004).

(iv) **La taille dépendance de (D-G)** a été vérifiée pour chaque caractère à chaque génération à l'aide d'une régression linéaire simple de $|D-G|$ en fonction de la taille moyenne du caractère $(D+G)/2$. De plus, une régression linéaire entre le logarithme de la variance de $(D-G)$ et la moyenne $(D+G)/2$ a été réalisée à chaque génération afin de vérifier la taille dépendance entre les caractères (Palmer, 1994).

L'ensemble de ces vérifications (*c.f.* annexe 3) a permis de choisir à partir de $(D-G)$ un indice d'AF approprié pour chaque caractère, l'indice FA2 (Palmer, 1994):

$$FA2 = \frac{|D-G|}{(D+G)/2}$$

A partir des valeurs de FA2 moyenne pour chaque aquarium à chaque génération, un indice global d'AF a été calculé en distinguant l'AF au niveau des ailes à celle des pattes, le niveau d'AF pouvant varier différemment d'un trait morphologique à l'autre (Clarke *et al.*, 2000; Clarke, 2003). Ainsi pour chaque organe, une ACP a permis d'extraire le niveau global d'AF, correspondant à la première composante principale. Pour chaque observation, la projection sur le premier axe principal de l'ACP a été utilisé comme valeur d'AF moyenne en unité PC1.

2.4.5. Fécondité des femelles

Le nombre d'œufs par masse pondue a été évalué suivant la méthode du *ring-count* (Benoit *et al.*, 1997). Cette méthode consiste à compter le nombre d'anneaux composant la masse et à multiplier par le nombre d'œufs moyen par anneau (moyenne réalisée sur trois anneaux) (figure 15).



Figure 15. Masses d'œufs de Chironomus riparius.

Les femelles ne se reproduisant qu'une fois dans leur vie, le comptage du nombre d'œufs par masse a été choisi comme critère pour estimer la fécondité des femelles (Ducrot, 2005). Ainsi pour chaque aquarium et à chaque génération, le nombre moyen d'œufs par masse pondue a été calculé.

2.4.6.Succès d'éclosion

Le succès d'éclosion a été déterminé pour les masses d'œufs pondues avant J22. Des tests préliminaires ont permis de voir la nature binaire de l'éclosion des masses d'œufs (pas d'éclosion, $\geq 90\%$ d'œufs éclos). Par conséquent, pour évaluer le succès d'éclosion des masses d'œufs pour chaque aquarium à chaque génération, le taux de masses écloses a été calculé, l'éclosion de la masse étant vérifié à J28, soit six jours au moins après la ponte (Benoit *et al.*, 1997).

2.5.Analyses statistiques

2.5.1.ANOVA à mesures répétées

Après transformation éventuelle et vérification de la normalité ainsi que de l'homogénéité de variances des données, une analyse de variance à mesures répétées (ANOVAr) a permis pour chaque critère d'étudier l'effet du traitement (variable catégorielle), l'effet des générations (variable continue) et leur interaction (Zar, 1999). Des comparaisons deux à deux (test de Newman et Keuls) sur la première et la dernière génération ont permis de fixer des seuils de toxicité pour chaque critère en début et en fin d'expérience. Ainsi ont été déterminées des NOEC (*Non Observed Effect Concentration*: concentration la plus élevée sans effet significatif) et des LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*: concentration pour laquelle on observe les premiers effets significatifs).

2.5.2. Réponses évolutives

Dans le cadre d'expérience de sélection en laboratoire, l'estimation de la réponse évolutive d'un trait phénotypique revient à calculer la pente d'une régression linéaire de sa valeur en fonction du temps (Hendry et Kinnison, 1999). A partir des valeurs moyennes obtenues pour chaque aquarium, entre la troisième (F2) et la huitième génération (F7), une régression linéaire pour chaque traitement a permis de calculer la réponse évolutive correspondant à la pente de la régression avec un intervalle de confiance à 95% (IC95%). Les deux premières générations ont été exclues de cette analyse, du fait de leur environnement différent par rapport aux générations suivantes :

- (i) la première génération (F0), qui a subi le changement d'environnement, est soumise directement à son environnement ainsi qu'à l'environnement des parents (conditions d'élevage) *via* d'éventuels effets maternels (Falconer et Mackay, 1996; Räsänen et Kruuk, 2007; Gagliano et Mc Cormick, 2007);
- (ii) la seconde génération (F1) a subi son environnement directement et éventuellement des effets maternels;
- (iii) à partir de la troisième génération (F2), l'environnement devenant constant, la sélection devient constante au fil des générations.

Pour chaque critère phénotypique, les différences de réponse évolutive entre les traitements ont été mises en évidence par comparaison des pentes.

2.5.3. Analyse en composante principale sur les variables de *fitness*

L'ensemble des critères liés à la *fitness* des populations (nombre total d'émergence, temps d'émergence, taille des adultes, fécondité, succès d'éclosion) mesurés au cours de l'expérience 2 ont fait l'objet d'une ACP.

3. Résultats

Les résultats de la contamination du sédiment artificiel, ainsi que le suivi physico-chimique au cours des générations sont décrits en annexe 4. Par simplification, chaque

traitement est référencé selon sa concentration nominale d'uranium présent dans le sédiment sec.

3.1. Nombre d'émergences

Au cours de l'expérience 2, le nombre moyen d'émergence dans le traitement contrôle ($0 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps) toutes générations confondues a été de 151 émergences, soit un pourcentage moyen de 75,5%. Le pourcentage d'émergence a été supérieur à 70% (140 émergences) à toutes les générations, excepté aux générations F1 (121,3 émergences) et F6 (131,3 émergences) (figure 17).

L'ANOVA a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 75,7$; $p < 0,001$), de la génération ($F_{7,21} = 3,6$; $p < 0,05$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 4,8$; $p < 0,001$) sur le nombre d'émergence (tableau 10).

Tableau 10. Résultats de l'ANOVA sur la valeur moyenne des traits mesurés pour chaque traitement à chaque génération ($n = 4$). Les comparaisons deux à deux (test de Newman et Keuls) ont permis de déterminer à la première (F0) et la dernière génération (F7) des seuils de toxicité de l'uranium (NOEC, LOEC; $p < 0,05$).

Trait mesuré	ANOVA			Test de Newman et Keuls			
	Effet traitement $F_{3,9} =$	Effet génération $F_{7,21} =$	Interaction traitement X génération $F_{21,63} =$	1ère génération (F0)		8ème génération (F7)	
				NOEC ($\mu\text{g U g}^{-1}\text{ ps}$)	LOEC ($\mu\text{g U g}^{-1}\text{ ps}$)	NOEC ($\mu\text{g U g}^{-1}\text{ ps}$)	LOEC ($\mu\text{g U g}^{-1}\text{ ps}$)
Nombre d'émergence	75,73 ***	3,62 *	3,95 ***	32	64	64	128
EmT50 mâle (jour)	9,36 **	25,30 ***	5,25 ***	-	-	-	-
EmT50 femelle (jour)	2,79 ($p=0,1$)	26,98 ***	3,25 ***	-	-	-	-
Taille mâle (PCI)	16,19 ***	17,78 ***	5,67 ***	32	64	-	-
Taille femelle (PCI)	13,81 **	12,07 ***	5,85 ***	32	64	-	-
AF aile (PCI)	13,42 **	30,79 ***	3,64 ***	-	32	-	-
AF patte (PCI)	3,87 *	10,78 ***	0,91 ($p = 0,25$)	-	-	-	-
Nombre d'œufs par masse	8,11 **	4,49 **	2,60 **	32	64	64	128
Taux de masses écloses	4,16 *	4,19 **	4,39 ***	64	128	64	128

NOEC: Non Observed Effect Concentration (concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet n'a été observé).

LOEC: Lowest Observed Effect Concentration (concentration la plus faible pour laquelle un effet a été observé).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 17.B). Le nombre d'émergences a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ (tableau 10). Le nombre moyen d'émergences a respectivement été de 159,5, 142,5, 93,0, 61,8 pour les traitements 0, 32, 64, $128 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$.

Dans le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$, au cours des générations F3 et F4, un développement très important de biofilm a été observé dans tous les répliquats (figure 16). Ce développement anormal a entraîné une surmortalité observable au niveau du nombre d'émergences (figure 17.A). Pour ce traitement, les comparaisons deux à deux des générations ont montré des différences significatives entre les générations F3 et F4, et les générations F1, F2, F5, et F7.

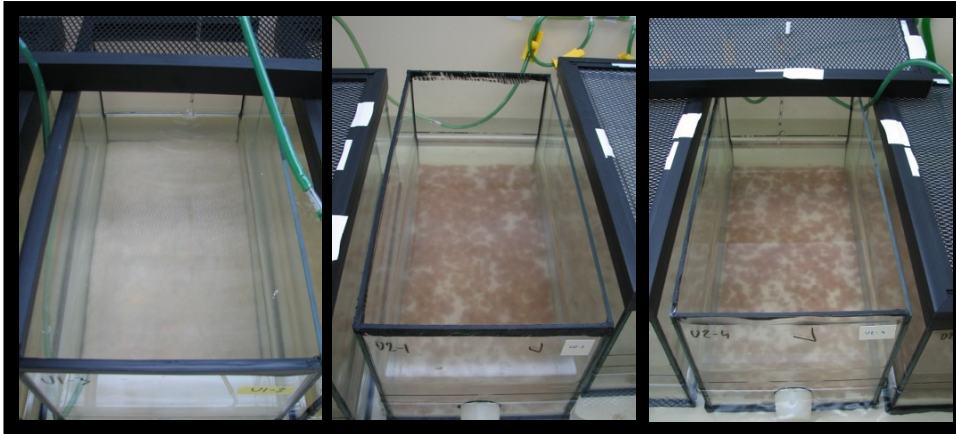


Figure 16. A gauche, photo d'un aquarium présentant une surface de sédiment d'aspect classiquement observé à 10 jours au cours de l'expérience. Au centre et à droite, photos d'aquarium du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps présentant un développement très important de biofilm à la surface du sédiment après dix jours, au cours des générations F3 et F4.

A la génération F7, un effet dose-réponse a été observé (figure 17.C). Le nombre d'émergence a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). Le nombre moyen d'émergences a respectivement été de 164,3, 135,8, 133,5, 75,9 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), le nombre moyen d'émergences a varié de +2,9% pour le traitement contrôle, -4,9% pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, +35,8% pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et +20,4% pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 17).

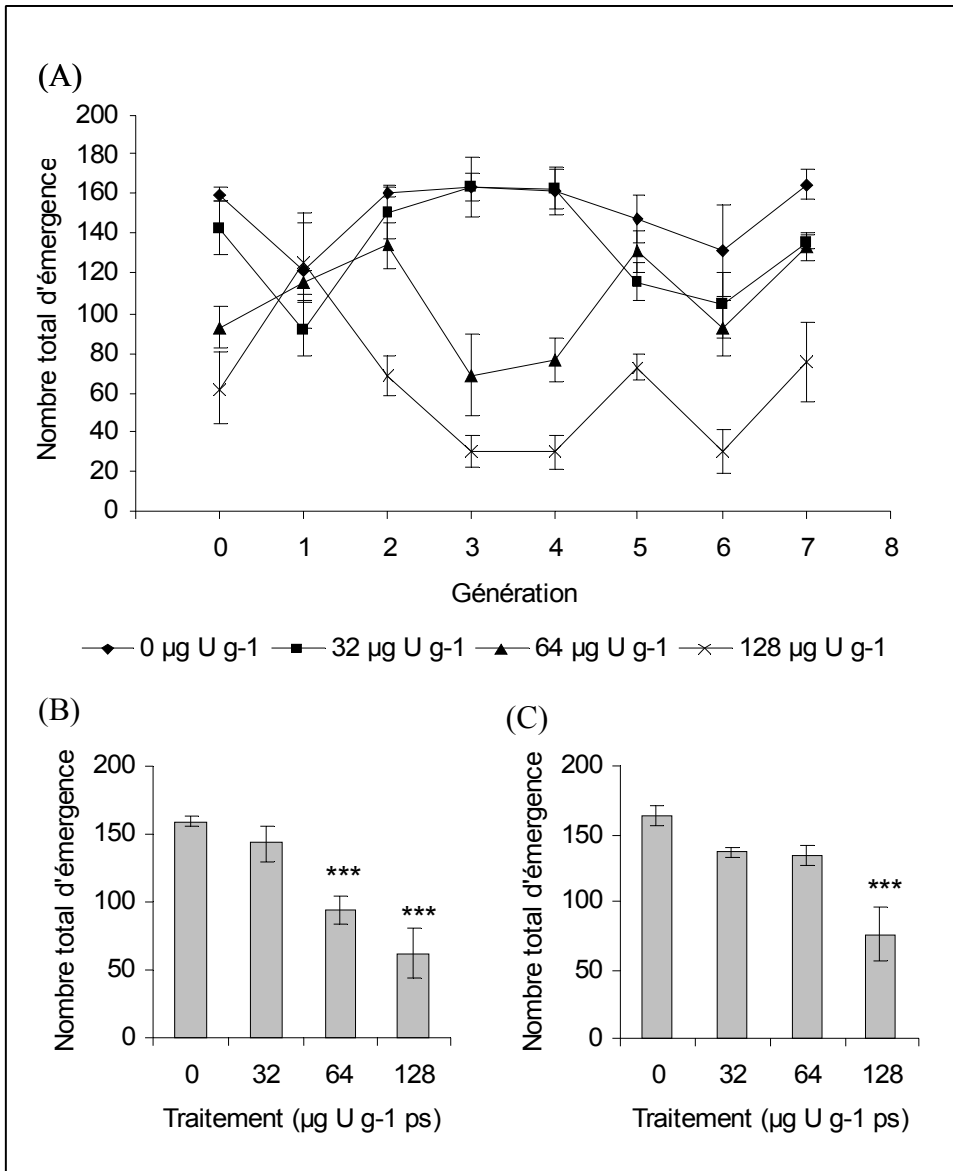


Figure 17. (A) Évolution du nombre total d'émergences (moyenne \pm ES) à chaque génération en fonction du traitement. (B) Nombre total d'émergences à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. *** indique une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) à $p < 0,001$ (test de Newman et Keuls).

L'étude de la réponse évolutive du nombre d'émergence entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Le nombre d'émergences a diminué de 14,05 individus par génération (tableau 11). Pour les autres traitements, les régressions linéaires n'ont pas été significatives ($p > 0,05$).

Tableau 11. Réponse évolutive des traits mesurés pour chaque traitement entre la génération F2 et F7, calculée grâce à la pente obtenue par régression linéaire en fonction de la génération.

Trait mesuré	Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	Pente	ES	t	p	IC95%
Nombre d'émergence ^a	0	-2,55	3,21	-0,80	0,43	-9,21 4,10
	32	-14,05	4,10	-3,42	**	-22,67 -5,43
	64	-3,05	3,61	-0,85	0,41	-10,80 4,69
	128	2,28	3,60	0,63	0,53	-5,19 9,70
EmT50 mâle (jour) ^a	0	-0,57	0,06	-8,77	***	-0,70 -0,43
	32	-0,41	0,12	-3,42	**	-0,67 -0,16
	64	-0,03	0,11	-0,27	0,79	-0,26 0,20
	128	-0,40	0,14	-2,80	*	-0,70 -0,10
EmT50 femelle (jour) ^a	0	-0,68	0,10	-6,73	***	-0,90 -0,47
	32	-0,60	0,16	-3,70	***	-0,93 -0,26
	64	-0,15	0,15	-1,01	0,33	-0,47 0,17
	128	-0,52	0,22	-2,33	*	-0,98 -0,06
Taille mâle (PCI)	0	-0,25	0,13	-1,97	0,06	-0,51 0,01
	32	0,15	0,10	1,44	0,17	-0,06 0,36
	64	0,44	0,15	2,95	**	0,13 0,76
	128	0,29	0,11	2,59	*	0,06 0,53
Taille femelle (PCI)	0	-0,21	0,14	-1,53	0,14	-0,49 0,07
	32	0,14	0,18	0,81	0,43	-0,22 0,51
	64	0,63	0,18	3,56	**	0,26 0,99
	128	0,69	0,18	3,93	***	0,33 1,05
AF aile (PCI)	0	-0,16	0,12	-1,30	0,21	-0,41 0,10
	32	-0,30	0,11	-2,81	**	-0,52 -0,08
	64	-0,54	0,19	-2,80	**	-0,94 -0,14
	128	-0,29	0,10	-2,75	*	-0,50 -0,07
AF patte (PCI)	0	-0,26	0,09	-2,98	**	-0,44 -0,08
	32	-0,21	0,08	-2,65	*	-0,38 -0,05
	64	-0,11	0,08	-1,41	0,17	-0,28 0,05
	128	-0,16	0,09	-1,92	0,07	-0,34 0,01
Fécondité (Nombre d'œufs par femelle)	0	3,36	4,67	0,72	0,48	-6,32 13,05
	32	18,81	6,83	2,75	**	4,63 32,98
	64	19,55	4,48	4,37	***	10,26 28,83
	128	8,60	6,89	1,25	0,23	-5,68 22,87
% de masses écloses	0	-0,04	0,02	-1,99	0,06	-0,08 0,00
	32	-0,04	0,02	-1,82	0,08	-0,10 0,01
	64	0,03	0,02	1,75	0,09	-0,01 0,07
	128	0,04	0,03	1,44	0,16	-0,02 0,09

^a les données obtenues pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps à la quatrième génération (F3) et à la cinquième génération (F4) ont été exclues des analyses (cf texte).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.2. Temps d'émergence

L'ANOVA sur EmT50 mâle a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 9,4$; $p < 0,01$), de la génération ($F_{7,21} = 25,3$; $p < 0,001$) et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 5,3$; $p < 0,001$; tableau 10).

A la génération F0, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 18.B). Tout traitement confondu, la moyenne d'EmT50 mâle a été de 16,1 jours.

Dans le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, au cours des générations F3 et F4, un développement très important de biofilm a été observé dans tous les répliquats. Ce développement anormal a entraîné une augmentation importante du temps d'émergence des mâles (figure 18.A). Pour ce traitement, les comparaisons deux à deux ont montré que EmT50 mâle aux générations F3 et F4 étaient significativement plus élevées qu'aux autres générations.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 18.C). Tout traitement confondu, la moyenne d'EmT50 mâle a été de 14,0 jours.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), le temps d'émergence a varié: -2,5 jours soit une variation de -16,2% pour le traitement contrôle; -1,8 jours (-12,3%) pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps ; -1,5 jours (-10,3%) pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps; -2,5 jours (-16,2%) pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 18), -2,1 jours (-14%) tout traitement confondu.

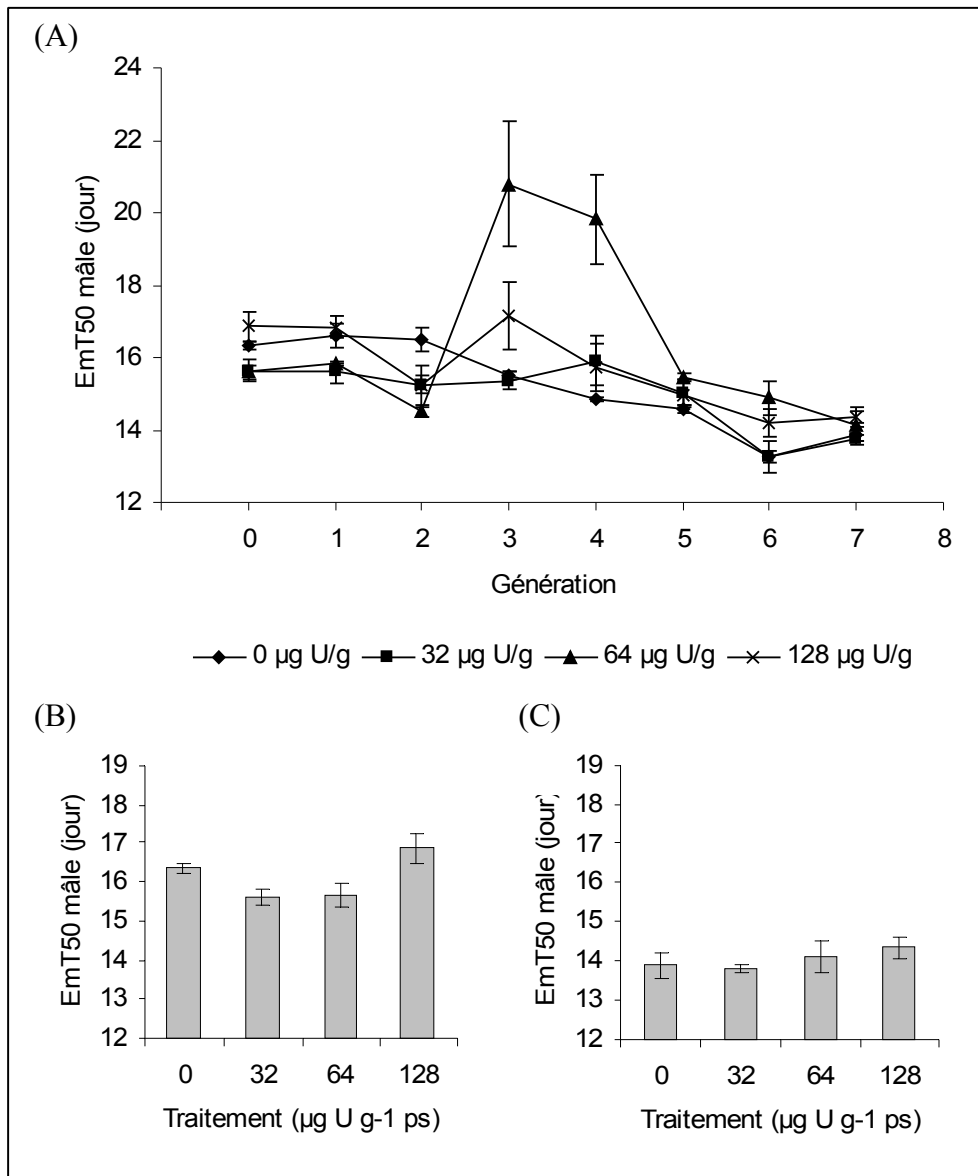


Figure 18. (A) Évolution de l'EmT50 mâle (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) EmT50 mâle à la génération F0, (C) et à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$.

L'ANOVA sur EmT50 femelle a mis en évidence l'absence d'effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 2,8$; $p = 0,10$), un effet significatif de la génération ($F_{7,21} = 27,0$; $p < 0,001$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 3,3$; $p < 0,001$; tableau 10).

A la génération F0, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 19.B). Tout traitement confondu, l'EmT50 femelle a été 18,6 jours.

Dans le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$, au cours des générations F3 et F4, un développement très important de biofilm a été observé dans tous les répliquats. Ce développement anormal a semble-t-il, entraîné une augmentation importante du temps d'émergence des femelles (figure 19.A). Pour ce traitement, les comparaisons deux à deux ont montré que EmT50 mâle aux générations F3 et F4 étaient significativement plus élevés qu'aux autres générations.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 19.C). Tout traitement confondu, l'EmT50 femelle a été 15,8 jours.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), le temps d'émergence des femelles a diminué: -3,3 jours soit une variation de -19,4% pour le traitement contrôle; -3,4 jours (-19,9%) pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$; -1,9 jours (-11,3%) pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$; -2,6 jours (-15,0%) pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ (figure 19), -2,8 jours (-16,3%) tout traitement confondu.

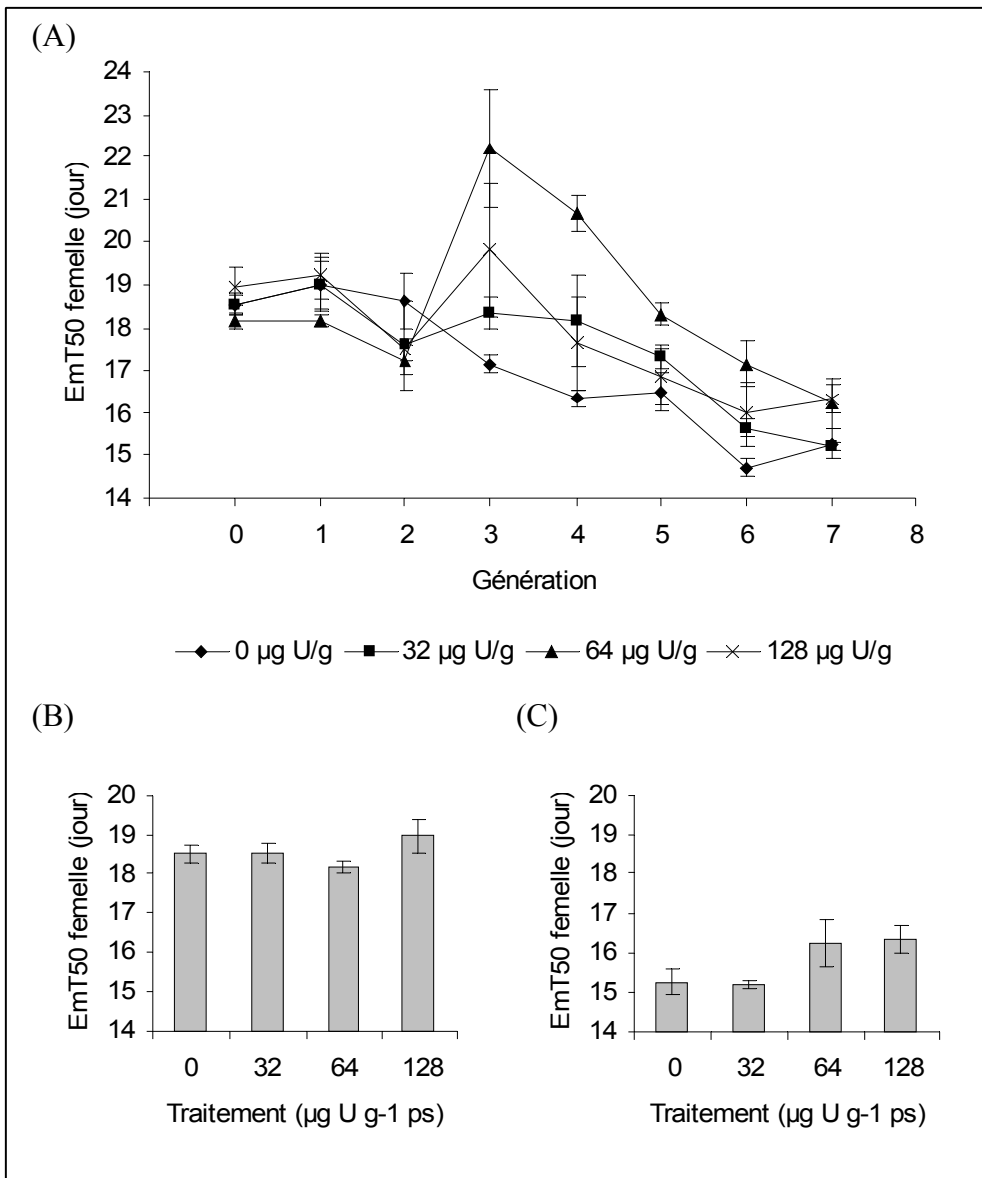


Figure 19. (A) Évolution de l'EmT50 femelle (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) EmT50 femelle à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$.

L'étude de la réponse évolutive de EmT50 mâle entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour les traitements 0, 32, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement -0,57, -0,41, -0,40 jours par génération (tableau 11). Pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la régression linéaire n'a pas été significative ($p > 0,05$).

L'étude de la réponse évolutives de EmT50 femelle entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour les traitements 0, 32, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement -0,68, -0,60, -0,52 jours par génération (tableau 11). Pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la régression linéaire n'a pas été significative ($p > 0,05$).

3.3. Tailles des adultes

L'analyse en composante principale réalisée sur les sept mesures moyennes des adultes mâles et femelles au niveau des ailes et des pattes a mis en évidence deux composantes principales de valeurs propres supérieures à un. Ces deux composantes expliquent 88,1% de la variance totale des mesures (figure 20, tableau 12). A l'exception du trait « aile 1 », tous les traits ont contribué de manière modérée à la première composante. En revanche, la variable « aile 1 » a été la seule à contribuer à la seconde composante. On peut donc considérer la première composante comme un indice de taille moyenne de l'adulte, alors que la seconde composant correspondrait à la forme de l'aile.

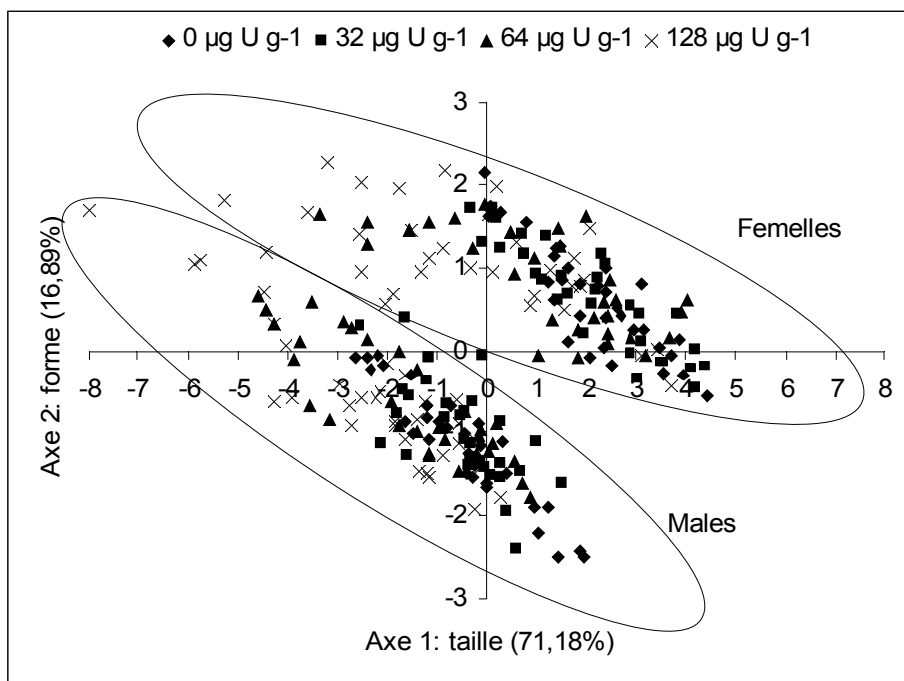


Figure 20. Projection sur les deux axes principaux de l'ACP des sept traits morphométriques mesurés sur les adultes *C. riparius* (par traitement). L'axe 1 correspond à la taille de l'adulte, et l'axe 2 à la forme (Gilchrist et al., 2001).

Tableau 12. Contributions des traits morphométriques des ailes et des pattes sur les corrélations de l'ACP.

	Trait mesuré	Facteur 1 (71,18%)	Facteur 2 (16,89%)
Ailes	1	0,023	0,743
	2	0,177	0,052
	3	0,176	0,044
	4	0,184	0,000
	5	0,172	0,088
Pattes	II	0,110	0,009
	III	0,157	0,064

L'ANOVA sur la taille des mâles a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 16,2$; $p < 0,001$), de la génération ($F_{7,21} = 17,8$; $p < 0,001$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 5,7$; $p < 0,001$)(tableau 10).

A la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 21.B). La taille des mâles a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). La taille moyenne des mâles a respectivement été de 0,95, -0,29, -1,41, -4,18 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 21.B; tableau 10). La taille moyenne des mâles a respectivement été de -1,83, -0,31, -0,66, -1,08 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), la taille moyenne des mâles a varié de -2,8 unités PC1 pour le traitement contrôle, 0 unités PC1 pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, +0,8 unités PC1 pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et +3,1 unités PC1 pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 21).

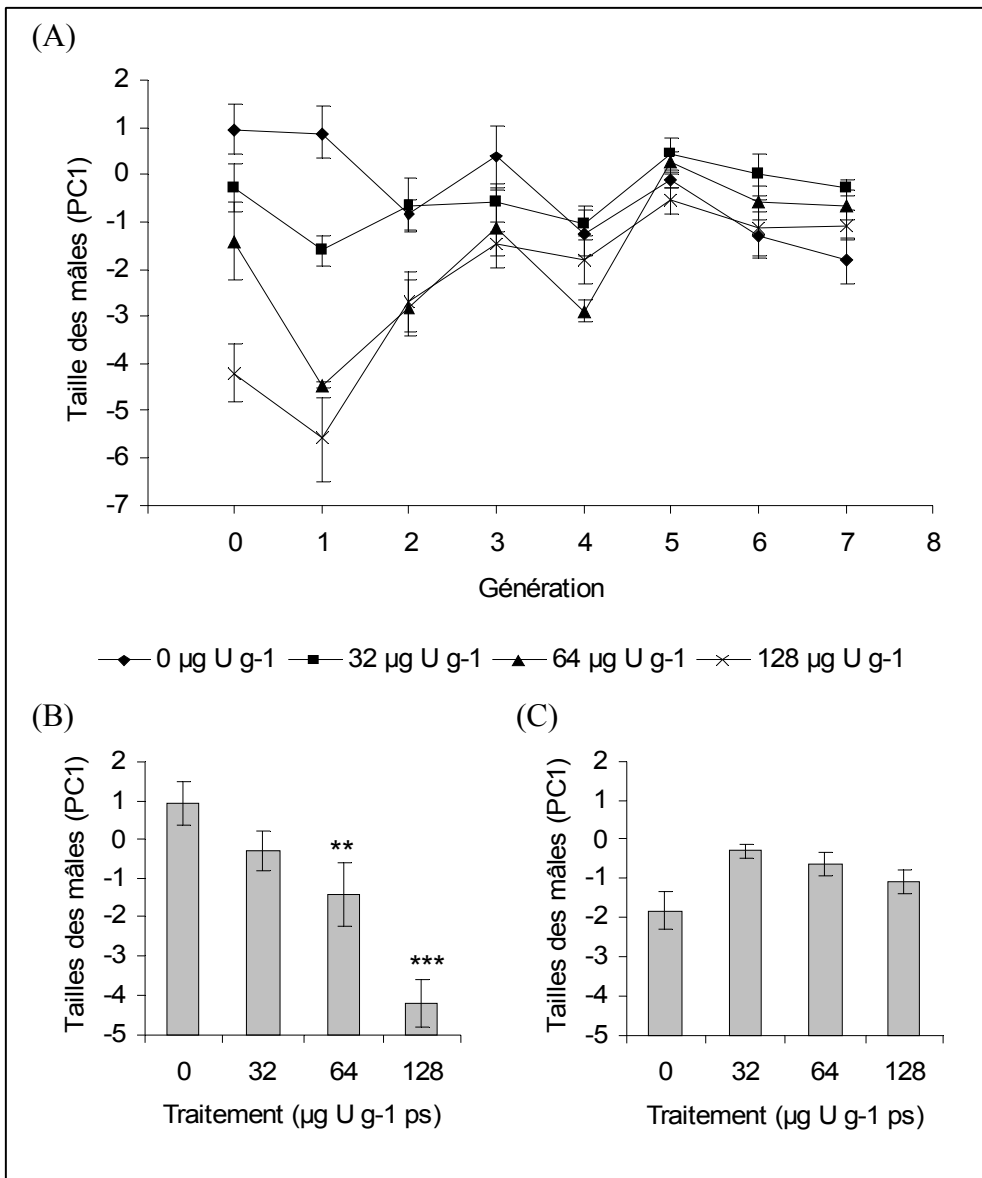


Figure 21. (A) Évolution de la taille des mâles (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) Tailles des mâles à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. ** et *** indiquent une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) respectivement à $p < 0,01$, et $p < 0,001$ (test de Newman et Keuls).

L'ANOVA sur la taille des femelles a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 13,8$; $p < 0,01$), de la génération ($F_{7,21} = 12,1$; $p < 0,001$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 3,3$; $p < 0,001$)(tableau 10).

A la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 22.B). La taille des femelles a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). La taille moyenne des femelles a respectivement été de 2,65, 2,84, 0,75, -2,75 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 22.B; tableau 10). La taille moyenne des femelles a respectivement été de 1,43, 1,43, 2,37, 2,25 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), la taille moyenne des mâles a varié de -1,22 unités PC1 pour le traitement contrôle, -1,41 unités PC1 pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, +1,63 unités PC1 pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et +5,00 unités PC1 pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 22).

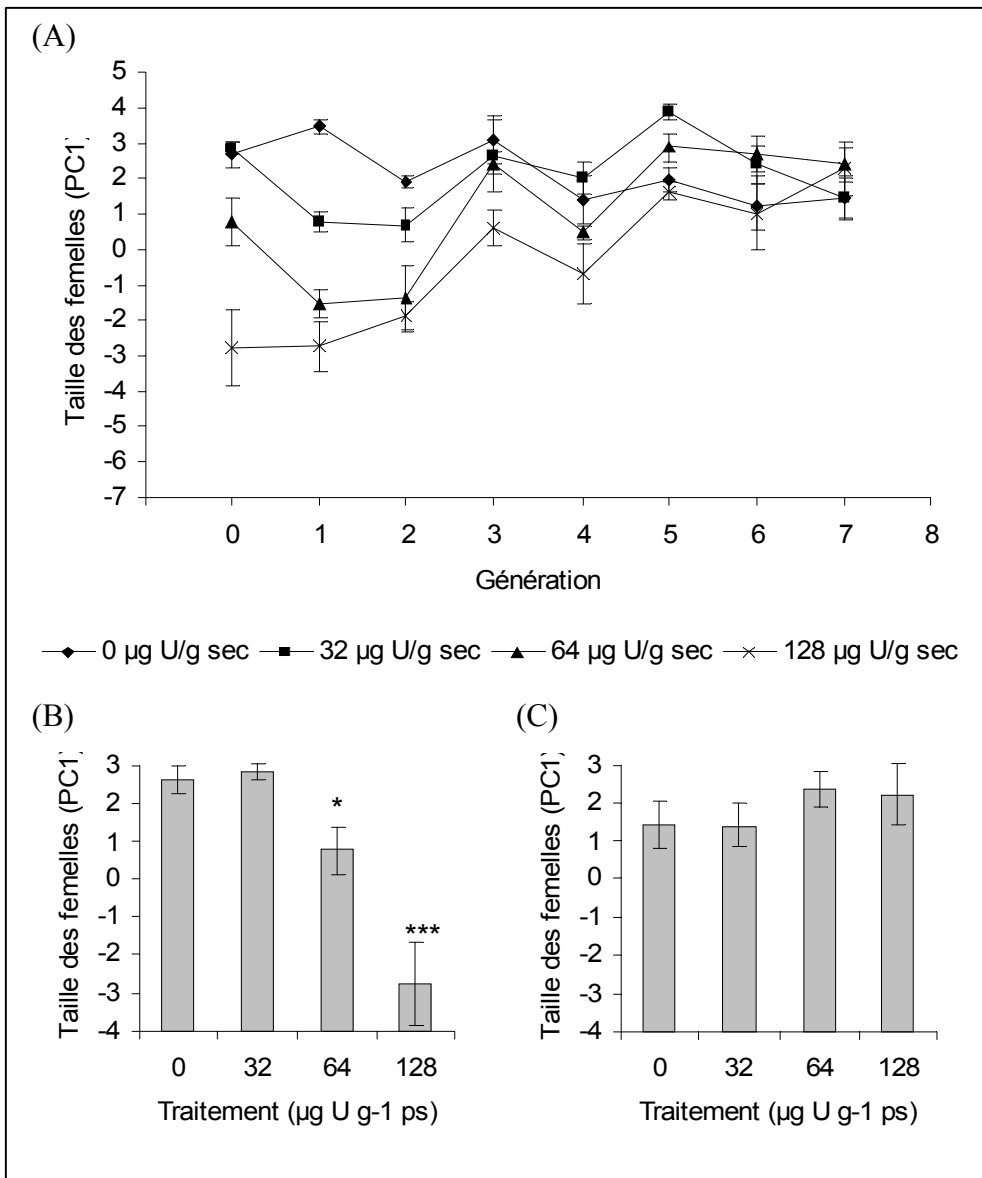


Figure 22. (A) Évolution de la taille des femelles (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) Tailles des femelles à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. * et *** indiquent une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ps}$) respectivement à $p < 0,05$, et $p < 0,001$ (test de Newman et Keuls).

L'étude de la réponse évolutive de la taille des mâles entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour les traitements 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement +0,44, +0,29 unités par génération (tableau 11). Pour les traitements 0 et 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, les régressions linéaires n'ont pas été significatives ($p > 0,05$).

L'étude de la réponse évolutive de la taille des femelles entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour les traitements 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement +0,63, +0,69 unités par génération (tableau 11). Pour les traitements 0 et 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, les régressions linéaires n'ont pas été significatives ($p > 0,05$).

3.4. Asymétrie fluctuante des adultes

L'analyse en composante principale réalisée sur le niveau d'asymétrie fluctuante (AF) des ailes a révélé une seule composante principale de valeur propre supérieure à un. Cette composante (niveau total d'AF) explique 70,3% de la variance totale des mesures. La contribution du niveau d'AF de chaque trait mesuré selon le niveau d'AF total est pour les traits 1, 2, 3, 4, 5 respectivement de 0,14, 0,19, 0,22, 0,23, 0,21.

L'ANOVA sur l'AF des ailes a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 13,4$; $p < 0,01$), de la génération ($F_{7,21} = 12,1$; $p < 0,001$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 5,9$; $p < 0,001$)(tableau 10).

A la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 23.B). L'AF aile a significativement augmenté avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). L'AF aile moyenne a respectivement été de -1,08, 1,13, 1,98, 4,89 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 23.B; tableau 10). L'AF aile moyenne a respectivement été de -0,94, -2,05, -0,96, -1,20 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), l'AF aile a varié de +0,14 unités PC1 pour le traitement contrôle, -3,18 unités PC1 pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, -2,94 unités PC1 pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et -6,09 unités PC1 pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 23).

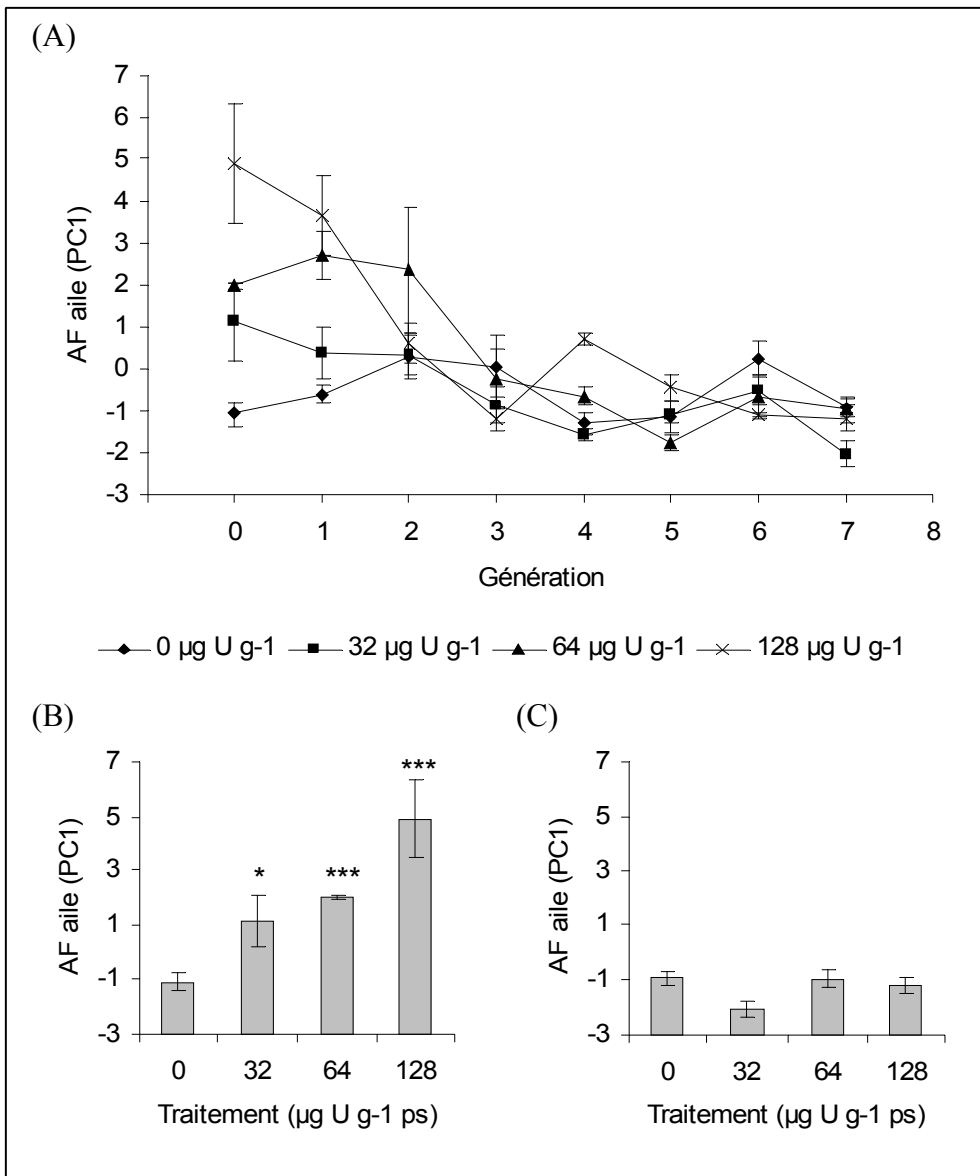


Figure 23. (A) Évolution de l'AF des ailes (moyenne \pm SE) au fil des générations en fonction du traitement. (B) AF des ailes à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. * et *** indiquent une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) respectivement à $p < 0,05$, et $p < 0,001$ (test de Newman et Keuls).

L'analyse en composante principale réalisée sur le niveau d'asymétrie fluctuante (AF) des pattes a révélée une seule composante principale de valeur propre supérieure à un. Cette composante (niveau total d'AF) explique 70,0% de la variance totale des mesures.

L'ANOVA sur l'AF des pattes a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 3,87$; $p < 0,05$), et de la génération ($F_{7,21} = 10,78$; $p < 0,001$), et l'absence d'effet significatif de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 0,91$; $p = 0,25$; tableau 10).

A la génération F0, aucun effet dose-réponse n' a été observé (figure 24.B). L'AF patte moyenne a respectivement été de 1,21, 0,54, 1,65, 2,32 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été observé (figure 24.B; tableau 10). L'AF patte moyenne a respectivement été de -1,27, -1,05, -0,82, -0,30 unités PC1 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), l'AF patte a varié de -2,48 unités PC1 pour le traitement contrôle, -1,59 unités PC1 pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, -2,48 unités PC1 pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et -2,62 unités PC1 pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 24).

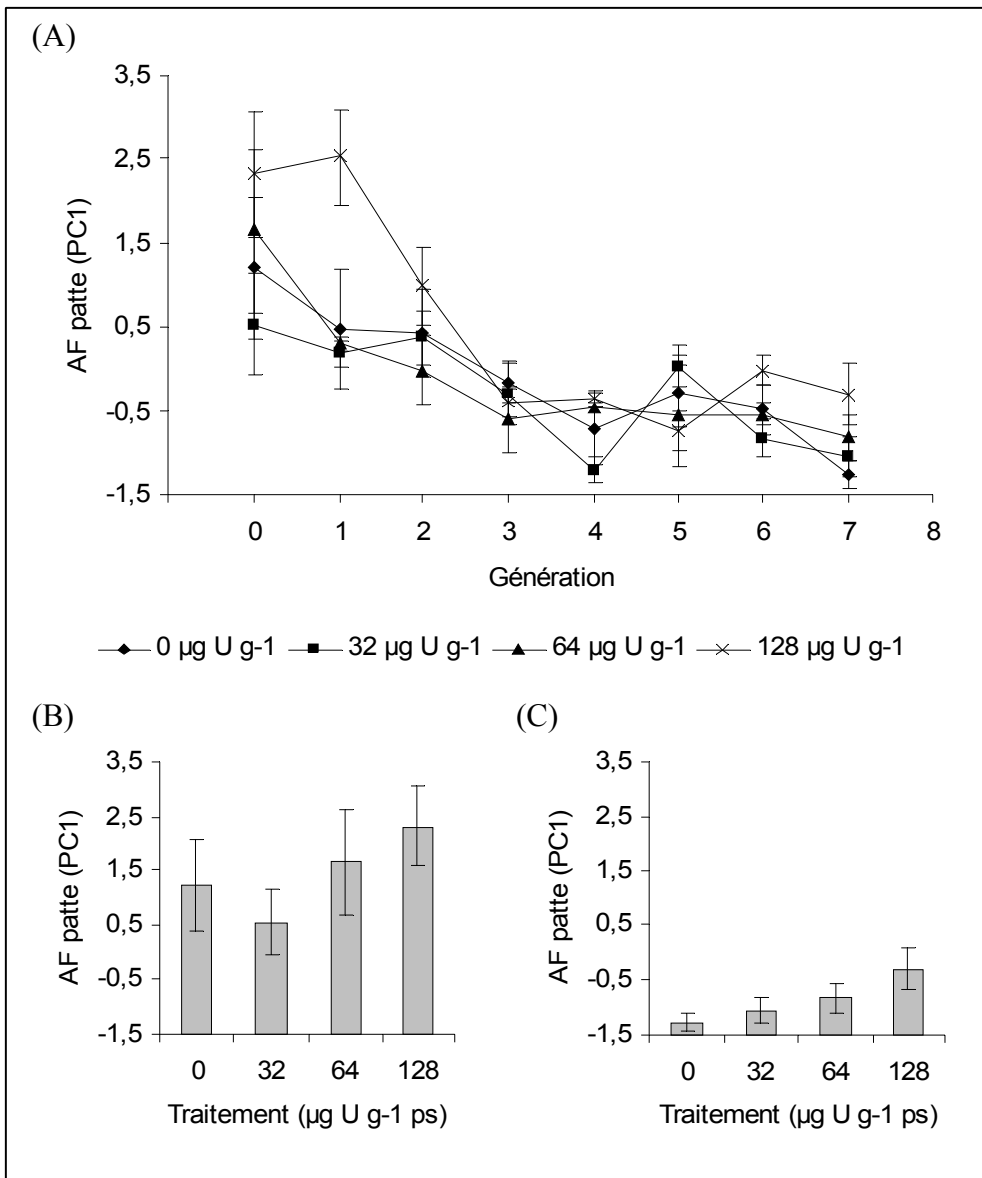


Figure 24. (A) Évolution de l'AF des pattes (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) AF des pattes à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$.

L'étude de la réponse évolutive de AF aile entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative vers une réduction de l'AF pour les traitements 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement -0,30, -0,54, -0,29 unités par génération (tableau 11). Pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la régression linéaire n'a pas été significative ($p < 0,05$).

L'étude de la réponse évolutive de AF patte entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative vers une réduction de l'AF pour les traitements 0, et 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement -0,26, -0,21 unités par génération (tableau 11). Pour les traitements 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la régression linéaire n'a pas été significative ($p > 0,05$).

3.5.Fécondité des femelles

L'ANOVA sur le nombre moyen d'œufs par masse a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 8,1$; $p < 0,01$), de la génération ($F_{7,21} = 4,5$; $p < 0,01$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 2,6$; $p < 0,01$; tableau 10).

A la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 25.B). Le nombre d'œufs par masse a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). Le nombre moyen d'œufs par masse a respectivement été de 675, 643, 580, 608 œufs pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, un effet dose-réponse a été observé (figure 25.C). Le nombre d'œufs par masse a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). Le nombre moyen d'œufs par masse a respectivement été de 654, 660, 685, 577 œufs pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), le nombre moyen d'œufs par masse a varié de -3,2% pour le traitement contrôle, +2,6% pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, +16,5% pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et -5,1% pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 25).

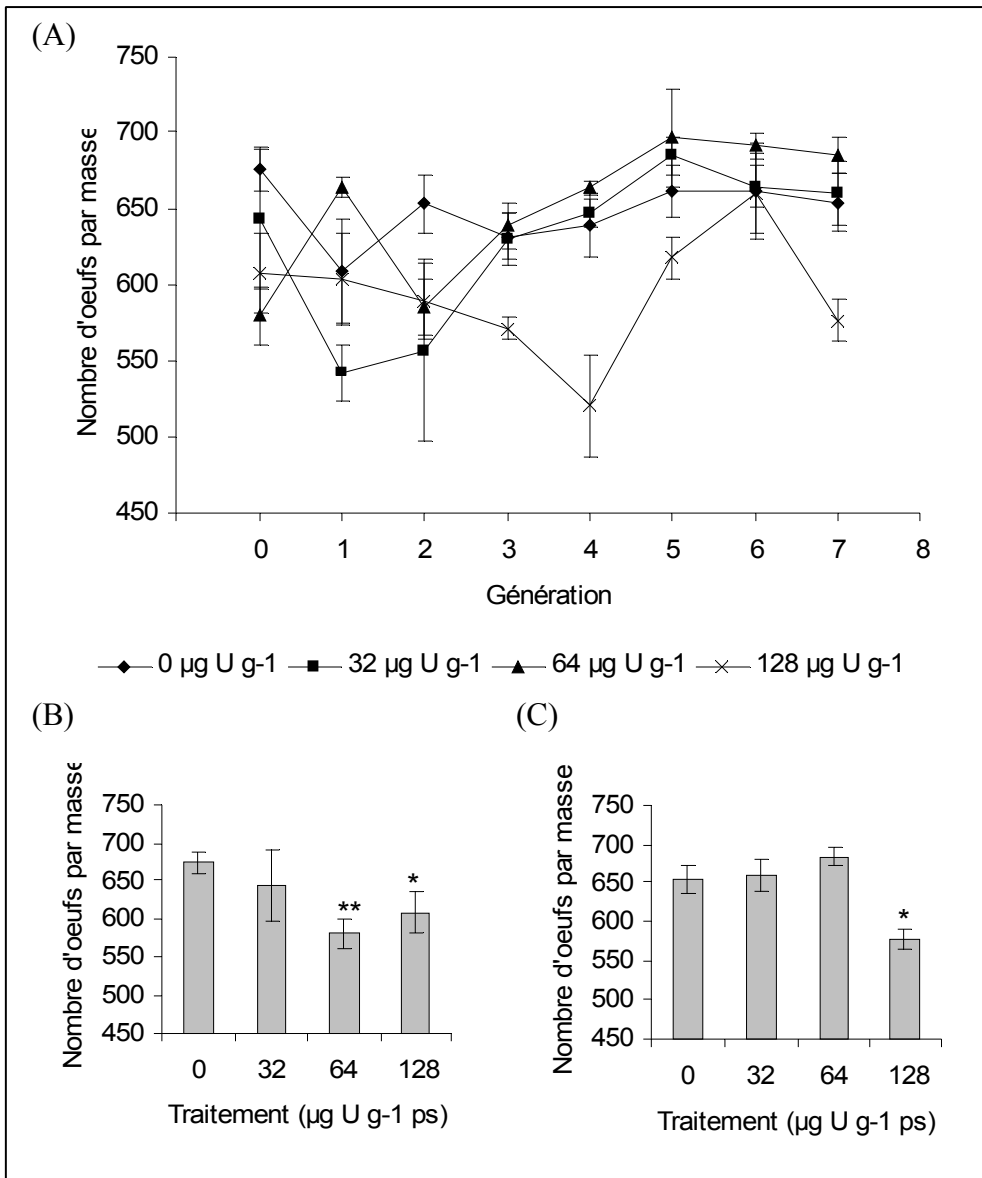


Figure 25. (A) Évolution du nombre d'œufs par masse (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) Nombre d'œufs par masse à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. * et ** indiquent une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) respectivement à $p < 0,05$, et $p < 0,01$ (test de Newman et Keuls).

L'étude de la réponse évolutive du nombre d'œufs par masse entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour les traitements 32, et 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, respectivement +18,81, +19,55 œufs par masse par génération (tableau 11). Pour les traitements 0 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la régression linéaire n'a pas été significative ($p > 0,05$).

3.6.Succès d'éclosion

L'ANOVA sur le succès d'éclosion des masses d'œufs a mis en évidence un effet significatif du traitement ($F_{3,9} = 4,2$; $p < 0,05$), de la génération ($F_{7,21} = 4,2$; $p < 0,01$), et de l'interaction traitement X génération ($F_{21,63} = 4,4$; $p < 0,001$; tableau 10).

À la génération F0, un effet dose-réponse a été observé (figure 26.B). Le taux de masses écloses a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). Le taux de masses écloses moyen a respectivement été de 0,89, 0,76, 0,73, 0,42 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

À la génération F7, un effet dose-réponse a été observé (figure 26.C). Le taux de masses écloses a significativement augmenté avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 10). Le taux de masses écloses a respectivement été de 0,37, 0,31, 0,58, 0,68 pour les traitements 0, 32, 64, 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), le taux de masses d'œufs écloses a varié de -82,3% pour le traitement contrôle, -84,3% pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, -22,2% pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, et +47,6% pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 26).

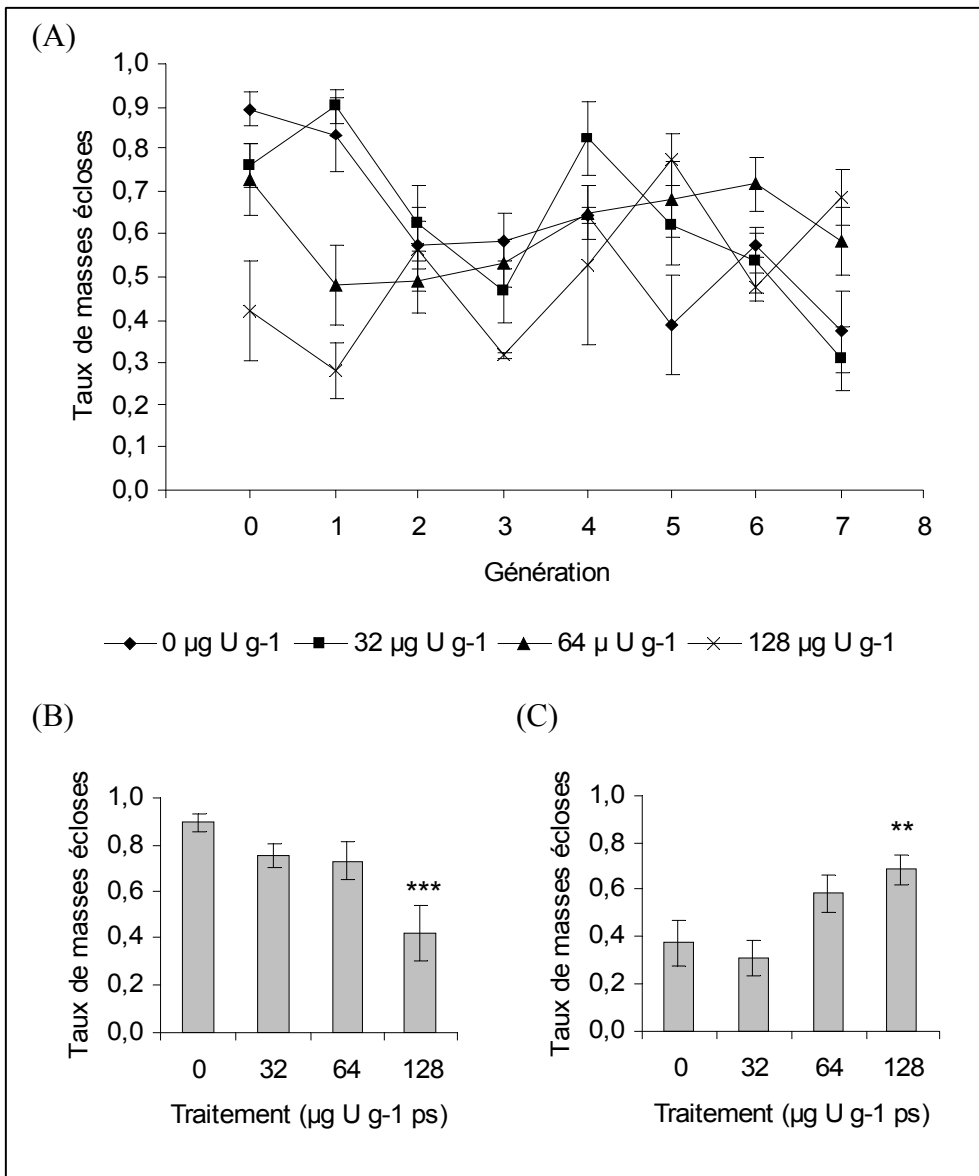


Figure 26. (A) Évolution du taux de masses écloses (moyenne \pm ES) au fil des générations en fonction du traitement. (B) Taux de masses écloses à la génération F0, et (C) à la génération F7. Pour chaque condition, $n=4$. ** et *** indiquent une différence significative avec le traitement témoin ($0 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$) respectivement à $p < 0,01$, et $p < 0,001$ (test de Newman et Keuls).

L'étude de la réponse évolutive du taux de masses écloses entre la génération F2 et la génération F7 n'a pas montré d'évolution significative pour tous les traitements (tableau 11).

3.7. Analyse en Composante Principale

L'analyse en composante principale (ACP) réalisée sur l'ensemble des valeurs moyennes des traits liés à la *fitness* des populations – génération et traitement confondus – a révélé trois composantes principales de valeurs propres supérieures à un. Notons qu'en raison du développement important de biofilm aux générations F3 et F4 du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, toutes les valeurs des traits liés à la *fitness* pour ces deux générations ont été exclues de l'ACP. La première composante (PC1) a expliqué 36,5% de la variance totale, la seconde composante (PC2) a expliqué 25,3% de la variance totale, et la troisième composante (PC3) a expliqué 15,8% de la variance totale. Au total, ces trois composantes ont expliqué 77,7% de la variance totale des valeurs. La contribution de chaque trait selon la composante principale est décrite dans le tableau 13.

Tableau 13. Contributions des traits sur les corrélations de l'ACP.

Critère mesuré	PC1 (36,5%)	PC2 (25,3%)	PC3 (15,8%)
Nombre total d'émergence	0,05	0,02	0,47
EmT50 mâle	0,16	0,26	0,03
EmT50 femelle	0,15	0,28	0,04
Taille des mâles	0,24	0,09	0,03
Taille des femelles	0,24	0,13	0,00
Nombre d'œufs par masse	0,13	0,00	0,20
Taux de masses écloses	0,03	0,22	0,22

Tableau 14. Corrélations entre les traits et les composantes PC1, PC2, PC3 de l'ACP.

Critère mesuré	PC1 (36,5%)	PC2 (25,3%)	PC3 (15,8%)
Nombre total d'émergence	$r = 0,36$ ***	n.s.	$r = -0,73$ ***
EmT50 mâle	$r = -0,65$ ***	$r = -0,67$ ***	$r = -0,19$ *
EmT50 femelle	$r = -0,65$ ***	$r = -0,71$ ***	$r = -0,23$ **
Taille des mâles	$r = 0,78$ ***	$r = -0,41$ ***	n.s.
Taille des femelles	$r = 0,78$ ***	$r = -0,48$ ***	n.s.
Nombre d'œufs par masse	$r = 0,58$ ***	n.s.	$r = -0,47$ ***
Taux de masses écloses	$r = 0,27$ **	$r = -0,62$ ***	$r = 0,49$ ***
Uranium	$r = -0,57$ ***	$r = 0,23$ **	$r = 0,38$ ***
Génération	$r = 0,53$ ***	$r = 0,43$ ***	n.s.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

n.s.: corrélation non significative ($p > 0,05$)

Tous les traits ont été significativement corrélés avec la PC1 (tableau 14). Les traits positivement corrélés avec la PC1 ont été le nombre d'émergences, la taille des mâles et des femelles, le nombre d'œufs par masse, le taux de masses écloses. Les traits négativement corrélés ont été le temps d'émergence des mâles et des femelles (figures 27.A et 29.A). La génération a été positivement corrélée avec la PC1 alors que la concentration en uranium a été négativement corrélée.

Une ANOVA a été réalisée sur la PC1 en fonction du traitement et de la génération. Des effets significatifs du traitement ($F = 35,07$; $p < 0,001$), de la génération ($F = 35,18$; $p < 0,001$), ainsi que de l'interaction traitement X génération ($F = 3,19$; $p < 0,001$) ont été mis en évidence (figures 27.B, 29.B, et 28).

A la génération F0, la PC1 a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium à partir du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La PC1 avait une valeur moyenne de 1,04, 0,61, -0,77, -3,20 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, aucun effet dose-réponse n'a été détecté. La PC1 avait une valeur moyenne de 1,04, 1,37, 1,48, 0,42 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), la PC1 n'a pas varié pour le traitement $0 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, a varié de +1,98 unités pour le traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de +2,25 unités pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de +3,62 unités pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

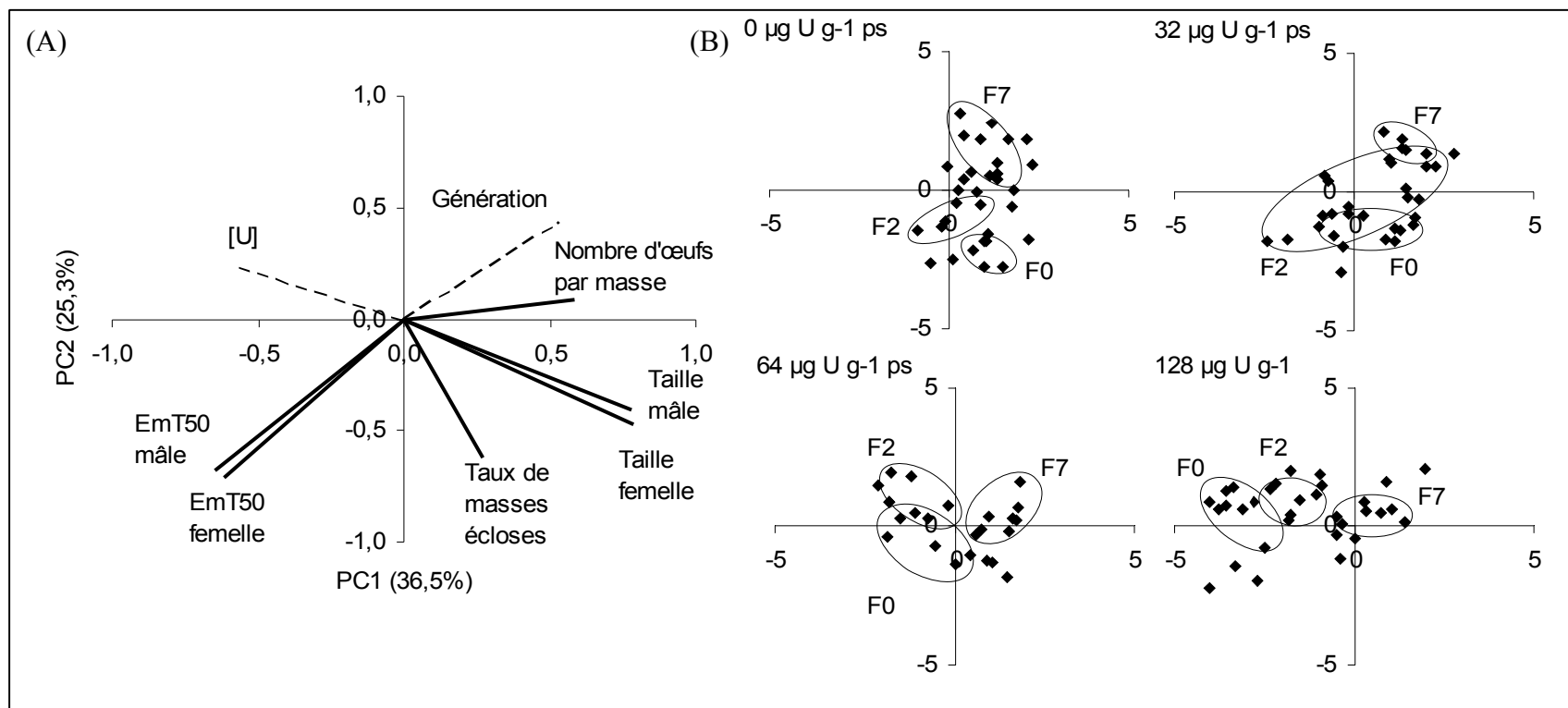


Figure 27. (A) Projection selon PC1 et PC2 de l'ACP des traits liés à la fitness des populations. Seuls les traits ayant un coefficient de corrélation $\geq 0,4$ avec au moins une des deux composantes principales sont représentés sur le graphique. La variable [U] et la variable génération sont illustratives, et n'ont de fait, pas été inclus dans le calcul de l'ACP. (B) Pour chaque traitement, projection sur PC1 et PC2 de l'ACP des valeurs moyennes à chaque génération des traits directement liés à la fitness des populations selon leurs coordonnées factorielles.

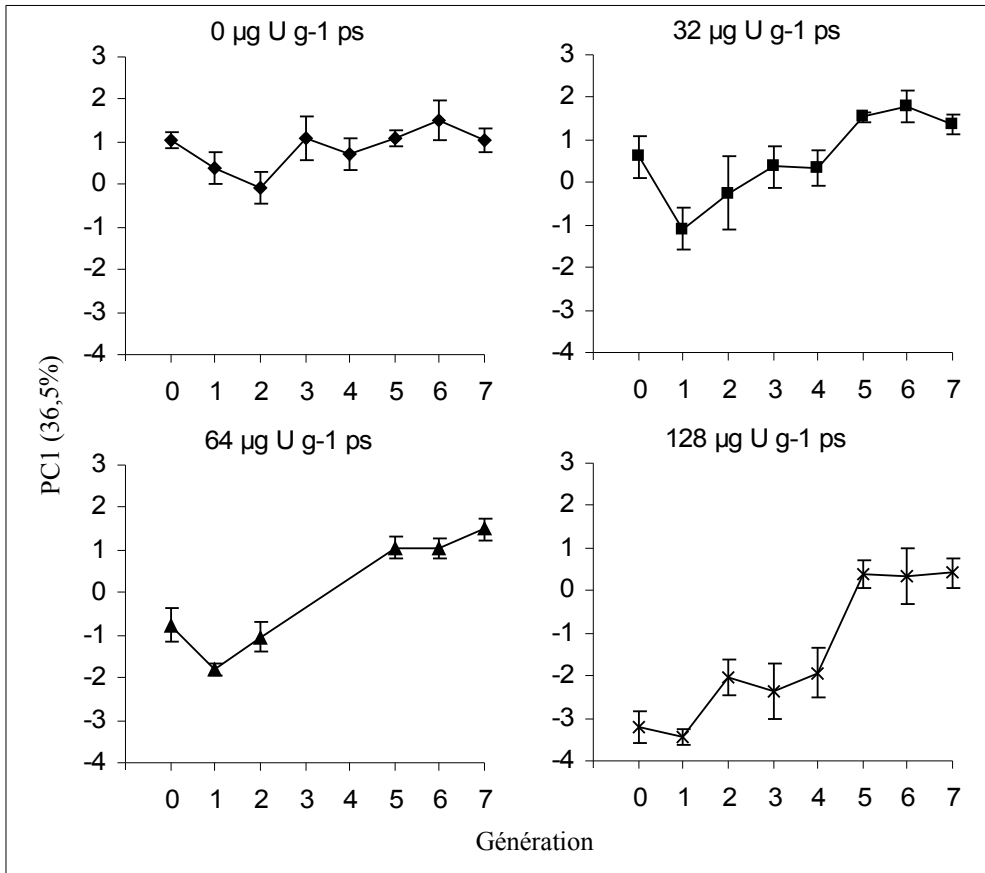


Figure 28. PCI (moyenne \pm ES) à chaque génération en fonction du traitement. Pour chaque condition, $n=4$.

L'étude de la réponse évolutive de la PC1 entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,21 \pm 0,09$ unités par génération; $t = 2,25$; $p = 0,03$), pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,39 \pm 0,11$ unités par génération; $t = 3,45$; $p < 0,01$), pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,51 \pm 0,07$ unités par génération; $t = 6,82$; $p < 0,001$), pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,63 \pm 0,13$ unités par génération; $t = 4,87$; $p < 0,001$).

Aucun trait n'a été positivement corrélé avec la PC2 (tableau 14, figures 27.A). Les traits négativement corrélés avec la PC2 ont été le temps d'émergence des mâles et des femelles, la taille des mâles et des femelles, le taux de masses écloses. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la PC2 et le nombre d'émergence ($p = 0,06$), ainsi que le nombre d'œufs par masse ($p = 0,34$).

Notons que la génération a été positivement corrélée avec la PC2, ainsi que la concentration en uranium.

Une ANOVA a été réalisée sur la PC2 en fonction du traitement et de la génération. Des effets significatifs du traitement ($F = 9,34$; $p < 0,001$), de la génération ($F = 25,36$; $p < 0,001$), ainsi que de l'interaction traitement X génération ($F = 11,41$; $p < 0,001$) ont été mis en évidence (figures 27.B, et 30).

A la génération F0, la PC2 a significativement augmenté avec l'augmentation de la concentration d'uranium à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La PC2 avait une valeur moyenne de -2,17, -1,36, -0,57, 0,54 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, la PC2 a significativement diminué avec l'augmentation de la concentration d'uranium à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La PC2 avait une valeur moyenne de 1,69, 1,71, 0,58, 0,39 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), la PC2 a varié de +3,86 unités pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de +3,07 unités pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de +1,15 unités pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de -0,15 unités pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

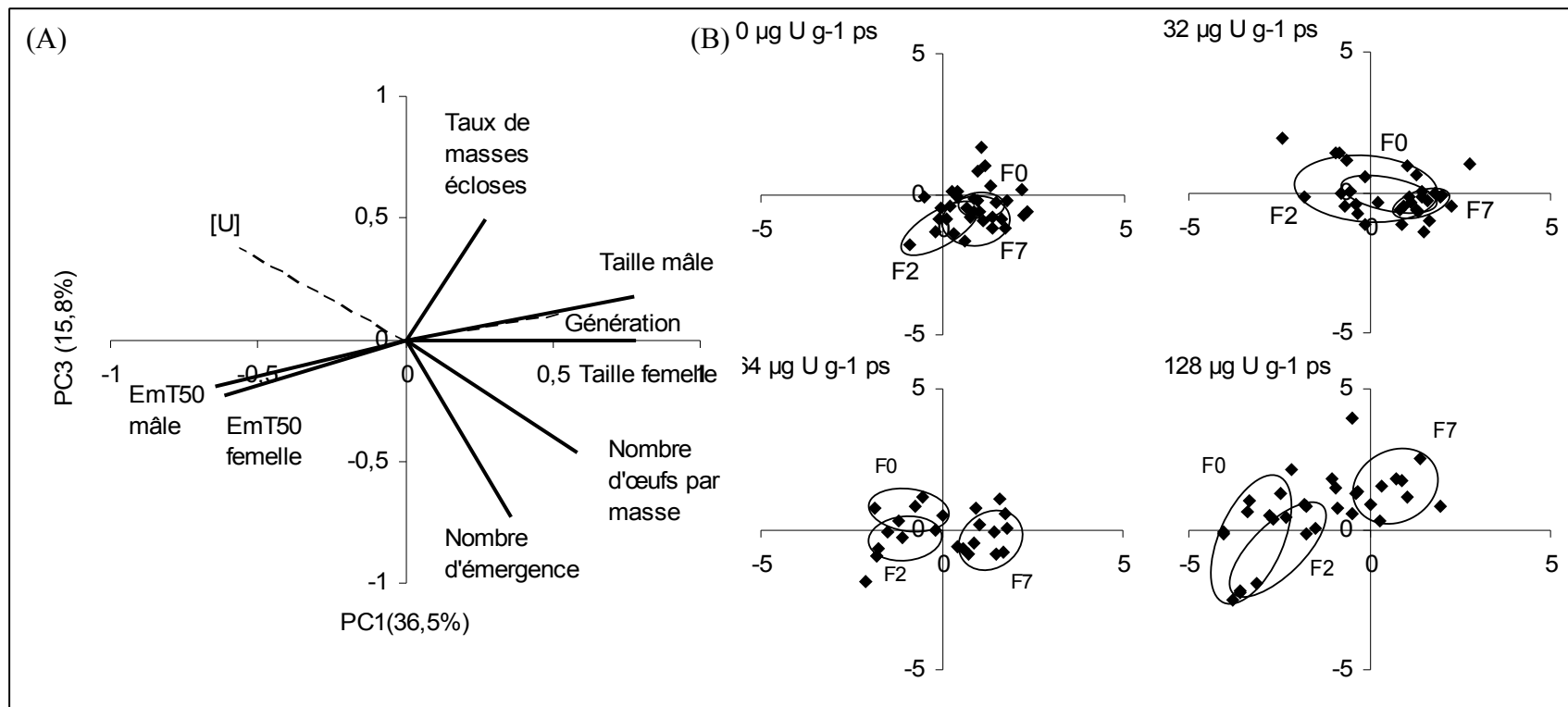


Figure 29. (A) Projection selon PC1 et PC3 de l'ACP des traits liés à la fitness des populations. Seuls les traits ayant un coefficient de corrélation $\geq 0,4$ avec au moins une des deux composantes principales sont représentés sur le graphique. La variable [U] et la variable génération sont illustratives, et n'ont de fait, pas été inclus dans le calcul de l'ACP. (B) Pour chaque traitement, projection sur PC1 et PC3 de l'ACP des valeurs moyennes à chaque génération des traits directement liés à la fitness des populations selon leurs coordonnées factorielles.

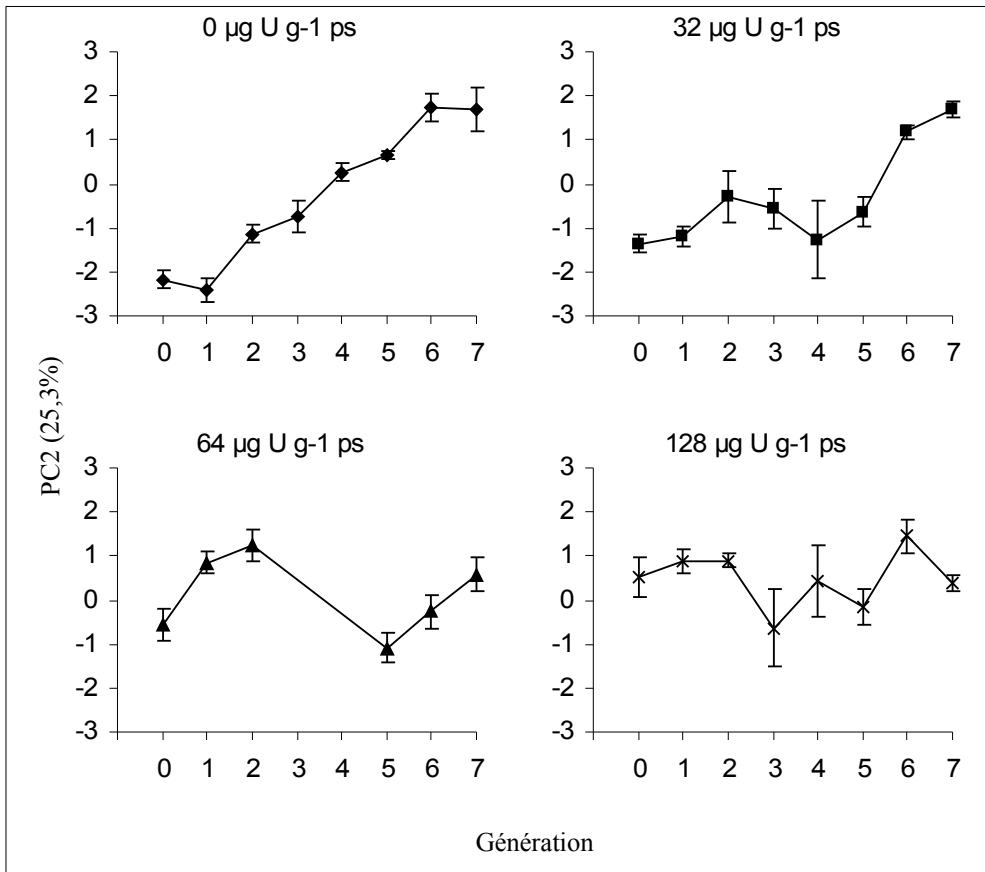


Figure 30. PC2 (moyenne \pm ES) à chaque génération en fonction du traitement. Pour chaque condition, $n=4$.

L'étude de la réponse évolutive de la PC2 entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution significative pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,63 \pm 0,07$ unités par génération; $t = 8,57$; $p < 0,001$), pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,45 \pm 0,14$ unités par génération; $t = 3,20$; $p < 0,01$), et non significative pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($-0,20 \pm 0,14$ unités par génération; $t = -1,38$; $p = 0,19$), et le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,07 \pm 0,14$ unités par génération; $t = 0,50$; $p = 0,62$).

Seul le taux de masses écloses a présenté une corrélation positive avec la PC3 (tableau 14). Les traits négativement corrélés avec la PC3 ont été le nombre d'émergences, le temps d'émergence des mâles et des femelles, le nombre d'œufs par masse (figures 29.A). Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la PC3 et la taille des mâles ($p = 0,05$) et des femelles ($p = 0,96$).

Notons que la génération n'a pas été significativement corrélée avec la PC3 ($p = 0,30$), alors que la concentration en uranium l'a été positivement.

Une ANOVA a été réalisée sur la PC3 en fonction du traitement et de la génération. Des effets significatifs du traitement ($F = 5,57$; $p < 0,01$), de l'interaction traitement X génération ($F = 3,99$; $p < 0,001$) ont été mis en évidence (figures 29.B, et 31).

A la génération F0, aucun effet dose-réponse n'a été détecté. La PC3 avait une valeur moyenne de -0,41, -0,24, 0,79, -0,16 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

A la génération F7, la PC3 a significativement augmenté avec l'augmentation de la concentration d'uranium à partir du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La PC3 avait une valeur moyenne de -0,92, -0,51, -0,29, 1,44 unités respectivement pour le traitement 0, 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Entre la première (F0) et la dernière génération (F7), la PC3 a varié de -0,51 unités pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de -0,75 unités pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de -1,08

unités pour le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, de +1,60 unités pour le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

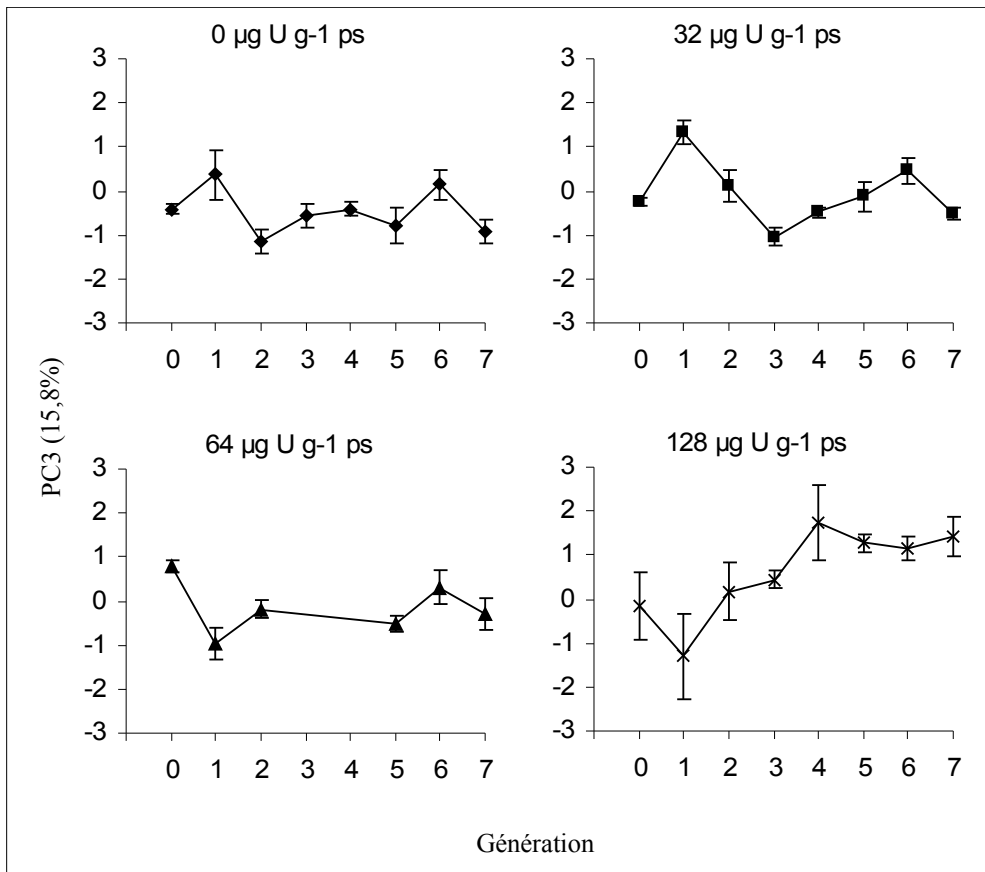


Figure 31. PC3 (moyenne \pm ES) à chaque génération en fonction du traitement. Pour chaque condition, $n=4$.

L'étude de la réponse évolutive de la PC3 entre la génération F2 et la génération F7 a montré une évolution non significative pour le traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,09 \pm 0,08$ unités par génération; $t = -1,07$; $p = 0,30$), pour le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,05 \pm 0,08$ unités par génération; $t = -0,60$; $p = 0,56$), pour le traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,02 \pm 0,08$ unités par génération; $t = -0,26$; $p = 0,80$), pour le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ($0,24 \pm 0,12$ unités par génération; $t = 1,94$; $p = 0,06$).

4. Discussion

Cette expérience a permis de caractériser les effets au niveau du stade adulte d'une exposition de larves *Chironomus riparius* à un sédiment contaminé à l'uranium, et de suivre les modifications phénotypiques au cours des huit générations d'exposition.

L'analyse de l'ensemble des mesures physico-chimiques décrites en annexe 4 a permis de considérer tous les effets biologiques observés en fonction de la concentration en uranium dans le milieu, et de la modification au cours des générations de la réponse des populations de *Chironomus riparius* à sa présence. De plus, le pourcentage moyen d'émergences dans le traitement contrôle au cours des huit générations supérieur à 70% a validé les conditions d'exposition (EPA, 2000; OECD, 2001).

Au cours de la génération F3 et F4, un important développement de biofilm à la surface du sédiment a été observé dans tous les répliquats du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ (figure 16). Aucune des mesures réalisées durant ces deux générations n'a permis de relier ce développement très important à un des paramètres physico-chimiques mesurés. Les conséquences de la présence d'un tel biofilm au niveau des traits phénotypiques mesurés ont été un retard très important des émergences mâles et femelles (figures 18 et 19), cause probable de la baisse du nombre d'émergences (figure 17). Pour ces raisons, le nombre d'émergence, ainsi que le temps d'émergence des mâles et des femelles du traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ aux générations F3 et F4 ont été exclus des analyses des réponses évolutives du nombre d'émergences, du temps d'émergence des adultes, ainsi que l'ACP réalisée sur l'ensemble des valeurs moyennes des traits liés à la *fitness* des populations.

4.1. Effets de l'uranium sur les adultes *Chironomus riparius*

Nos résultats révèlent un effet important du traitement sur chaque trait mesuré, à l'exception du temps d'émergence des femelles (EmT50 femelle)(tableau 10). Afin de caractériser les effets de l'uranium sur les adultes *Chironomus riparius*, seront discutés

pour chaque trait les résultats de la génération F0. En effet, c'est au cours de cette génération que nos populations ont subi le changement d'environnement. Les populations étant issues de la même population d'élevage, seul un environnement différent a été responsable des différences observées entre les traitements.

4.1.1. Nombre d'émergences

A la génération F0, une relation dose-réponse entre le nombre d'émergences et la concentration en uranium a été mise en évidence, avec une LOEC de $64 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ (figure 17). Ce seuil de létalité est inférieur à celui mesuré lors de l'expérience 1, où après sept jours d'exposition, la survie des larves avait significativement diminué à partir de $512 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ (figure 5). Or des observations au cours de la période d'émergence ont montré dans les traitements contaminés à l'uranium des larves d'une taille supérieure au centimètre mortes à la surface du sédiment, et des émergences avortées. Une mortalité tardive due à l'uranium est survenue entre le septième jour d'exposition et l'émergence.

De nombreuses études sur *Chironomus sp* ont montré que la sensibilité des larves à la présence de toxique diminuait avec le stade larvaire (Nebeker *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1986; Naylor et Howcroft, 1997; Ristola *et al.*, 1999). Nos résultats sont du même ordre. En effet dans ces études, les auteurs ont exposé des larves à un toxique, en faisant varier le stade des larves à l'ensemencement. La mortalité a ensuite été mesurée après quelques jours d'exposition. Ainsi à temps d'exposition équivalent, les larves de stade précoce sont plus sensibles. A partir de ces résultats, il est communément admis que la mortalité de larves de *Chironomus sp* exposées à un toxique surviendrait en début d'exposition. Si nos observations à la génération F0 – mais également aux autres générations – ont montré une mortalité tardive, elle ne peut pas expliquer à elle seule la diminution du nombre d'émergences dans les traitements contaminés à l'uranium, le nombre de larve mortes à la surface du sédiment ainsi que d'émergences avortées étant relativement faible (<20). Néanmoins, celle-ci doit être considérée, au vue de la différence importante de seuil de mortalité entre la $\text{LOEC}_{7 \text{ jours}}$ de $512 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$

obtenue lors de l'expérience 1 (figure 5), et la LOEC_{émergence} à la génération F0 de 64 µg U g⁻¹ ps (figure 17.B).

Cette mortalité tardive peut s'expliquer selon l'hypothèse qu'elle serait la conséquence indirecte d'une exposition à l'uranium, notamment à travers une perturbation de la stabilité du développement des larves sensibles, déjà mise en évidence pour des concentrations en uranium $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps après sept jours d'exposition (augmentation significative du pourcentage de larves malformées après sept jours; figure 8). Cette hypothèse sera décrite ultérieurement.

4.1.2.Succès reproducteur des adultes

Lors de la génération F0, le nombre d'œufs par masse et le taux de masses écloses ont montré que l'exposition à l'uranium avait entraîné une baisse significative du succès reproducteur des adultes pour des concentrations $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figures 25 et 26). A ces concentrations, l'exposition à l'uranium avait également entraîné des effets négatifs sur la taille des adultes (figures 21 et 22) et le temps de développement des larves (figure 6). Cette baisse du succès reproducteur des adultes peut être interprétée comme la conséquence de l'inhibition de croissance et du retard de développement larvaire déjà mis en évidence lors de l'expérience 1.

La taille des adultes est un paramètre fortement corrélé avec la fécondité et le succès reproducteur chez de nombreuses espèces animales (Neems *et al.*, 1990; Roff, 1992; Stearns, 1992; Honek, 1993; Mc Lachlan et Cant, 1995; McLachlan, 1997; Sibley *et al.*, 2001; Kingsolver et Huey, 2003; Mc Lachlan *et al.*, 2003; Engqvist, 2007; Kingsolver *et al.*, 2007; Steiger *et al.*, 2007; Tschirren *et al.*, 2009; Kasumovic et Andrade, 2009). L'importance de la taille de la femelle sur la fécondité a été très étudiée chez les insectes. Ainsi les femelles de grande taille ont une meilleure fécondité que les femelles plus petites. Par exemple, dans une étude sur les traits influençant les performances de reproduction de *Chironomus tentans*, Sibley *et al.* (2001) ont montré que la taille des femelles influençait leur fécondité. Des études antérieures sur *Chironomus sp* avaient

également mis en évidence une corrélation positive entre la taille des femelles et leur fécondité (Xue et Ali, 1994; Sibley *et al.*, 1997).

Si la relation taille des femelles/fécondité a été très étudiée, très peu d'études se sont en revanche intéressées à l'influence de la taille du mâle sur la fécondité. Sibley *et al.* (2001) ont montré que la taille des mâles avait un effet négligeable sur la fécondité de *Chironomus tentans*. Pourtant d'autres études sur les insectes ont montré qu'elle pouvait influencer significativement la fécondité. Cette influence étant liée à l'augmentation, avec la taille, de la quantité de nutriment délivrés par le spermatophore au cours de l'accouplement (Neems *et al.*, 1998), ou encore de la qualité du sperme (Schlüns *et al.*, 2003). Chez l'abeille *Apis mellifera*, par exemple, le sperme des mâles de petites tailles est de moins bonne qualité que celui des mâles plus gros (Schlüns *et al.*, 2003).

L'exposition de larves *Chironomus sp* à un toxique engendre généralement un retard de développement qui peut être mis en évidence par une augmentation du temps moyen d'émergence. Cela a été déjà démontré notamment pour le cuivre (Kosalwat et Knight, 1987), le cadmium (Pascoe *et al.*, 1989; Postma et Davids, 1995; Watts et Pascoe, 2000; Vogt *et al.*, 2007; Nowak *et al.*, 2007), les herbicides clomazone et thiobencarb (Burdett *et al.*, 2001), le chlorpyrifos (Callaghan *et al.*, 2001), le lindane (Hirthe *et al.*, 2001), le 17 α -éthynylestradiol et le bisphénol-A (Watts *et al.*, 2001), le pirimiphos (Crane *et al.*, 2002), le tributylétain (Vogt *et al.*, 2007). Pour l'uranium, les résultats obtenus à la génération F0 n'ont pas permis de mettre en évidence un retard de développement au niveau des émergences (tableau 10, figures 18 et 19). Tous traitements confondus, l'EmT50 mâle a été de 16,1 jours, et l'EmT50 femelle a été de 18,6 jours. Ces temps d'émergence sont comparables à d'autres déjà mesurés sur *Chironomus riparius* placés dans des conditions de température et de nourriture similaires à notre expérience (Watts *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2000). Si la présence d'uranium à des concentrations $\leq 128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps n'a pas eu d'effet sur le temps d'émergence des adultes (tableau 10; figures 18 et 19), la largeur de capsule céphalique des larves survivantes, après sept jours d'exposition, mesurée lors de l'expérience a en revanche montré que l'uranium avait entraîné un retard significatif du développement larvaire à partir de $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps

(tableau 8; figure 6). Ces deux résultats sembleraient indiquer que le retard de développement engendré par l'uranium après sept jours d'exposition à des concentrations $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps aurait été rattrapé au cours du quatrième stade larvaire et du stade nymphe pour finalement être négligeable au niveau des émergences des adultes.

Selon l'hypothèse de la taille critique⁹, un raccourcissement de la période entre le moment où la taille limite est atteinte par la larve de quatrième stade et l'émergence permet d'expliquer l'absence de retard d'émergence dans les traitements $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figures 18 et 19). Cette période étant celle au cours de laquelle se développent les gamètes, son raccourcissement pourrait expliquer la diminution observée du succès reproducteur des adultes observée dans ces traitements.

Ces résultats montrent dans nos conditions d'exposition qu'une concentration $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps a entraîné une diminution significative de la survie et du succès reproducteur des individus exposés. De tels effets mesurés au niveau de l'individu ont des conséquences sur la dynamique de la population, à travers la diminution de sa *fitness* moyenne de la population. En effet, chez les espèces semelpares, telles que *Chironomus riparius*, les adultes ne se reproduisant qu'une fois dans leur vie, la diminution du nombre d'individus aptes à se reproduire, ainsi qu'une baisse de la fécondité vont avoir un fort impact sur la croissance de la population, comme cela a déjà été démontré en appliquant à partir de résultats comparables des modèles de dynamique de population (Calow *et al.*, 1997; Forbes et Calow, 2002; Ducrot *et al.*, 2004). L'exposition à l'uranium a donc induit un stress qui a conduit à une baisse significative de la *fitness* moyenne des populations exposées.

9 Au cours des trois premiers stades larvaires, c'est la croissance somatique qui domine, le développement des gamètes ne débutant qu'au cours du quatrième stade (Postma et Davids, 1995). La larve doit alors atteindre une taille critique avant d'allouer de l'énergie à la production des gamètes (Sibley *et al.*, 1997). Cette hypothèse d'une taille limite à partir de laquelle la croissance des larves au quatrième stade s'arrête pour laisser place à une phase de préparation à l'émergence a été validée par Pery (2003).

4.1.3. AF des adultes¹⁰

A la génération F0, l'exposition des larves à l'uranium a entraîné une augmentation significative de l'AF aile des adultes à partir de 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 23; tableau 10). Ce résultat est venu confirmer l'effet tératogène de l'uranium à des concentrations sublétales déjà mis en évidence lors de l'expérience 1 avec l'augmentation significative par rapport au traitement contrôle du pourcentage de larves malformées (figure 8). En revanche, l'uranium n'a pas eu d'effet significatif sur l'AF au niveau des pattes (figure 24).

Ce résultat est venu confirmé un certain nombre de travaux, qui ont souligné l'importance du choix du trait morphométrique pour l'étude de l'AF chez des populations soumises à un stress (Clarke *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2002; Clarke, 2003). Plusieurs hypothèses expliquent les différences de réponses : (i) L'efficacité des processus visant à maintenir un développement stable variant d'un caractère morphologique à l'autre (Clarke, 1995; Clarke, 1995; Clarke *et al.*, 2000; Woods *et al.*, 2002; Dongen, 2006). (ii) Des caractères morphologiques dont le développement est survenu à des moments différents au cours de la vie de l'organisme, et qui par conséquent ne subissent pas nécessairement l'effet du stress de la même manière (Hoffmann et Woods, 2003). A notre connaissance, il n'existe aucune donnée sur le développement des ailes et des pattes de *Chironomus sp* qui permet de supporter une hypothèse plutôt qu'une autre. Néanmoins, nos résultats indiqueraient que l'aile est un bon caractère pour l'étude des effets d'un stress environnemental tel que la présence d'un polluant sur la stabilité du développement. Ainsi à la génération F0, dans les traitements pour lesquels une baisse significative de la *fitness* des adultes a été observée, on a également constaté une augmentation significative de l'AF moyenne au niveau des ailes des adultes ayant émergé.

¹⁰ L'étude de l'asymétrie fluctuante sur les adultes *Chironomus riparius* de l'expérience 2 a été l'objet d'un projet de master intitulé « Effet d'un sédiment contaminé à l'uranium sur l'asymétrie fluctuante de *Chironomus riparius* ». L'ensemble des résultats et leur discussion ont été synthétisés dans le rapport de Master de Philippe Signoret (2008). Seule la synthèse sous forme d'analyses en composante principale sur les mesures d'AF effectuées au niveau des ailes et des pattes sera discutée ici.

L'exposition à un toxique est connue pour potentiellement induire une augmentation de l'AF des individus. Par exemple, une telle relation dose-effet a déjà été démontrée chez l'échinoderme *Psammechinus miliaris* exposé au 2,4-decadienal (Caldwell *et al.*, 2005), chez l'odonate *Xathocnemis zealandica* exposée au carbaryl (Hardersen, 2000; Hardersen et Frampton, 1999; Hardersen et Wratten, 1998), chez les larves *Chironomus riparius* exposées à différents types de perturbation (organique, chlorure, nitrite et ammonium, rejet industriel; Servia *et al.*, 2004). De même, les résultats d'AF moyenne au niveau des ailes des adultes à la génération F0 ont permis de mettre en évidence le rôle de l'uranium comme agent perturbateur du développement.

Dans l'expérience 1, l'hypothèse de mortalité différenciée (Floate et Fox, 2000) permettrait d'expliquer après sept jours d'exposition à l'uranium, l'augmentation du pourcentage de larves malformées entre 32 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}\text{ps}$, puis la chute de ce pourcentage qui devient nul pour des concentration $\geq 256 \mu\text{g U g}^{-1}\text{ps}$ (figure 8). A la génération F0 de l'expérience 2, cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer la mortalité tardive des larves, ainsi que l'augmentation du niveau d'AF des ailes chez les adultes observées, en supposant alors qu'il existe un lien entre la *fitness* des individus et leur stabilité du développement, et qu'au sein de nos populations existerait une variabilité de cette stabilité du développement. En effet, la mortalité tardive décrite précédemment a été observée dans tous les traitements uranium, où un effet tératogène a également été mis en évidence. Ainsi, en considérant une population hypothétique constituée d'une petite portion d'individus tolérants capables de maintenir un niveau d'AF acceptable en présence d'uranium, dans le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}\text{ps}$, l'augmentation du niveau d'AF des individus sensibles élèverait le niveau d'AF moyen de la population. Puis à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}\text{ps}$, une fraction croissante des individus sensibles mourait avant de devenir adulte.

4.1.4. Conclusion sur les effets d'une exposition à l'uranium sur les adultes *Chironomus riparius*

La génération F0 a permis de mettre en évidence un effet négatif significatif de l'uranium sur les adultes *Chironomus riparius* à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. En effet, c'est à partir de cette concentration qu'une baisse nette de la *fitness* de la population a été mesurée à travers une diminution significative de la survie des larves entraînant une diminution du nombre d'adultes aptes à se reproduire, un retard de développement larvaire ayant eu des répercussions sur la taille moyenne des adultes, ainsi que sur les performances de reproduction, avec une baisse de la fécondité des femelles et du taux de masses écloses. Pour les mêmes traitements, une augmentation significative de l'AF au niveau des ailes a aussi été mesurée. A partir des données de la littérature, des résultats après sept jours d'exposition de mortalité des larves et de pourcentage de larves malformées de l'expérience 1, seraient présents dans nos populations des individus plus tolérants à l'uranium que d'autres. Dans un environnement contaminé à l'uranium, ces derniers sont capables notamment de survivre tout en ayant un développement plus stable.

Ainsi dans cette étude, la réunion, à la fois d'un environnement stressant et de populations au sein desquelles existeraient des différences de *fitness* entre les individus, laisse supposer la mise en place de mécanismes adaptatifs afin de réduire les effets toxique de l'uranium (Van Straalen et Timmermans, 2002; Bijlsma et Loeschcke, 2005). Le suivi des paramètres de *fitness* et d'AF dans les traitements au fil des générations permettra de confirmer si nos populations se sont adaptées localement à la présence d'uranium, et si oui ou non, les individus de faible asymétrie présentent un avantage sélectif. Si c'est le cas, la réponse à la sélection de l'AF sera alors un retour progressif à des niveaux comparables aux populations contrôles (Hoffmann et Woods, 2003).

4.2.Modifications phénotypiques au fil des générations – réponses évolutives

4.2.1.Micro-évolution

Dans la littérature, une pollution métallique nouvelle est synonyme pour les populations exposées de pression de sélection directionnelle (Posthuma et Van Straalen, 1993; Klerks, 1987). Au sein de ces populations, seuls les individus les plus tolérants survivent et se reproduisent. A partir de ce constat, les micro-évolutions mises en évidence chez les populations exposées au cours de l'expérience seront discutées selon l'hypothèse qu'une sélection directionnelle a agi au cours des huit générations et qu'elle a favorisé les individus les plus tolérants, c'est à dire ceux capables de survivre et de se reproduire en présence d'uranium.

Les résultats montrent que l'ensemble des traits phénotypiques mesurés ont été significativement influencés par le traitement et que cet effet diffèrait selon la génération (tableau 10). Pour chaque traitement, l'ensemble des mesures physico-chimiques (annexe 4) réalisées au cours de l'expérience n'ont pas révélé de différence entre les générations. De plus, la concentration en uranium étant différente d'un traitement à l'autre, et les populations issues d'un même élevage, les modifications phénotypiques observées au cours des générations indiquent que chaque population a réagi spécifiquement à son environnement. Ces modifications sont d'origine génétique, l'environnement étant constant au fil des générations (Falconer et Mackay, 1996). De plus, selon le traitement et le trait phénotypique étudié, nous avons pu observer une réponse évolutive significative (pente de régression entre la génération F2 et F7; tableau 11). Ainsi pour chaque traitement, nos résultats montrent l'existence d'une micro-évolution des traits phénotypiques analysés (Hendry et Kinnison, 1999, 2001).

4.2.1.1. Traitement contrôle (0 µg U g⁻¹ ps)

Dans le traitement contrôle (0 µg U g⁻¹ ps), le temps d'émergence des mâles et des femelles a diminué au cours de l'expérience (figures 18, 19; tableau 11). Ces changements inter-génération indiquent : (i) qu'un changement environnemental non contrôlé au cours du temps aurait conduit à un développement plus rapide des individus; (ii) qu'une force sélective inattendue autre que l'uranium, a agi sur les populations au cours de l'expérience 2.

Bien qu'il soit difficile d'écarter la première hypothèse, nous pensons que la seconde hypothèse est la plus probable. Comme pour tous les autres traitements, la population contrôle a subi un changement d'environnement à la génération F0, en passant des conditions d'élevage à celles de l'expérience. Dans les conditions d'élevage, les populations ont été maintenues dans plusieurs aquariums (volume ≥ 20 L) sans contrôle de la densité, avec un apport quotidien d'une quantité déterminée de nourriture. A la génération F0 de l'expérience 2, le changement essentiel a été le maintien d'une densité faible et constante (2300 larves m⁻²)(Goedkoop et Peterson, 2003) et des conditions de nourriture *ad libitum* (Pery *et al.*, 2002).

La densité peut engendrer un stress agissant essentiellement sur la croissance (Hooper *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2003; Pery, 2003). Dans un environnement constant, une augmentation de la densité va entraîner de fait une diminution des ressources disponibles.

Ainsi à la génération F0 les populations ont été soumises à un environnement optimal et constant en termes de densité et de quantité de nourriture. Ce changement d'environnement a conduit comme ont montré les réponses évolutives significatives des populations contrôles à une sélection directionnelle agissant sur les populations.

Chez les diptères, la taille du corps et le temps de développement sont des traits corrélés positivement (Woods *et al.*, 2002; Tokeshi et Reinhardt, 1996; Xue et Ali, 1994). En effet, des études en laboratoire sur la drosophile ont permis notamment de mettre en

évidence lors d'expérience de sélection artificielle une corrélation positive entre la taille du corps et le temps de développement (voir références dans Woods *et al.*, 2002). Ainsi, chez des lignées de *Drosophila melanogaster* sélectionnées pour un temps de développement court, la taille du corps a diminué. Inversement, des lignées sélectionnées pour une taille de corps élevé ont vu leur temps de développement augmenter. Cette corrélation positive peut être considérée comme un compromis évolutif d'origine génétique entre les deux traits (Roff et Fairbairn, 2007; boîte 3; p. 33).

Dans le traitement contrôle, si le temps de développement a significativement diminué au cours des huit générations (tableau 11, figures 18 et 19), la taille des adultes n'a en revanche pas diminué de manière significative (figures 21 et 22). Ces réponses à la sélection apparemment non corrélées peuvent s'expliquer soit (i) par une évolution du compromis entre la taille des adultes et leur temps de développement; soit (ii) par un masquage de ce compromis par l'augmentation de la capacité d'acquisition d'énergie au cours des huit générations (Roff et Fairbairn, 2007). L'évolution des compromis génétique au cours des huit générations est peu probable au vue des nombreuses données dans la littérature ayant mis en évidence une grande stabilité des compromis quel que soit le type de sélection qui s'opère sur un nombre faible de générations (Tschirren *et al.*, 2009; Roff et Fairbairn, 2007; Mc Guigan, 2006). En revanche, une sélection selon la capacité d'acquisition pourrait expliquer l'évolution des traits mesurés dans le traitement contrôle, ainsi que le masquage du compromis entre la taille des adultes et le temps de développement, comme Roff et Fairbairn l'on montré mathématiquement avec un modèle d'acquisition/allocation (Roff et Fairbairn, 2007). Selon cette hypothèse les résultats du traitement contrôle montrent que les conditions d'expérience ont induit une sélection directionnelle agissant sur les populations selon la capacité d'acquisition d'énergie des individus.

En conclusion, le suivi des traits d'histoire de vie dans le traitement contrôle a permis de mettre en évidence une accélération micro-évolutive du temps de développement des adultes. Les conditions d'expérience ont entraîné une pression de sélection directionnelle sur les populations. L'hypothèse avancée est que les conditions de

nourriture *ad libitum* et le maintien à un niveau de densité faible ont permis une sélection des individus selon leur capacité d'acquisition d'énergie: ont été favorisés les individus capables d'atteindre plus rapidement leur taille critique (Pery, 2003).

4.2.1.2. Traitements uranium

Dans les trois traitements uranium (32 – 64 – 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps), le nombre d'émergences, le temps de développement, la taille des adultes, et la fécondité des femelles ont également évolué entre les générations F2 et F7 (tableau 11).

Seul le nombre d'émergences dans le traitement 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a montré une réponse évolutive significative (tableau 11). Néanmoins, pour ce traitement, les comparaisons deux à deux entre les générations n'a pas mis en évidence un tel résultat (figure 17). L'observation des données expérimentales laisse supposer qu'un problème d'ajustement du modèle de régression linéaire peut être à l'origine de ce résultat significatif, le nombre d'émergences aux générations F5 et F6 étant significativement inférieur aux générations F3 et F4, alors que la génération F7 ne l'a pas été. Ainsi, quel que soit le traitement uranium, le nombre d'émergences n'a pas évolué au cours des huit générations.

Le temps de développement (EmT50 mâle et EmT50 femelle) à la génération F7 a été plus court qu'à la génération F0, et ce pour tous les traitements (tableau 10; figures 18 et 19). Cependant, pour la population exposée au traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, cette accélération du développement s'est faite plus lentement que celle du contrôle (tableau 11). La population du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a donc évolué différemment par rapport à la population contrôle (tableau 11).

Une divergence évolutive due à la présence d'uranium dans le milieu a également été détectée pour la taille des adultes (tableau 11). Premièrement, l'effet toxique de

l'uranium mis en évidence au cours de la première génération (figures 21 et 22) s'est atténué de manière significative dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. En effet, pour la taille des mâles et des femelles, les comparaisons deux à deux entre les traitements pour chaque génération ont montré des valeurs de NOEC et LOEC augmentant jusqu'à la génération F5, génération à partir de laquelle aucun effet toxique de l'uranium a été détecté. Deuxièmement, l'analyse a confirmé une évolution significative vers une augmentation de la taille des adultes dans ces deux traitements (tableau 11). Ainsi, l'évolution de la taille des adultes au cours des huit générations d'exposition a également montré des divergences évolutives pour des concentrations en uranium $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

En ce qui concerne la fécondité des femelles, des réponses évolutives significatives ont été détectées dans les traitements 32 et 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 11; figure 25). Ainsi la fécondité des femelles dans ces traitements a significativement augmenté entre les générations F2 et F7, et cette réponse à la présence d'uranium dans l'environnement a été de nature micro-évolutive.

L'évolution de l'ensemble des traits (temps de développement, taille des adultes, fécondité des femelles) met en évidence qu'une sélection a eu lieu au cours des huit générations. Cette sélection a été significativement différente par rapport au traitement contrôle à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La sélection induite par l'uranium a entraîné un retard de développement, une augmentation de la taille des adultes, ainsi qu'un accroissement de la fécondité des femelles. L'ensemble de ces résultats ont ainsi montré qu'au cours de l'expérience la *fitness* moyenne des populations exposées à l'uranium a augmenté, principalement à travers une amélioration du succès reproducteur des individus.

4.2.2. Analyse en Composante Principale (ACP)

L'ensemble des traits phénotypiques mesurés ont évolué dans tous les traitements. Dans les traitements uranium, les évolutions mises en évidence résulteraient de la réponse combinée de la population à deux pressions de sélection distinctes: (i) celle mise en évidence dans le traitement contrôle; (ii) celle induite par la présence d'uranium.

L'ACP a permis de synthétiser l'ensemble des modifications des traits lié à la *fitness*, en dégageant trois composantes expliquant 77,7% de la variance totale des mesures.

4.2.2.1. PC1

L'ACP révèle une première composante principale regroupant l'EmT50 mâle et femelle, la taille mâle et femelle, ainsi que la fécondité des femelles (nombre d'œufs par masse), et plus faiblement le nombre d'émergence et le taux de masses écloses (figure 27). L'augmentation de la PC1 indiquerait donc une augmentation de la taille des mâles et des femelles, de la fécondité des femelles, et d'une diminution du temps d'émergence des adultes.

L'uranium a eu un effet négatif sur la PC1, effet qui a diminué au fil des générations (figures 27, 28). Cette diminution des effets de l'uranium sur la PC1 a été de nature micro-évolutive dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Ainsi l'évolution de la PC1 au cours de l'expérience 2 a été la même que pour l'ensemble des traits liés au succès de reproduction. De fait, la PC1 pourrait correspondre au succès reproducteur des adultes.

L'ensemble de ces résultats montrerait qu'à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la pression de sélection induite par l'uranium a conduit à une amélioration de la *fitness* des populations, en favorisant les individus au succès reproducteur élevé, c'est à dire les individus de grande taille.

4.2.2.2.PC2

D'après nos résultats, la seconde composante principale indiquerait une diminution du temps de développement et du taux de masses écloses (figure 27). Cette composante, corrélée positivement avec la concentration en uranium et les générations, semblerait être de nature temporelle : les temps d'émergence étant eux mêmes des variables temporelles, et le taux de masses écloses un paramètre fortement lié - dans nos conditions d'expérience - à la probabilité de rencontre dans le temps des mâles et des femelles.

Si au cours de la première génération F0, la PC2 a significativement augmenté avec la concentration en uranium à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, cette relation dose-réponse s'est inversée à la génération F7, conséquence d'une augmentation de nature micro-évolutive de la PC2 au cours des huit générations dans les traitements 0 et 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. La PC2 a donc essentiellement évolué dans les traitements contrôles et faiblement contaminées à l'uranium.

La PC2 pourrait être assimilée à une mesure de la capacité d'acquisition des individus. L'interaction traitement X génération significative sur la PC2 révélerait l'influence de l'uranium sur ce processus de sélection. En effet, dans les traitements $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la PC2 n'a pas évolué de manière significative au cours des huit générations d'exposition, contrairement aux autres traitements.

D'après cette composante, les conditions expérimentales (nourriture *ad libitum* et densité constante) auraient favorisé l'évolution d'une plus grande capacité à acquérir de l'énergie, avec pour conséquence, à taille adulte équivalente, une accélération du temps de développement dans les traitements 0 et 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. En revanche, l'absence d'évolution significative de la PC2 dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps indiquerait que la présence d'uranium dans le milieu s'opposerait à cette sélection, (i) du fait des compromis entre la taille et le temps de développement, en favorisant des individus de

grande taille – comme l'indiquerait la corrélation fortement positive entre la PC1 et la taille des adultes mâles et femelles - (Roff et Fairbairn, 2007), (ii) et/ou en modifiant par sa présence le comportement des larves.

Dans le cas des larves de *Chironomus riparius* présentes dans les traitements 32, 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, des observations faites au cours des quinze premiers jours de chaque génération, ont permis d'observer à la surface du sédiment un grand nombre de larves, contrairement au traitement contrôle où très peu de larves étaient visibles car enfouies dans le sédiment. De plus, dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, ces larves présentaient une activité locomotrice réduite, la plupart d'entre elles se déplaçant très peu à la surface du sédiment. Ces observations indiqueraient qu'en présence d'uranium dans le milieu, les larves auraient modifié leur comportement en restant à la surface du sédiment. Ainsi ces larves seraient moins exposées à l'uranium présent dans le sédiment et limiteraient leur dépenses énergétiques (pas d'enfouissement, ni de fabrication et d'entretien du tube (Armitage *et al.*, 1995)). En effet, un des moyens pour les organismes d'augmenter leur tolérance à un polluant est de limiter leur exposition en ralentissant leur métabolisme afin de conserver des réserves énergétiques (Magnusson et Ramel, 1986; Hoffmann et Parsons, 1991). Ces mécanismes ont déjà été observés chez des rats exposés à de l'uranium appauvri (Lestaevel, *al.*, 2005), chez le saumon (*Salmon Salmo*) en présence de Zn (Farmer *et al.*, 1979), chez la sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*) exposée à des sédiments naturels contaminés par des métaux lourds (Petrauskienė, 2003), ou encore chez des larves *Chironomus riparius* exposées à un sédiment contaminé au zinc et au cadmium (Leppanen *et al.*, 1998). Ainsi le changement de comportement observé dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps pourrait expliquer en partie l'interaction traitement X génération sur la PC2.

4.2.2.3.PC3

La contribution des traits sur les corrélations de l'ACP a indiqué que le nombre d'émergences a le plus contribué à la détermination de la PC3 (tableau 13; figure 30). Ainsi cette composante serait liée à la probabilité de survie des larves

Ainsi la probabilité de survie des larves (PC3) dans les traitements 32, et 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps n'a pas évolué au cours des huit générations (figure 31), contrairement au traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Ainsi dans ce dernier traitement, la probabilité de survie des larves a augmenté au cours de l'expérience, avec pour conséquence au niveau de la population notamment une baisse de la fécondité moyenne des femelles (figure 29).

Cette baisse de fécondité peut s'expliquer par le compromis existant entre la survie et la fécondité à travers le temps de développement. En effet, l'absence de micro-évolution de la PC2 (mesure de la capacité moyenne d'acquisition des individus; figure 30) ne permet pas d'expliquer la diminution micro-évolutive du temps d'émergence dans le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (tableau 11). Or selon Posthuma *et al.* (1993), en présence d'un stress métallique entraînant une baisse de la survie, la théorie de l'histoire de vie prédit qu'une population évoluera vers une plus grande tolérance au métal, notamment à travers une accélération du développement. Ainsi dans le dernier traitement, l'augmentation significative au cours des huit générations de la PC3 et la diminution du temps d'émergence indiquerait que les individus sélectionnés ont été ceux au temps de développement court. De fait, à travers la taille (Sibley *et al.*, 2001), l'existence d'un compromis entre le temps de développement et la fécondité des adultes chez *Chironomus riparius* (Pery, 2003), expliquerait la baisse de fécondité induite par l'augmentation du succès à l'émergence des larves.

4.2.3.Hypothèse de la sélection séquentielle

L'ACP réalisée sur l'ensemble des traits liés à la *fitness* a donc permis de décomposer l'ensemble des modifications phénotypiques observées en trois composantes, toutes

influencées par l'uranium : (i) le succès reproducteur des adultes (PC1); (ii) la capacité d'acquisition d'énergie des larves (PC2); (iii) la probabilité de survie des larves (PC3).

Cette analyse révélerait également la nature séquentielle de la sélection engendrée par l'uranium : (i) au cours du développement larvaire, puis (ii) lors de la reproduction des adultes.

Au cours du développement larvaire, l'exposition à l'uranium dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a conduit à une diminution significative du nombre de larves atteignant le stade adulte (figure 17). De fait un processus de tri des larves en vertu de leur capacité à survivre a eu lieu dans ces traitements (Danchin *et al.*, 2005), les survivantes étant les plus tolérantes à l'uranium. Comme décrit précédemment, la PC3 de l'ACP décrirait la probabilité de survie des larves et mettrait en évidence lors des huit générations d'exposition une augmentation du succès à l'émergence uniquement dans le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (figure 31), combiné à une baisse de la fécondité des femelles (figure 29), une accélération du développement non expliqué par la PC2 (tableau 11; figure 30), qui indiqueraient que les larves les plus tolérantes à l'uranium ont été celles au temps de développement court.

D'autres effets toxiques de l'uranium ont également été significatifs à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps chez les larves survivantes avec pour conséquences sur les adultes une diminution de leur taille (figures 21 et 22), ainsi qu'une baisse de la fécondité des femelles (figure 25). De par le rôle de ces paramètres sur le succès reproducteurs des adultes, la présence d'uranium dans les traitements aurait donc influencé la sélection sexuelle agissant sur les adultes au cours de la période de reproduction. En effet, la sélection sexuelle agit sur les populations selon deux mécanismes, (i) la compétition entre les mâles, et (ii) le choix du mâle par la femelle (Hunt *et al.*, 2009). Comme toute sélection, elle n'agit que sur des populations possédant de la variabilité pour le ou les traits ciblés en terme de succès reproducteur. L'uranium

influencerait la sélection sexuelle en modifiant cette variabilité. Comme décrit précédemment la PC1 de l'ACP synthétise les variations de l'ensemble des traits mesurés ayant une influence sur le succès reproducteur des individus dus à la présence d'uranium (figure 27), présence ayant un effet négatif qui s'est atténué au fil des générations de manière significative dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Selon cette composante, la sélection induite par l'uranium aurait favorisé les individus de grande taille, de fécondité élevée, et au temps de développement court.

Or un grand nombre d'études sur la sélection sexuelle ont mis en évidence une relation positive entre le succès reproducteur des mâles et la taille du corps (pour une revue, voir Hunt *et al.*, 2009). De même pour de nombreuses espèces d'insectes, la fécondité des femelles dépend directement de la taille du corps.

Chez *Chironomus sp* ainsi que d'autres diptères, au cours des accouplements qui ont lieu en vol, les mâles de petite taille présentent un avantage par rapport au individus plus grands du fait de leur plus grande agilité en vol (Mc Lachlan et Cant, 1995; Neems *et al.*, 1990; Neems *et al.*, 1998; Mc Lachlan *et al.*, 2003; Fyodorova et Azovsky, 2003). Néanmoins cette petite taille des mâles a un coût en terme de *fitness*, notamment sur la capacité de détecter dans un essaim la présence d'une femelle à proximité selon la tonalité de son vol (Fyodorova et Azovsky, 2003). Chez de nombreux diptères, les mâles volent en essaim et capturent les femelles dès leur entrée. L'accouplement a lieu en quelques secondes (Downes, 1969; Armitage *et al.*, 1995). Dans ces conditions, le succès reproducteur du mâle dépend de sa capacité à discriminer rapidement les femelles des mâles présents dans l'essaim. Or des études comportementales et électrophysiologiques ont montré que les mâles étaient capables de discriminer dans un essaim une femelle parmi des centaines, voir des milliers de mâles, selon la tonalité du vol (Fyodorova et Azovsky, 2003). Une mauvaise détection de la fréquence des battements d'aile peut entraîner une tentative d'accouplement avec un autre mâle, et de fait diminuer la probabilité d'accouplement avec une femelle. Les travaux de Fyodorova et Azovsky (2003) l'ont démontré en constatant que c'était essentiellement les mâles de petite taille

qui faisaient des erreurs dans la détection des femelles, en s'accouplant avec des mâles plus grands. Ces problèmes de détection seraient pour les mâles le coût de leur petite taille et de leur agilité.

Ces exemples mettent en lumière qu'un temps de développement court, ainsi qu'une grande taille sont les caractéristiques vers lesquelles doit tendre un adulte *Chironomus sp* pour avoir un succès reproducteur maximum, comme l'illustrent les corrélations de la PC1 avec les traits phénotypiques mesurés (figure 27). Cependant, du fait des compromis existant entre le temps de développement et la taille des adultes, un tel optimum ne peut être atteint en réponse à une sélection.

Dans le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, l'absence de micro-évolution significative du temps d'émergence, contrairement à la taille des adultes montrerait qu'à cette concentration, la sélection de l'uranium aurait favorisé les individus aux succès reproducteur élevé (*i.e.* grande taille). En revanche dans le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, ce sont les individus au temps de développement court qui ont été sélectionnés.

Ainsi, de par la nature séquentielle de la sélection induite par la présence d'uranium dans le milieu en fonction de la concentration en uranium, la réponse de la population à la sélection va être différente. Dans le traitement $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, on peut émettre l'hypothèse que suite au tri des larves exposées selon leur succès à l'émergence, la variabilité au sein des reproducteurs a été maintenue suffisante pour permettre aux populations de répondre à la sélection ayant lieu lors de la reproduction des adultes. Cette dernière étant alors la pression de sélection majoritaire, l'ensemble des modifications phénotypiques observés au cours des huit générations serait alors principalement la réponse des populations à celle-ci.

En revanche, dans le traitement $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, le nombre d'émergences, toutes générations confondues, a été en moyenne de 61,7 adultes par génération, soit un succès

d'émergence moyen pour les larves exposées de 30,9%. La toxicité de l'uranium aurait donc éliminé avant reproduction plus de la moitié des larves initialement introduites, les larves survivantes étant les plus résistantes à l'uranium, mais avec un faible succès reproducteur. De fait l'ensemble des modifications phénotypiques observées dans ce traitement au cours des huit générations, serait alors principalement la réponse à la sélection sur la survie des larves.

Notons également que la diminution importante du nombre de reproducteurs (< 100 individus) induits par l'uranium a pu conduire également à une réduction importante de la variabilité génétique de la population (Hoffmann et Parsons, 1991; Gomulkiewicz et Holt, 1995; Van Straalen et Timmermans, 2002; Reed *et al.*, 2003; Nowak *et al.*, 2007; Nowak *et al.*, 2009). Cette érosion génétique ayant elle même un effet négatif sur la *fitness* de la population (Reed *et al.*, 2003).

4.2.4. Conclusion sur les modifications phénotypiques des traits liés à la *fitness*

L'ensemble des traits phénotypiques liés à la *fitness* des populations a évolué au cours des huit générations en réponse à la présence d'uranium dans les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps de manière significativement différente par rapport au traitement contrôle. Ainsi, en réponse à la pression de sélection induite par l'uranium, les populations de ces traitements ont vu leur *fitness* moyenne augmentée, à travers une augmentation du succès reproducteur des adultes. L'analyse en composante principale réalisée sur l'ensemble des traits liés à la *fitness* des populations a permis de classer l'ensemble des variations mesurées selon trois composantes : le succès reproducteur des adultes; la capacité d'acquisition d'énergie des larves; la probabilité de survie des larves. Ces résultats révèlent également la nature séquentielle de la sélection induite par la présence d'uranium : (i) une première sélection des larves selon leur capacité à survivre jusqu'au stade adulte; (ii) une sélection des adultes selon leur succès reproducteur.

Selon la concentration en uranium, les évènements de sélection interviendraient à des degrés différents au cours des différentes phases du développement de *C. riparius*. La sélection au cours des premiers stades du développement larvaire réduirait plus ou moins le potentiel de sélection sur les traits durant les stades ultérieurs. Ainsi, à partir de $64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps, l'uranium a exercé une pression de sélection directionnelle significative sur les populations, en favorisant les individus les plus tolérants, c'est à dire ceux capables non seulement de survivre à la présence d'uranium, mais également ceux avec un succès reproducteur élevé.

4.2.5. AF, *fitness* et adaptation

Un faible niveau d'AF peut avoir une signification adaptative (Swaddle, 2003). Ainsi la sélection naturelle peut contre sélectionner l'AF, lorsque celle-ci atteint une valeur seuil, sur un ou plusieurs traits morphométriques. Si cette hypothèse est vraie, on peut prédire une évolution vers la diminution de l'AF sur des traits liés à la *fitness* dans une population soumise à une sélection induite par un stress environnemental (Hoffmann et Woods, 2003). A notre connaissance, l'expérience 2 est la première à mettre en évidence une telle micro-évolution de l'AF en réponse à la présence d'un toxique.

L'AF aile a été influencée par la présence d'uranium (figure 23). A la génération F0, l'AF aile a augmenté à partir du traitement $32 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Cette relation dose-effet s'est ensuite estompée au cours des générations jusqu'à devenir nulle à la génération F7. L'interaction traitement X génération mise en évidence par l'ANOVA (tableau 10), ainsi que la réponse évolutive significative, ont révélé l'évolution de l'AF aile (tableau 11). Ainsi cette AF a significativement diminué par rapport à la génération F0 à partir de la génération F3, F3, et F2, respectivement pour le traitement 32, 64, et $128 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Notons que dans le traitement contrôle, l'AF aile n'a pas évolué au cours de l'expérience 2. Ainsi la présence d'uranium dans l'environnement a entraîné une diminution évolutive de l'AF aile moyenne. Ce résultat confirmerait dans nos conditions d'expérience un lien

entre le niveau d'AF aile et la *fitness* des individus sélectionnés. Les individus favorisés ont été ceux présentant une AF aile réduite.

En effet la diminution micro-évolutive de l'AF aile à partir de 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a montré que les individus faiblement asymétriques au niveau des ailes présentaient un avantage sélectif (Hoffmann et Woods, 2003). Les individus sélectionnés par l'uranium sont ceux capables notamment de maintenir un développement stable en dépit d'un environnement « tératogène ».

De nombreux travaux ont été réalisés sur le lien existant entre la stabilité du développement (estimées à travers l'AF) et la *fitness*. La littérature regorge de résultats contradictoires et hétérogènes (Moller, 1997; Clarke, 2003; Dongen, 2006). Néanmoins, le point de vue le plus couramment accepté est que l'AF peut dans certains cas être liée à la *fitness* et/ou jouer un rôle dans la sélection sexuelle (Clarke, 2003).

L'association AF-*fitness* a été clairement mise en évidence dans des conditions de stress élevés, où les individus de faible *fitness* ont ainsi été révélés (Floate et Fox, 2000; Woods *et al.*, 2002; Hendrickx *et al.*, 2003). Cette hypothèse est étroitement liée à l'idée que les niveaux d'AF vont augmenter avec le stress avant que des conséquences au niveau de la *fitness* soient observées (Clarke, 1995). C'est sur cette hypothèse que repose le principe de mortalité différenciée (Floate et Fox, 2000), principe permettant d'expliquer les résultats de pourcentage de larves malformées de l'expérience 1 et ceux d'AF au niveau des ailes des adultes de la génération F0 de l'expérience 2 (figure 23).

Sachant que pour les traitements 64 et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, conjointement à la diminution de l'AF aile, la *fitness* moyenne des individus a augmenté - plus précisément leur succès reproducteur. Ces résultats tendraient alors à confirmer l'existence d'un lien entre la *fitness* des individus et leur stabilité du développement mesurée par l'AF aile. La présence d'uranium dans l'environnement aurait alors favorisée les individus avec le

développement le plus stable (Hendrickx *et al.*, 2003). L'évolution de l'AF aile dans les traitements 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps confirmerait l'utilisation éventuelle de l'AF comme indicateur de l'état d'adaptation d'une population soumise à une pression de sélection continue (Clarke et Mc Kenzie, 1987).

5. Conclusion

L'objectif de cette expérience était dans un premier temps de caractériser les effets d'une exposition à l'uranium sur les adultes *Chironomus riparius* à des concentrations où des effets subléthaux avaient été détectés au niveau larvaire.

Les résultats de la génération F0 a permis de mettre en évidence un effet négatif de l'uranium sur les adultes à partir du traitement 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, avec diminution du nombre d'adultes aptes à se reproduire, de la taille moyenne des adultes, des performances de reproduction, et d'une augmentation de l'asymétrie fluctuante au niveau des ailes. Ces résultats indiqueraient qu'il existerait dans nos populations des individus plus tolérants à l'uranium que d'autres. Dans un environnement contaminé à l'uranium, ces derniers seraient capables notamment de mieux survivre tout en ayant un développement plus stable. Ainsi la combinaison à la fois d'un environnement stressant et de populations au sein desquelles existeraient des différences de *fitness* entre les individus, laisse supposer que nos populations vont pouvoir réagir à la présence d'uranium, en élaborant des mécanismes adaptatifs afin de réduire son impact négatif (Van Straalen et Timmermans, 2002; Bijlsma et Loeschcke, 2005).

Dans un second temps, le suivi des paramètres de *fitness* et d'AF au cours des huit générations a permis de mettre en évidence des modifications phénotypiques significatives. En effet, l'ensemble des traits ayant micro-évolué (temps de développement, taille des adultes, fécondité des femelles) ont montré qu'une sélection directionnelle a eu lieu au cours des huit générations. Cette sélection a été significativement différente par rapport au traitement contrôle à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps. Ainsi, en réponse à la pression de sélection induite par l'uranium, les populations de ces traitements ont vu leur *fitness* moyenne augmenter. Le suivi de l'ensemble des traits liés à la *fitness* des populations a permis de révéler la nature séquentielle de la sélection induite par la présence d'uranium: (i) une première sélection des larves selon leur capacité à survivre jusqu'au stade adulte; (ii) une sélection des adultes selon leur succès reproducteur.

L'évolution vers une diminution de l'AF aile à partir de 32 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a montré que les individus faiblement asymétriques au niveau des ailes présentaient un avantage sélectif. Les individus sélectionnés par l'uranium ont été capables de maintenir un développement stable. Cette évolution de l'AF aile dans les traitements 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps serait donc une réponse à la sélection directionnelle de l'uranium et de fait, mettrait en évidence un lien entre la *fitness* des individus et leur AF au niveau des ailes (Harshman *et al.*, 2005).

En conclusion, à partir de 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, l'uranium exercerait une pression de sélection directionnelle significative sur les populations, en favorisant les individus les plus tolérants, c'est à dire ceux capables non seulement de survivre à la présence d'uranium, mais également ceux avec un succès reproducteur élevé et un développement stable.

Selon l'environnement dans lequel elles ont été placées à la génération F0, et grâce à la mise en place de mécanismes adaptatifs, les populations de *Chironomus riparius* ont pu répondre à leur nouvel environnement en améliorant leur *fitness* moyenne par sélection des individus les plus adaptés. Cette sélection, synonyme d'adaptation génétique, et a peut être conduit au bout des huit générations à des populations génétiquement différentes malgré leur origine commune, du fait de leur histoire de vie différente (Hendry et Kinnison, 2001).

Les expériences suivantes ont permis d'étudier les conséquences de l'exposition multi-générationnelle à l'uranium, notamment sur le niveau de tolérance à l'uranium, son éventuel coût (Bourguet *et al.*, 2004), ainsi que les différences génétiques entre les populations (Hendry et Kinnison, 2001).

Expérience 3:

conséquences d'une pré exposition à l'uranium sur le niveau de tolérance d'une population de *Chironomus riparius*

1.Introduction

Comme pour la plupart des polluants, la sélection induite par des métaux lourds est considérée comme directionnelle, continue, et forte. Ce sont des substances non dégradables, qui peuvent entraîner des effets toxiques. La sélection induite agit de manière à accroître la tolérance des populations aux métaux lourds présent dans l'environnement (Posthuma et Van Straalen, 1993; Sotka, 2005; Bahrdorff *et al.*, 2006). Dans le cas d'une exposition sur plusieurs générations successives, la sélection va donc favoriser les individus les plus tolérants, c'est à dire ceux capables de maintenir en milieu contaminé un succès reproducteur élevé.

Des études en laboratoire ont déjà mis en évidence chez des populations exposées à des métaux l'acquisition d'une tolérance en un faible nombre de générations.

Xie et Klerks (2003) ont exposé durant six générations successives des populations de gambusie (*Heterandria formosa*) à une concentration de cadmium correspondant à la CL50,72h. A chaque génération, une série de tests de toxicité aiguë réalisée sur les juvéniles a révélé chez la population pré-exposée une augmentation graduelle de la tolérance au cadmium sur six générations, tolérance devenant significativement différente de celle de la population contrôle dès la seconde génération. Ainsi au bout de six générations, les poissons pré-exposés vivaient trois fois plus longtemps en présence de cadmium que ceux de les poissons contrôles.

Magnusson et Ramel (1986) ont étudié sur douze générations l'acquisition de tolérance au méthyle mercure de populations de *Drosophila melanogaster*. Trois niveaux de pression de sélection ont été testés : une pression nulle, une pression forte (environ 50%) et une pression très forte (< 50%). Les résultats ont mis en évidence chez les populations exposées au méthyle mercure une rapide augmentation au cours des douze générations de la tolérance proportionnelle à la pression de sélection, la population la plus tolérante après douze générations étant celle soumise à la plus forte pression de sélection.

Postma et Davids (1995) ont également constaté une acquisition rapide de tolérance chez des larves *Chironomus riparius* exposées en laboratoire au cadmium. Au bout de neuf générations les auteurs ont mis en évidence une augmentation par rapport à la population contrôle de la tolérance dans la population exposée à 54 nM de Cd (concentration ayant un impact négatif significatif sur la croissance et la reproduction des individus). Cependant en suivant la survie des larves au cours des 9 générations d'exposition, les auteurs n'ont pas observé d'effet significatif de cette acquisition de tolérance sur la survie des larves.

Enfin, Vogt *et al.* (2007), en étudiant les effets multi-générationnels du tributylétain (TBT) sur *Chironomus riparius* ont également mesuré une augmentation significative de la tolérance au TBT chez les populations pré exposées au bout de 9 générations. A la

neuvième et dixième génération, la CL50 de la population pré exposée au TBT a été significativement plus élevée que celle de la population contrôle.

L'ensemble des résultats soulignent la forte pression de sélection causée par la présence de métaux lourds dans l'environnement à des concentrations sublétales, qui peut conduire à une acquisition de tolérance en moins de dix générations (Posthuma et Van Straalen, 1993).

Lors de l'expérience 2, une évolution des traits d'histoire de vie significativement différente des individus de la population contrôle a été mise en évidence chez les populations exposées à l'uranium. Cette évolution a conduit au bout de 8 générations à l'accroissement du succès reproducteur des individus. Ainsi à des concentrations à partir desquelles des effets subléthaux ont été observé, l'exposition à l'uranium a entraîné sur les populations une pression de sélection favorisant les individus les plus tolérants.

Afin de relier les changements phénotypiques observés dans les traitements uranium de l'expérience 2 à l'acquisition d'une tolérance, il est nécessaire de mesurer la sensibilité des populations. Pour cela un bioessai de 96h a été réalisé sur des larves issues de la sixième génération de l'expérience 2. Le calcul d'une CL50 après 96h pour chaque population a permis de comparer leur niveau de tolérance.

2.Matériels et méthodes

2.1.Origine des organismes

Lors de l'ensemencement de la septième génération de l'expérience 2, une partie des larves ont été aléatoirement échantillonnées une fois âgées de 96h pour évaluer le niveau de tolérance des populations U0, U1, U2, et U3 à l'uranium (Dal Pos, 2008).

2.2. Plan expérimental

Un bioessai de 96h a été réalisé sur les quatre populations en respectant la méthode décrite dans la norme AFNOR XPT90-339-1 (AFNOR, 2004). A partir d'une solution mère de nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 g U L^{-1}), une gamme de cinq concentrations a été préparée : 0 – 10 – 15 – 25 – 35 mg U L^{-1} . 24h avant l'introduction des larves, 2300 mL d'eau contaminée ont été préparés pour chaque concentration, puis répartis dans 12 bâteaux contenant 5 g de sable de Fontainebleau – 190 mL bâteau⁻¹ – soit trois répliquats par concentration et par population.

Au premier jour d'exposition (J0), 10 larves âgées de 96h ont été introduites dans chaque bâteau. Les larves ont été nourries à J0 et J2 (4 mg de Tétramin® bâteau⁻¹). À J4, les larves survivantes ont été comptabilisées.

2.3. Analyses statistiques

A l'issue du test de toxicité aiguë, à partir du nombre de larves survivantes par bâteau, la concentration pour laquelle on observe 50% de mortalité (CL50) a été calculée ainsi que son IC95%, en ajustant un modèle logistique grâce au logiciel R et du package DRC (Ritz et Streibig, 2005).

3. Résultats

Pour les populations U0, U1, U2 et U3, le nombre moyen de larves survivantes après 96h d'exposition ont été respectivement dans la condition contrôle de 8,0 – 8,0 – 8,3 – 9,0 larves (figure 32).

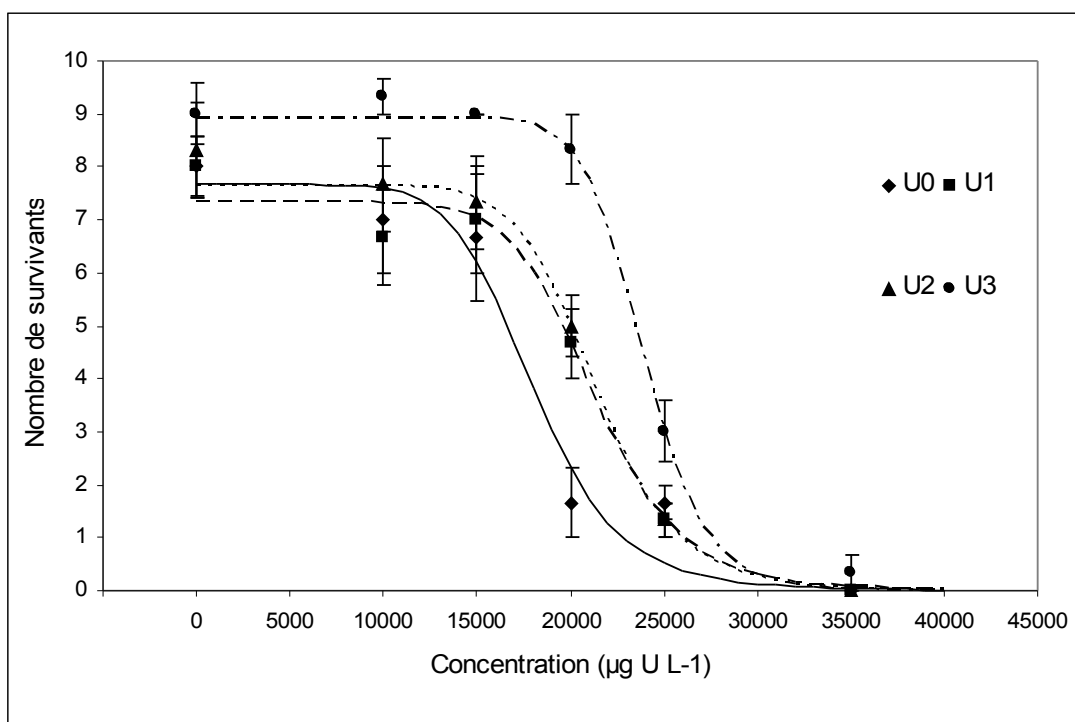


Figure 32. Nombre (moyenne \pm ES) de larves survivantes après 96h d'exposition à l'uranium en fonction des populations U0, U1, U2, et U3, respectivement pré-exposées pendant 6 générations à 0, 32, 64, et 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (U3). Pour chaque population, la courbe représente le modèle logistique ajusté ($N = 4$).

Les CL50 après 96h d'exposition ont été respectivement pour les populations U0, U1, U2, et U3 de 17,7 – 21,0 – 20,9 – 23,4 mg U L⁻¹ (tableau 15).

Tableau 15. CL50 après 96h, ainsi que leur intervalle de confiance à 95% (IC95%).

Population	CL50, 96h (mg U L ⁻¹)	IC95%
U0	17,7	16,0 – 19,3
U1	21,0	19,4 – 22,6
U2	20,9	19,5 – 22,3
U3	23,4	22,1 – 24,6

4. Discussion

L'expérience 3 a permis de déterminer pour les individus des populations U0, U1, U2, et U3 leur niveau de tolérance moyen à l'uranium à travers le calcul d'une CL50 (concentration pour laquelle 50% des larves sont mortes après 96 heures d'exposition à une gamme de concentration aiguë d'uranium; figure 32; tableau 15). Des différences de tolérance à l'uranium entre les populations ont été révélées après 6 générations d'exposition. La population la plus sensible a été la population U0, issue du traitement 0 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps de l'expérience 2, avec une CL50 de 17,7 mg U L⁻¹. La population U3, issue du traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps a été la plus tolérante avec une CL50 de 23,4 mg U L⁻¹. Ces résultats soulignent qu'au sein de la population d'origine, des différences de tolérance d'origine génétique existaient entre les individus, et que les plus tolérants seraient au départ en faible proportion (Ward et Robinson, 2005). Par la sélection induite par la présence d'uranium dans les traitements U1, U2, et U3, leur proportion aurait augmenté au fil des générations dans les populations exposées, avec pour conséquence une amélioration de la *fitness* des populations.

L'expérience 2 ayant été réalisée dans des conditions contrôlées, on peut mettre en relation l'acquisition de tolérance révélée par l'expérience 3 à la concentration en uranium présent dans les traitements. Ainsi au bout de six générations, l'augmentation du niveau de tolérance chez les populations pré-exposées à l'uranium a révélé une adaptation locale. En effet les individus des populations U1, U2, et U3 ont été en moyenne plus tolérants à l'uranium que ceux de la population U0. Une précédente expérience de sélection artificielle chez *Chironomus riparius* exposé à du cadmium avait également mis en évidence une augmentation de tolérance après neuf générations d'exposition à des concentrations entraînant des effets négatifs sur la croissance et la reproduction des individus (Postma et Davids, 1995).

Après six générations d'exposition, les individus de la population U3 ont été ceux ayant le niveau de tolérance à l'uranium le plus élevé, suivi des populations U1, et U2, et enfin de la population U0. Ces résultats laissent supposer d'une proportionnalité entre la

concentration en uranium et l'intensité de la pression de sélection. Une telle relation a déjà été démontrée par le passé lors d'expériences de sélection artificielle en présence de polluant au cours desquelles un suivi du niveau de tolérance avait été fait (Magnusson et Ramel, 1986; Xie et Klerks, 2003). Cependant, le niveau de tolérance des populations U0, U1, U2, et U3 n'a été mesuré qu'après la sixième génération. L'absence de suivi ne permet donc pas de confirmer l'acquisition graduelle de tolérance pour les populations U1,U2, et U3. Néanmoins, vu les micro-évolutions mise en évidence lors de l'expérience 2, ces résultats confirment le rôle de l'uranium comme principal agent de la sélection induite dans les traitements U1, U2, et U3 de l'expérience 2.

La tolérance à un stress environnemental implique des mécanismes spécifiques ou non au type de stress (Posthuma et Van Straalen, 1993). Soumis à un stress les organismes peuvent réduire les impacts en modifiant leur comportement ou leur physiologie (Hoffmann et Parsons, 1991) (*c.f.* Boite 2. Mécanismes de tolérance aux métaux lourds chez les espèces animales. p.26). Au sein d'une population exposée à un métal, toute variabilité inter-individuelle au niveau des performances du ou des mécanismes impliqués va donc conduire à une sélection (Hoffmann et Parsons, 1991). Si l'expérience 3 confirme l'acquisition d'une tolérance pour les populations pré-exposées à l'uranium, en revanche l'identification des mécanismes responsables n'a pu être faite. Néanmoins au regard des résultats et observations lors de l'expérience 2, le changement de comportement pourrait être une des pistes à explorer pour expliquer l'adaptation locale des populations U1, U2, et U3.

5. Conclusion

Afin de relier les changements phénotypiques observés dans les traitements uranium de l'expérience 2 à l'acquisition d'une tolérance, l'expérience 3 a permis de mesurer la sensibilité des populations. Ce bioessai de 96h réalisé sur des larves issues de la sixième génération de l'expérience 2 a permis de mettre en évidence l'acquisition d'une tolérance pour les populations exposées à l'uranium, la population la plus tolérante étant celle exposé à la plus forte concentration.

Ces résultats confirme la sélection directionnelle induite par l'uranium, favorisant les individus les plus tolérants.

Expérience 4: conséquences génétique d'une pré exposition à l'uranium

1.Introduction

On parle d'adaptation locale lorsque dans un certain habitat, les génotypes locaux présentent une *fitness* relative supérieure aux génotypes originaires d'un autre habitat (Sotka, 2005). L'adaptation locale peut être la conséquence soit d'une acclimatation, soit d'une adaptation génétique. Une acclimatation fait intervenir la plasticité phénotypique. Une adaptation génétique résulte de la sélection naturelle (Danchin *et al.*, 2005).

Les différents épisodes sélectifs passés ou en cours ont donc pu entraîner des divergences génétiques importantes entre des populations aux histoires de vie différentes. Ces divergences seront d'autant plus grandes que les pressions de sélection seront fortes, directionnelles et opposées (Hendry et Gonzalez, 2008; Manier *et al.*, 2007).

La sélection par une pollution métallique nouvelle est considérée comme directionnelle, continue et forte. Lorsque les conditions nécessaires à l'évolution de la population sont réunies, cette sélection se traduit par une augmentation de la tolérance des populations aux métaux lourds présents dans leur environnement (tableau 1, p.21).

En exposant des larves de *Chironomus riparius* à un sédiment contaminé à l'uranium durant plusieurs générations consécutives, nous avons mis en évidence une sélection induite par la présence d'uranium, entraînant une amélioration progressive de la *fitness* moyenne des individus exposés (expérience 2), ainsi qu'un accroissement de leur niveau de tolérance, qui suggère l'existence d'une adaptation (expérience 3). Ces résultats laissent supposer qu'une adaptation génétique a eu lieu au cours des huit générations d'exposition chez les populations soumises à la présence d'uranium. Ainsi dans l'hypothèse où une sélection directionnelle et forte s'est opérée sur les populations exposées à l'uranium, le tri des organismes au cours de l'expérience 2 a pu conduire à leur divergence génétique.

Afin de vérifier l'existence d'une telle divergence génétique entre les populations, il est nécessaire de placer des individus de ces différentes populations dans des conditions environnementales identiques, lors d'une expérience de jardin commun. De par l'origine commune des populations, en l'absence d'effets environnementaux, toute différence phénotypique entre les populations reflètera des différences génétiques (Luckinbill *et al.*, 1989).

Une expérience de jardin commun a été réalisée sur la sixième génération de l'expérience 2. Toutes les populations ont été placées dans un même environnement non contaminé, et leurs phénotypes ont été comparés afin de mettre en évidence des divergences génétiques. De plus, la plupart des traits phénotypiques mesurés étant des traits d'histoire de vie, un coût en terme de *fitness* de l'acquisition de tolérance des populations exposées à l'uranium a pu être détectée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Plan expérimental

Toutes les populations ont été maintenues pendant deux générations successives dans un environnement non contaminé (aquarium contenant 600 g de sédiment artificiel et une colonne d'eau synthétique aux proportions respectant un rapport hauteur de sédiment/hauteur d'eau de 1/4 (Environnement Canada, 1997; AFNOR, 2004). A chaque génération les aquariums ont été préparés 24 heures avant l'introduction des larves. Une aération par bullage à débit modéré a permis de maintenir dans les aquariums un taux d'oxygène dissous $\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$. Les conditions ont été statiques, l'eau rajoutée au cours de l'exposition servant à compenser l'évaporation.

Les mesures biologiques ont été faites uniquement sur la deuxième génération afin d'éviter l'influence d'éventuels effets maternels sur les traits d'histoire de vie mesurés, et qui pourraient être responsables de différences phénotypiques entre les individus de la première et de la deuxième génération (Posthuma et Van Straalen, 1993; Dal Pos, 2008).

2.1.1. Première génération du jardin commun

Au premier jour d'exposition (J0), cent larves de *Chironomus riparius* âgées de 48h ont été introduites dans chaque aquarium (soit une densité de 2300 larves m^{-2}). Ces larves ont été produites par la sixième génération de l'expérience 2. Elles n'ont jamais été directement exposées à un environnement contaminé à l'uranium. L'ensemencement s'est fait pour chaque traitement sans mélanger les répliquats, soit seize populations issues de parents soumis à quatre traitements en uranium différents (U0, U1, U2, U3).

Les larves ont été nourries *ad libitum* de Tétramin® à raison de 0,4 mg larve⁻¹ aquarium⁻¹ à J0, J2, J3, puis 0,6 mg larve⁻¹ aquarium⁻¹ jour⁻¹ jusqu'à la fin des émergences. Le suivi des émergences ainsi que des pontes de masses d'eau s'est faite quotidiennement selon la méthode décrite dans l'expérience 2. Ainsi les masses d'œufs prélevées jusqu'à J22 ont

été stockées à 4°C, puis remis à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ quatre jours avant l'ensemencement de la deuxième génération.

2.1.2. Deuxième génération du jardin commun

L'ensemencement, ainsi que le déroulement de la deuxième génération du jardin commun s'est faite de manière identique à la génération précédente. Cependant, afin de permettre des mesures au niveau larvaire, un répliquat supplémentaire a été rajouté pour chaque population – un bêcheur de 400 mL contenant 60 g ps de sédiment artificiel, une colonne d'eau d'une hauteur conforme à obtenir un rapport hauteur de sédiment/hauteur d'eau de 1/4. Au premier jour d'exposition (J0), dix larves *Chironomus riparius* âgées de 48h ont été introduites dans chaque bêcheur en respectant leur origine. Tous les bêcheurs ont reçu 0,2 – 0,4 – 0,6 mg larve⁻¹ de nourriture (Tétramin®, Allemagne) respectivement à J0 et J1, J2 et J3, J4 à J6, soit des conditions de nourriture *ad libitum* (A. Pery, communication personnelle). A J7, dernier jour d'exposition, les larves survivantes ont été prélevées et préservées dans 70% d'éthanol.

2.2. Échantillonnages, montages et mesures morphométriques sur les adultes

À la deuxième génération pour chaque aquarium, l'échantillonnage des adultes, ainsi que les mesures morphométriques faites sur les ailes et les pattes ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'expérience 2.

2.3. Mesures physico-chimiques

Au cours des deux générations, la température, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés dans chaque répliquat à J0, J6, et J14, avant l'ajout quotidien de nourriture.

2.4.Mesures biologiques

Sur les larves prélevées après sept jours de développement, leur survie, leur temps de développement, ainsi que leur croissance, on été mesurés respectivement par le nombre de larves survivantes à sept jours, leur largeur de capsule céphalique, et leur longueur selon le protocole décrit dans l'expérience 1.

Au niveau des adultes prélevés au cours de la période d'émergence de la deuxième génération, le nombre d'émergences, le temps d'émergence des adultes, la taille des adultes, la fécondité des femelles, et le succès d'éclosion ont été calculés selon le protocole décrit dans l'expérience 2.

2.5.Analyses statistiques

Après vérification de la normalité, ainsi que de l'homogénéité des données après transformations éventuelles des critères d'effet mesurés à la deuxième génération, une MANOVA à un facteur, suivie de comparaisons deux à deux (test de Newman et Keuls) ont permis de vérifier la présence de différences phénotypiques d'origine génétique entre les populations U0, U1, U2, et U3.

3.Résultats

L'analyse de variance multivariée (MANOVA) réalisée sur l'ensemble des caractères mesurés au cours de la deuxième génération de l'expérience de jardin commun a mis en évidence une différence significative entre les populations (tableau 16).

Tableau 16. MANOVA sur les traits mesurés pour chaque population à la deuxième génération de l'expérience en jardin commun ($n = 4$).

			$F_{10,30}$	p
MANOVA			2,70	*
			$F_{3,12}$	p
ANOVA	Larve	% survie	2,82	0,08
		Largeur de capsule céphalique	3,53	*
		Longueur	2,61	0,1
Adulte	% émergence	0,81	0,51	
	EmT50 mâle	9,99	***	
	EmT50 femelle	4,64	*	
	Taille mâle	12,18	***	
	Taille femelle	4,87	**	
Reproduction	Nombre d'œufs par masse	4,10	*	
	Taux de masses écloses	2,97	0,07	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.1.Survie

Concernant le pourcentage de survie des larves après sept jours et le pourcentage d'émergences, aucune différence significative entre les populations n'a été détectée (figure 33).

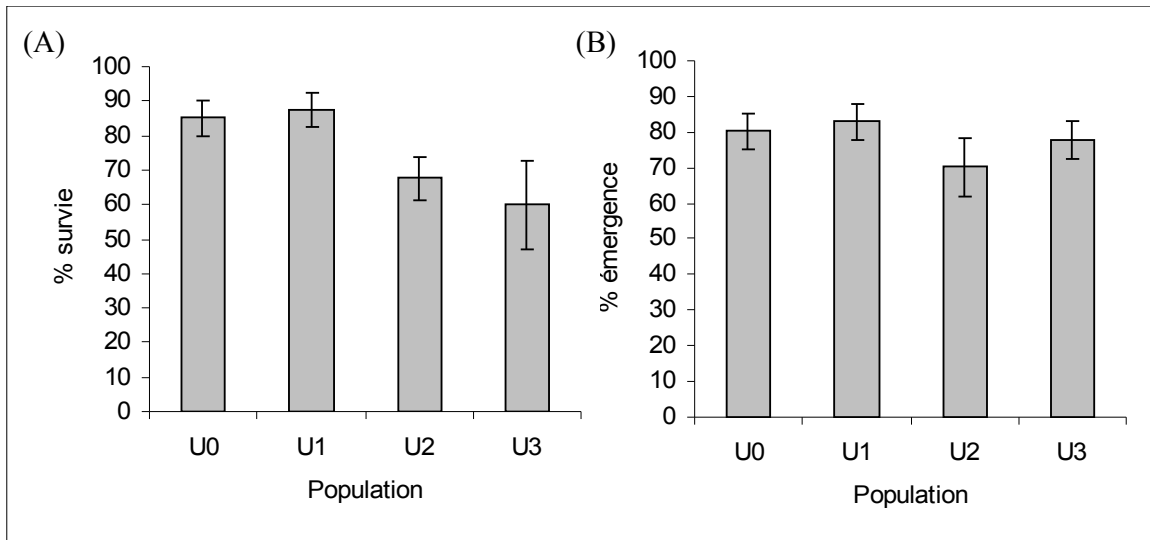


Figure 33. (A) Pourcentage (moyenne \pm ES) de larves survivantes après sept jours, et (B) pourcentage d'émergence au cours de la deuxième génération de l'expérience de Jardin Commun en fonction des populations.

3.2. Temps de développement

Après sept jours d'exposition, la largeur moyenne des capsules céphaliques des larves a respectivement été pour les populations U0, U1, U2, et U3, de 530 μm , 493 μm ; 505 μm , 540 μm (figure 34). Des différences significatives ont été détectées entre les populations (ANOVA: $F_{3,12} = 3,53$; $p < 0,05$). Les comparaisons deux à deux ont permis de mettre en évidence une largeur de capsule céphalique moyenne chez la population U1 significativement plus petite que chez les populations U0 et U3 ($p < 0,05$).

Les populations ont montré des différences significatives du temps d'émergence des mâles et des femelles (ANOVA mâle, $F_{3,12} = 9,99$; $p < 0,001$. ANOVA femelle, $F_{3,12} = 4,64$; $p < 0,05$) (figure 34). Les adultes mâles de la population U1 ont émergé significativement et respectivement 0,5, 0,5, 0,8 jours plus tard que ceux des populations U0, U2 et U3 (test de Newman et Keuls: $p < 0,05$). Les adultes femelles de la population U1 ont émergé significativement et respectivement 1,0 et 1,1 jours plus tard que celles des populations U2 et U3 (test de Newman et Keuls: $p < 0,05$).

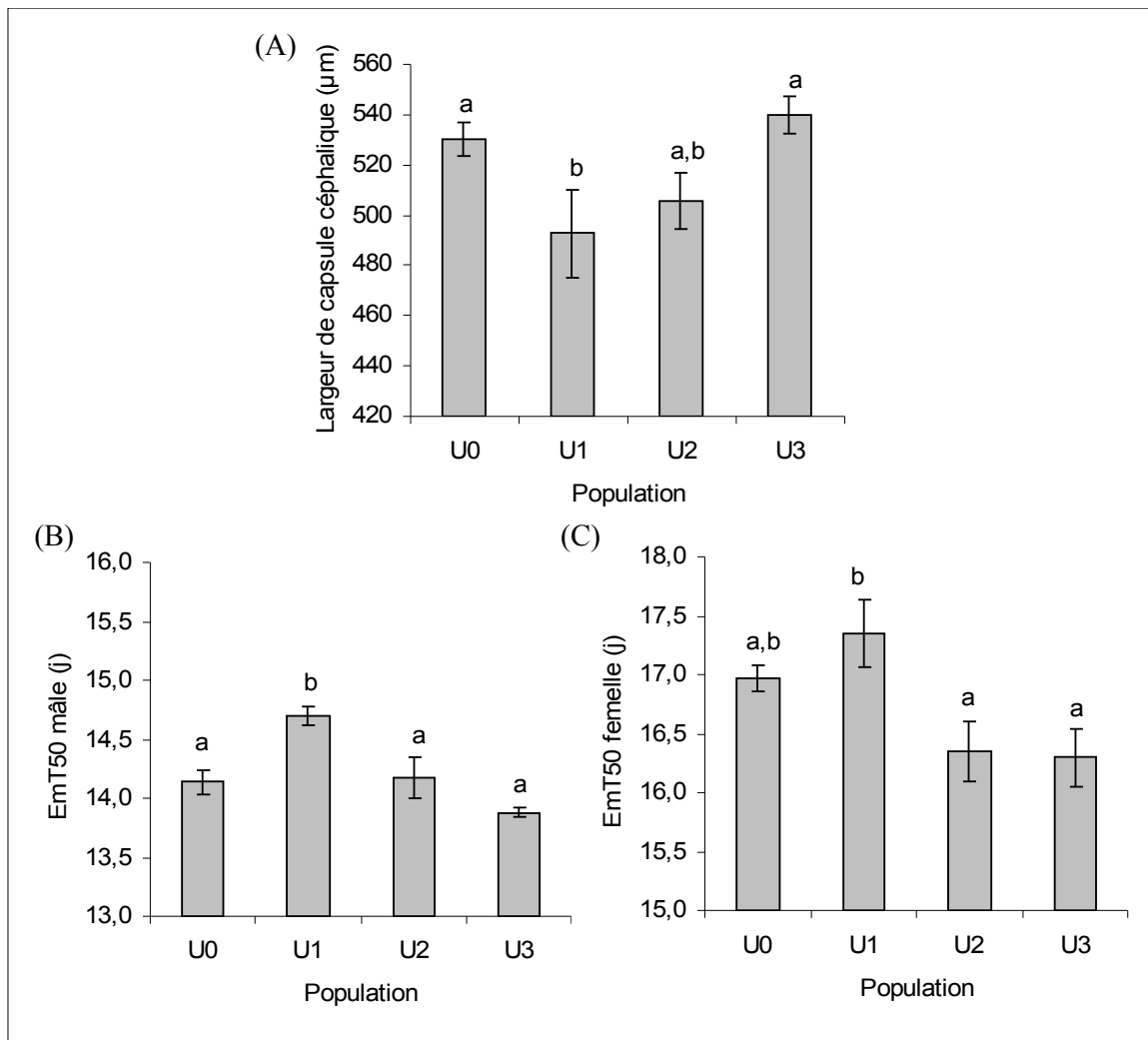


Figure 34. (A) Largeur (moyenne \pm ES) de capsule céphalique des larves survivantes après sept jours, (B) EmT50 (moyenne \pm ES) des mâles et (C) EmT50 des femelles au cours de la deuxième génération de l'expérience de Jardin Commun en fonction des populations. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les populations (test de Newman et Keuls; $p < 0,05$).

3.3.Taille

Après sept jours, la longueur des larves a respectivement été pour les populations U0, U1, U2, et U3, de 10,0 mm, 9,2 mm, 10,1 mm, 10,2 mm (figure 35). Aucune différence significative entre les populations n'a été mise en évidence.

Les tailles des adultes des deux sexes ont différencié de manière significative entre les populations (ANOVA mâle, $F_{3,12} = 12,18$; $p < 0,001$. ANOVA femelle, $F_{3,12} = 4,87$; $p = 0,015$) (figure 35).

Les adultes mâles des populations U1 et U2 ont été significativement plus grands que ceux des populations U0 et U3. Les adultes mâles des populations U3 ont été significativement plus petits que ceux des autres populations.

Les adultes femelles de la population U1 ont été significativement plus grands que ceux des populations U0 et U3. Les adultes femelles des populations U3 ont été significativement plus petits que ceux des populations U1 et U2.

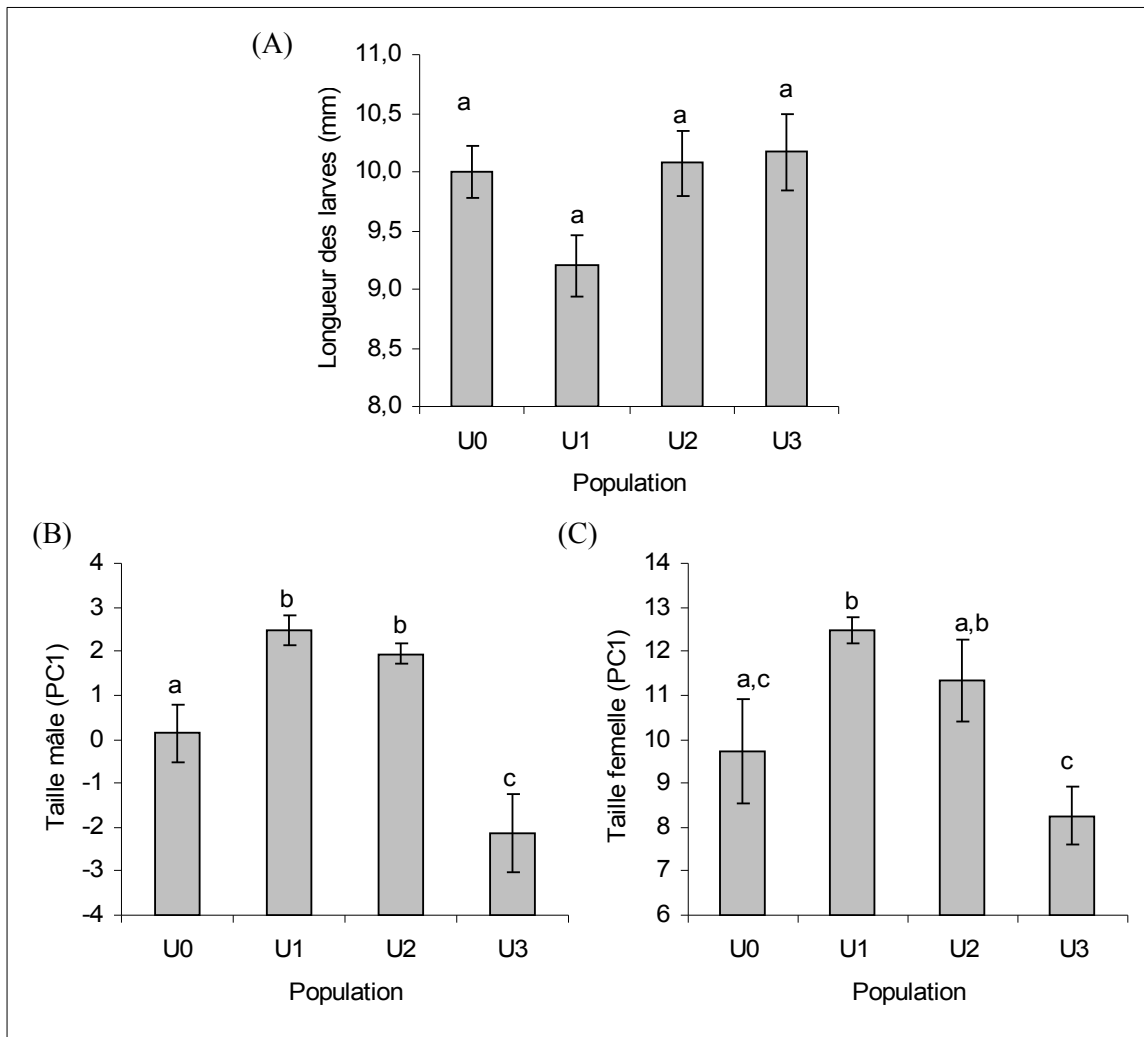


Figure 35. (A) Longueur des larves survivantes (moyenne \pm ES) après sept jours, (B) taille (moyenne \pm ES) des adultes mâles et (C) femelles au cours de la deuxième génération de l'expérience de Jardin Commun en fonction des populations. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les populations (test de Newman et Keuls; $p < 0,05$).

3.4.Reproduction

Aux cours de la deuxième génération de l'expérience de Jardin Commun, le nombre d'œufs par masse a été pour les populations U0, U1, U2, et U3, respectivement de 632, 629, 654, 564 œufs (figure 36). L'analyse de variance a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les populations (ANOVA: $F_{3,12} = 4,10$; $p < 0,05$). Le nombre d'œufs par masse de la population U3 est significativement plus faible que celui des autres populations (Test de Newman et Keuls: $p < 0,05$).

Concernant le taux de masses écloses, aucune différence entre les populations n'a été détectée (ANOVA: $F_{3,12} = 2,97$; $p = 0,07$)(figure 36).

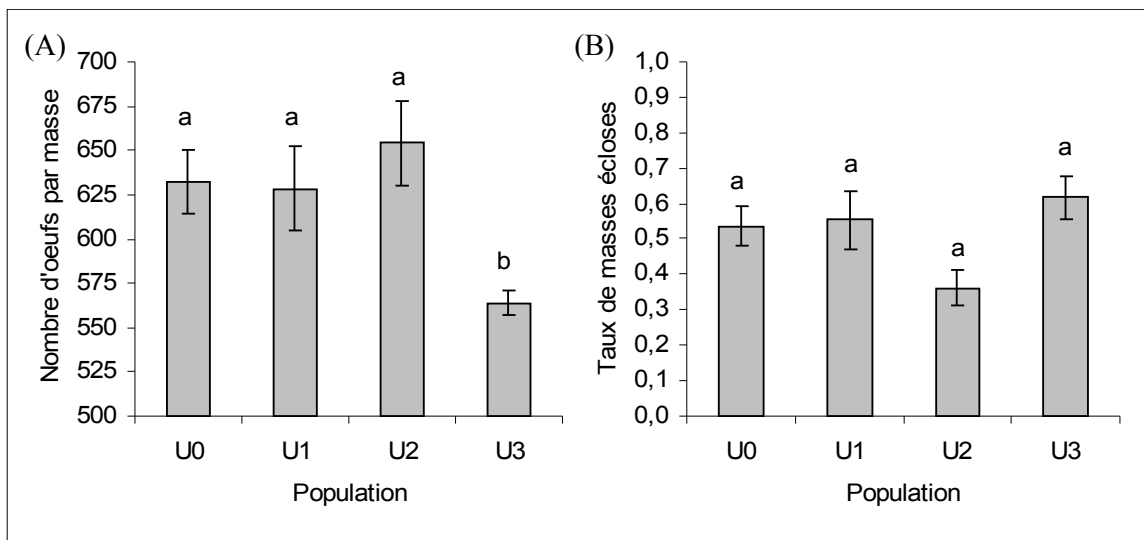


Figure 36. (A) Nombre d'œufs par masse (moyenne \pm ES), et (B) Taux de masses écloses (moyenne \pm ES) au cours de la deuxième génération de l'expérience de Jardin Commun en fonction des populations. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les populations (test de Newman et Keuls; $p < 0,05$).

4. Discussion

L'analyse de variance multivariée réalisée sur l'ensemble des caractères mesurés au cours de la deuxième génération de l'expérience de jardin commun a mis en évidence des différences significatives entre les populations (tableau 16). Puisqu'aucune différence n'a été détectée au niveau des paramètres de qualité de l'eau entre les populations (Dal Pos, 2008), nous pouvons affirmer que les conditions d'exposition ont été identiques. Par conséquent les différences phénotypiques significatives entre les populations sont imputables à des différences génétiques (Falconer et Mackay, 1996).

L'origine commune des populations, puis leurs histoires de vie différentes au cours de l'expérience 2 permettent de donner à ces différences une valeur adaptative (Luckinbill *et al.*, 1989). En effet, les populations U1, U2, U3 ayant été soumises à une sélection induite par l'uranium, toute différence avec la population U0 peut donc être liée à l'acquisition d'une tolérance (tableau 15). Ainsi les populations préalablement exposées ont présenté des différences génétiques significatives en termes de temps de développement (figure 34), de taille des adultes (figure 35), et de fécondité (figure 36; tableau 15). Ces résultats seront discutés à la lumière de l'acquisition de tolérance des populations U1, U2, et U3 (figure 32; tableau 15).

Les mesures de largeur de capsule céphalique, de temps d'émergence des mâles (EmT50 mâle) et des femelles (EmT50 femelle) ont révélé des différences génétiques entre les populations en termes de temps de développement (tableau 15; figure 34). Le temps de développement de la population U1 a été significativement plus long que les autres populations, les autres populations n'étant pas significativement différentes entre elles. La taille des adultes a également été significativement différente (tableau 15; figure 35). Globalement, les adultes des populations U1 et U2 ont été en moyenne plus grands, et les adultes de la population U3 plus petits. Les résultats de cette expérience confirment ceux de l'expérience 2 dans laquelle des différences de taille des adultes, de temps de développement et de fécondité similaire ont été observées. Ils renforcent notre

conclusion selon laquelle une évolution s'est produite durant les huit générations d'exposition à l'uranium.

Ces différences phénotypiques montrent que les individus sélectionnés au cours de l'expérience 2 dans les traitements 32 et 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps ont été ceux de grande taille, c'est à dire ceux au succès reproducteur élevé. (*c.f.* hypothèse de sélection séquentielle; expérience 2). Cette grande taille peut expliquer la plus grande tolérance à l'uranium de ces individus par rapport aux individus de la population contrôle (tableau 15), comme l'ont montré Guedes *et al.* (2006) lors d'une étude sur la résistance aux insecticides chez le coleoptère *Sitophilus zeamais*.

Guedes *et al.* (2006) ont comparé lors d'un jardin commun les caractéristiques de populations naturelles résistantes avec une population contrôle. L'une des populations, caractérisée par une grande résistance au DDT et au pyréthroides (mise en évidence par des tests de toxicité aiguë), présentait dans son environnement naturel des performances démographiques comparables à celles de la population contrôle dans son propre environnement. Lors du jardin commun (environnement contrôlé et sans insecticide) les auteurs ont suivi les émergences et mesuré sur des individus leur respiration, leur poids et leur quantité de réserves énergétiques. Pour la population résistante au DDT et aux pyréthroides, par rapport à la population contrôle, les émergences ont été similaires, la respiration des individus plus élevée, la taille plus grande ainsi que des réserves énergétiques supérieures. Les auteurs en ont conclu qu'à performances démographiques équivalentes, la tolérance a impliqué une plus grande mobilisation des réserves énergétiques du fait d'une activité métabolique élevée – probablement à cause de la mise en place d'un mécanisme de détoxication – ainsi qu'une plus grande quantité de réserves énergétiques grâce à la taille plus grande.

Par analogie, les causes de la plus grande tolérance des populations U1 et U2 par rapport à la population U0 peut s'expliquer par l'augmentation des réserves énergétiques à travers l'augmentation de la taille des adultes (figure 35). Ainsi la taille plus grande

des individus U1 et U2 a conduit à l'augmentation de leur réserve permettant alors d'allouer de l'énergie à un mécanisme de résistance sans diminuer la part allouée à la reproduction (figure 36).

Pour la population U3, les individus ont été significativement plus petits, avec une fécondité plus faible que celles des autres populations. Dans le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps de l'expérience 2, ce sont les individus au succès d'émergence élevé (temps de développement court) qui ont été favorisés. Notons que ces individus ont dans des conditions non contaminées un succès reproducteur plus faible que les individus des autres populations (taille plus petite, fécondité plus faible; figures 35 et 36).

Si l'adaptation génétique aux métaux lourds améliore la *fitness* des populations dans un environnement contaminé, en revanche dans un autre environnement, elle peut engendrer un coût en terme de *fitness* : la mise en place d'un mécanisme physiologique de tolérance pouvant être énergétiquement coûteux (Sibly, 1994). En effet la tolérance à un stress peut être due à deux types de changements énergétiques, (i) la modification de l'allocation énergétique, et (ii) la diminution de l'acquisition des ressources dans un environnement stressant (Hoffmann et Parsons, 1991). Si la tolérance au stress permet d'améliorer la survie, en revanche elle est aussi synonyme de quantité d'énergie moindre pour d'autres processus tels que la croissance ou encore la reproduction (Sibly, 1994; Hoffmann et Parsons, 1991). Dans un environnement non contaminé, on peut donc observer chez les populations tolérantes une baisse de *fitness* par rapport à celle d'une population sensible, comme c'est le cas pour la populations U3. La taille significativement plus petite des adultes, ainsi que la fécondité plus faible des femelles issues de la population U3 dans l'expérience de jardin commun mettent en évidence un coût de tolérance, dont la nature est génétique (Posthuma et Van Straalen, 1993).

Pour les populations U1 et U2, l'apparente absence de coût en terme de *fitness* peut être la conséquence de la sélection induite par les conditions expérimentales de l'expérience 2, en favorisant les individus à la capacité d'acquisition élevée. En effet cette

augmentation d'acquisition pourrait compenser le surcoût énergétique de la tolérance (Roff, 2007).

La sélection directionnelle induite par un toxique peut également induire un coût pour la population, avec une diminution de sa variabilité génétique (Nowak *et al.*, 2009; Ward et Robinson, 2005; Lopes *et al.*, 2005; Van Straalen et Timmermans, 2002; Posthuma et Van Straalen, 1993). Cette érosion génétique s'explique alors essentiellement par la sélection des plus tolérants, leur nombre diminuant avec l'intensité de la sélection. Ainsi des expériences de sélection en laboratoire ont permis de mettre en évidence une diminution de la diversité génétique chez des populations soumises à la présence d'un toxique. Par exemple, lors d'une expérience multi-génération en laboratoire visant à étudier les effets du tributylétain (TBT) (Vogt *et al.*, 2007), Nowak *et al.* (2009) ont suivi l'évolution de la variabilité génétique des populations au cours des 12 générations d'exposition à l'aide de marqueurs microsatellites. L'exposition au TBT a entraîné une baisse significative de la survie et de la reproduction, ainsi qu'un retard de développement. Les marqueurs microsatellites ont révélé une baisse significative de la variabilité génétique chez les population exposées au TBT au cours des 12 générations d'exposition. Les auteurs en ont conclu que l'exposition à un toxique entraînant des effets négatifs sur la survie et la reproduction peut également entraîner une diminution de la variabilité génétique.

De même Ward et Robinson (2005) ont réalisé une expérience de sélection en laboratoire sur des populations de *Daphnia magna* exposées au Cd pendant huit générations. Les auteurs ont mis en évidence chez les populations devenues tolérantes des daphnies plus petites, ainsi qu'une baisse significative de la diversité génétique, ainsi qu'une plus grande sensibilité à d'autres toxiques par rapport aux contrôles.

A cette baisse de diversité génétique due à la sélection des plus tolérants, peut également s'ajouter une diminution de la taille de la population du fait de la toxicité du polluant, entraînant alors une augmentation de la consanguinité. Cette augmentation de

la consanguinité peut alors avoir un impact négatif sur la *fitness* de la population. Chez *Chironomus riparius*, il a été démontré une baisse importante de la *fitness* de population avec l'augmentation du niveau de consanguinité lors d'une exposition à un environnement toxique (sédiment contaminé au Cd, Nowak *et al.*, 2007). De même, lors d'une méta analyse sur l'étude de la relation entre la *fitness* d'une population et sa diversité génétique, Reed *et al.* (2003) ont pu mettre en évidence une corrélation significative entre les mesures de diversité génétique et la *fitness* des populations. Les auteurs de cette méta analyse ont déterminé que 19% de la variation de *fitness* s'expliquait par la diversité génétique.

Dans notre expérience de jardin commun, le coût de tolérance chez la population U3 (figures 35 et 36) pourrait être un indice de perte de diversité génétique. La toxicité de l'uranium aurait dans ce cas éliminé avant reproduction plus de la moitié des larves initialement introduites. Cette forte diminution du nombre de reproducteurs, synonyme de diminution de la taille efficace de la population, combinée à une sélection directionnelle des individus les plus tolérants à l'uranium, entraînerait une diminution de la diversité génétique. Si pour le moment, aucune mesure réalisée lors des expériences 2 et 4 n'a permis de mesurer l'évolution de la variabilité génétique des populations, une analyse génétique (microsatellites) est en cours, afin de mesurer la diversité génétique des populations à la génération F0 et F7 de l'expérience 2. Les premiers résultats confirmeraient l'érosion génétique dans le traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps (Carsten Nowak, communication personnelle). Ces résultats sont en cours de traitement.

Or la variabilité génétique détermine le potentiel adaptatif d'une population (Bell et Collins, 2008). Toute érosion génétique due à une sélection directionnelle induite par un toxique entraînera donc pour la population concernée, une diminution de sa capacité à répondre à toute nouvelle modification de son environnement (Van Straalen et Timmermans, 2002). La probable baisse de diversité génétique de la population U3 mesurée après six générations d'exposition à une concentration en uranium entraînant

une diminution du nombre de reproducteur de plus de 50% laisse donc supposer une diminution de sa capacité à répondre à un nouveau changement d'environnement.

5. Conclusion

L'expérience 4 (jardin commun) a confirmé la nature génétique de l'adaptation des populations exposées à l'uranium lors de l'expérience 2. Ces populations ont en effet montré des différences génétiques en termes de taille des adultes et de fécondité des femelles, qui sont à mettre en lien avec l'acquisition de tolérance au cours de l'expérience 2. Ainsi pour les populations U1 et U2, respectivement exposées à 32 et 64 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, l'augmentation de la tolérance associée à une augmentation de la taille des adultes laisse supposer comme mécanisme de tolérance la conservation de l'énergie. En revanche pour la population U3 exposée à 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps, la diminution de la taille des adultes ainsi que la baisse de fécondité des femelles mettent en évidence un coût de la tolérance au niveau de la *fitness*, signe de la mise en place d'un mécanisme de tolérance augmentant les dépenses énergétiques, qui peut être aussi un indicateur d'une érosion génétique, et par conséquent une diminution de son potentiel adaptatif.

Synthèse des résultats

Dans un premier temps, les expériences 1 et 2 (génération F0) ont permis d'étudier la toxicité de l'uranium dans nos conditions expérimentales. Ainsi lors d'une première exposition à un sédiment contaminé, l'uranium a entraîné une diminution de la survie des larves, une inhibition de la croissance larvaire, une instabilité du développement, ainsi qu'une baisse du succès reproducteur des adultes. De fait, les performances démographiques des populations exposées aux traitements $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps ont ainsi été significativement inférieures à celles du traitement contrôle. Selon l'hypothèse de la mortalité différenciée, ces résultats révèlent également la plus grande *fitness* des individus capables de maintenir un développement stable en présence d'uranium.

Dans un second temps, l'expérience 2 nous a permis d'étudier la réponse adaptative des populations exposées à l'uranium en suivant les modifications phénotypiques sur huit générations. Les populations ont subi deux pressions de sélection qui expliquent les modifications phénotypiques observées, dont la plupart sont de nature micro-évolutive. La première résulte des conditions d'exposition communes à tous les traitements (nourriture *ad libitum*, densité constante) qui ont favorisé les individus à la capacité d'acquisition d'énergie élevée. Cette sélection a entraîné une accélération significative du développement au cours des huit générations.

La seconde pression de sélection est due à la présence d'uranium qui a favorisé les individus capables d'atteindre le stade adulte en ayant un succès reproducteur élevé (grande taille; faible asymétrie au niveau des ailes). Au bout de huit générations, les performances démographiques des populations des traitements $\geq 64 \mu\text{g U g}^{-1}$ ps sont devenues comparables à celles du traitement contrôle. Ainsi, quelle que soit la concentration en uranium, les populations ont répondu à la sélection directionnelle induite par l'uranium – sélection faite notamment selon le niveau de tolérance des individus.

Lors de l'expérience 3, les individus issus de la génération F5, des populations préalablement exposées aux traitements 32, 64, et 128 $\mu\text{g U}^{-1}$ ps, ont eu un niveau de tolérance plus élevé que ceux issus de la population contrôle. Les individus les plus tolérants ont été ceux issus de la population exposée au traitement 128 $\mu\text{g U g}^{-1}$ ps.

Les différences de taille et de fécondité des adultes entre les populations mesurées lors de l'expérience 4 ont confirmé la nature génétique de l'adaptation à l'uranium. Ces divergences mettent également en évidence des réponses adaptatives différentes selon l'intensité de la sélection. L'action séquentielle de la sélection induite par l'uranium expliquerait la réponse évolutive différente des populations en fonction du traitement en uranium.

En effet, la probabilité de survie augmentant avec les stades larvaires, le succès à l'émergence des adultes dépend principalement de la probabilité de survie des larves au cours des premiers stades. Un premier tri a donc eu lieu lors des premiers jours d'exposition : les larves à la capacité de survie élevée ont un temps de développement court et une fécondité basse. Les larves, une fois adultes, ont eu des performances de reproduction d'autant plus basse que la pression de sélection a été faible, par rapport à d'autres adultes moins tolérants, qui ont également survécu dans ces conditions.

Le second épisode sélectif a eu lieu sur les adultes lors de la reproduction, après exposition à l'uranium des larves survivantes tout au long de leur développement. Les individus capables de maintenir en présence d'uranium un développement stable, une croissance optimale et un succès reproducteur élevé ont alors été favorisés .

Les conséquences de l'adaptation des populations U1, U2, et U3 à un environnement contaminé à l'uranium ont été notamment un coût en termes de *fitness* lorsque placé dans un environnement non contaminé, ainsi qu'une probable baisse de la diversité génétique, en particulier pour la population U3.

Si l'uranium a entraîné en premier lieu des effets toxiques sur les populations, celles-ci ont donc été capables de répondre à la pression de sélection induite par ce stress, en s'adaptant génétiquement à sa présence en moins de huit générations.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de doctorat a été d'étudier la réponse adaptative d'une population de *Chironomus riparius* exposée à un sédiment contaminé à l'uranium, en choisissant une démarche originale et innovante d'« écotoxicologie évolutive ». En combinant à la fois une démarche d'évolution expérimentale suivie d'une approche comparative, nous avons pu répondre à un certain nombre de questions sur le rôle de la présence d'uranium dans la sélection naturelle, les mécanismes adaptatifs mis en place et les conséquences pour les populations exposées. L'exposition d'une même population à différents scénarios d'exposition a permis notamment de relier l'acquisition de tolérance à travers le suivi des traits d'histoire de vie au fil des générations, à la concentration présente dans l'environnement.

L'uranium a induit une pression de sélection de type séquentielle sur les populations exposées à des concentrations entraînant des effets sublétaux. Cette sélection a été directionnelle et forte du fait d'une augmentation significative de la *fitness* et du niveau de tolérance des populations exposées, ainsi que l'apparition de divergence génétique dès la sixième génération d'exposition entre les populations. Si les conséquences de cette adaptation génétique ont été une amélioration des performances démographiques des populations exposées en milieu contaminé, cette adaptation a également entraîné un coût en termes de *fitness* lorsque ces populations ont été placées dans un environnement non contaminé. Pour la population exposée à la plus forte concentration, une probable baisse de sa variabilité génétique a altéré son futur potentiel adaptatif.

Ce travail a ainsi permis d'appréhender les conséquences bio démographiques des mécanismes adaptatifs qui ont agi sur les populations exposées à l'uranium pendant huit générations. Le type d'approche employée et les résultats acquis lors des différentes

expériences réalisées conduisent à plusieurs perspectives de recherche, dans le but d'approfondir non seulement les connaissances sur les réponses adaptatives des populations exposées à l'uranium, et plus généralement aux polluants dans un contexte d'évaluation du risque de ces produits, mais également celles concernant les mécanismes adaptatifs mis en jeu:

(i) Identification des mécanismes comportementaux et/ou physiologiques responsable de la tolérance.

La tolérance à un stress environnemental implique des mécanismes spécifiques ou non au type de stress (Posthuma et Van Straalen, 1993). Soumis à un stress les organismes réduisent les impacts en modifiant leur comportement et/ou leur physiologie (Hoffmann et Parsons, 1991). Lors de nos travaux, nous n'avons pas identifié le ou les mécanismes responsables de l'augmentation du niveau de tolérance des individus issus des populations exposées à l'uranium au cours de l'expérience 2. Cependant, nos résultats suggèreraient que les larves exposée à l'uranium modifierait leur comportement dans le but de limiter leur dépenses énergétiques et leur exposition (pas d'enfouissement dans le sédiment).

(ii) Conséquence pour la population de l'adaptation génétique à la présence d'uranium dans l'environnement sur la capacité à répondre à un nouveau changement d'environnement.

La sélection directionnelle induite par un toxique peut également induire un coût pour la population, avec une diminution de sa variabilité génétique (Posthuma et Van Straalen, 1993). La variabilité génétique détermine le potentiel adaptatif d'une population (Bell et Collins, 2008). Toute érosion génétique due à une sélection directionnelle induite par un toxique entrainera donc pour la population concernée, une diminution de sa capacité à répondre à toute nouvelle modification de son environnement (Van Straalen et Timmermans, 2002). Une des conséquences de l'adaptation d'une population à un certain environnement peut donc être une diminution de son potentiel adaptatif. Dans des conditions naturelles, l'environnement peut fluctuer selon des amplitudes, et des intervalles de temps très variables. Ces variations environnementales vont influencer la

croissance et l'abondance des populations, en modifiant notamment la force et la direction de la sélection naturelle.

Dans la nature, aucune population n'est parfaitement adaptée, car les conditions environnementales changent dans le temps et l'espace. Si les variations environnementales sont rares, alors pour chaque nouvel environnement les mécanismes adaptatifs auront le temps d'agir, et la population sera la plupart du temps adaptée. En revanche, en cas de changement d'environnement plus rapide, la population sera la plupart du temps faiblement adaptée. Si on considère alors une alternance d'environnement conduisant à des pressions de sélection directionnelles et opposées, la population peut alors être dans l'incapacité de s'adapter, et pourra donc s'éteindre (Gomulkiewicz et Holt, 1995; Bell et Collins, 2008). Ainsi la diminution du potentiel adaptatif d'une population la rendra plus vulnérables aux variations environnementales. La prise en compte de ces variabilités environnementales dans l'étude de la dynamique adaptative des populations permettrait de mieux comprendre notamment les conséquences de l'adaptation génétique de nos populations de chironomes à l'uranium.

(iii) Sélection par l'uranium, acquisition de tolérance, et évolution des traits d'histoire de vie.

Si la sélection par l'uranium au cours de l'expérience 2 a conduit à l'augmentation du niveau de tolérance des populations exposées, nous n'avons pas suivi au fil des générations son acquisition. L'évolution des traits d'histoire de vie a en revanche permis de suivre les effets de la sélection induite par l'uranium sur les performances démographiques des populations. Le lien entre la sélection induite par l'uranium, l'acquisition de tolérance, et l'évolution des traits d'histoire de vie n'a pu être démontré. Plusieurs hypothèses doivent être vérifiées:

(i) la sélection induite par l'uranium a agi directement sur les gènes codant pour les traits d'histoire de vie, et a favorisé les génotypes au succès reproducteur élevé. L'augmentation de la tolérance ne serait alors qu'une conséquence de cette sélection;

(ii) la sélection induite par l'uranium a agi sur les gènes codant pour la tolérance à l'uranium, et a favorisé les génotypes les plus tolérants. L'évolution des traits d'histoire de vie serait dûe à l'existence de compromis entre eux et le mécanisme physiologique responsable de la tolérance à l'uranium.

Glossaire

A

Adaptation (*adaptation*) : l'adaptation d'une population à son environnement est le résultat de l'action de la sélection naturelle sur la gamme de phénotypes disponibles dans une population. Les gènes conférant la meilleure valeur sélective aux individus qui les portent sont alors favorisés, et leur fréquence tendra à s'accroître dans le temps si les conditions environnementales qui les sélectionnent sont maintenues (Boivin, 2003).

Adaptation locale (*local adaptation*) : on parle d'adaptation locale lorsque dans un certain habitat, les génotypes locaux présentent une *fitness* relative supérieure aux génotypes originaire d'un autre habitat (Sotka, 2005).

C

Compromis (*Trade-offs*) : lorsqu'ils sont soumis à la sélection naturelle les traits d'histoire de vie évoluent vers une optimisation de la *fitness*, selon une trajectoire définie par des compromis ou trade-offs (Roff, 2007). Un compromis existe lorsqu'une modification sur un trait entraîne une augmentation de *fitness*, et que de manière concomitante, la modification d'un autre trait entraîne une diminution de celle-ci. Ce terme de compromis s'utilise pour décrire à la fois une corrélation statistique entre les traits, et/ou une relation fonctionnelle.

En génétique quantitative, les compromis sont considérés comme des covariances génétiques négatives entre deux traits qui peuvent être dues à des effets pléiotropes, antagonistes, ou encore un déséquilibre de liaison de plusieurs gènes (Roff et Fairbairn, 2007; Boivin, 2003). D'un point de vue fonctionnelle, le compromis peut être décrit selon un modèle d'acquisition/allocation, comme par exemple le modèle-Y de Van

Noordwijk et De Jong (1986) (pour une description de ce modèle, voir Roff et Fairbairn, 2007).

La compréhension de ces compromis fait l'objet actuellement de nombreux travaux de recherche en biologie évolutive, car si leur rôle dans l'évolution des traits d'histoire de vie ne fait aucun doute, les bases théoriques et les perspectives empiriques de leur évolution sont encore peu explorés (Agosta et Klemens, 2009; Roff, 2007; Roff et Fairbairn, 2007; Roff *et al.*, 2006; Prasad et Amitabh, 2003).

Consanguinité (*inbreeding*) : reproduction entre individus directement apparentés (endogamie) (Danchin *et al.*, 2005).

La consanguinité tend à réduire le niveau moyen de tous les caractères étroitement liés à la valeur adaptative des individus. Ceci a pour conséquence pour les individus une diminution de performance en terme de vigueur et de fertilité (Falconer et Mackay, 1996).

D

Dérive génétique (*genetic drift*) : fluctuation aléatoire de la fréquence des gènes au cours des générations liés à un effet d'échantillonnage.

La différence essentielle entre la dérive génétique et la sélection naturelle est à rechercher dans les conditions de leur enclenchement. Il n'est nullement nécessaire que la variation sur un trait ait des conséquences en terme de survie et/ou de succès reproducteur pour que la dérive génétique opère. L'importance de la dérive génétique dépend en fait de la taille de la population. Lorsque la population est petite, les biais liés à la stochasticité des processus démographique (c'est-à-dire au hasard qui va, par exemple, faire que telle lignée va ou ne va pas se reproduire à un moment donné) peuvent être importants. En effet, les probabilités qui conditionnent la duplication des allèles au sein de la reproduction sexuée ne se réalisent parfaitement que dans des populations d'effectif infini. Comme toute population naturelle est d'effectif fini, la

dérive exerce toujours une influence plus ou moins modeste en fonction de la taille réelle de l'effectif de la population et des autres forces évolutives (sélection, dispersion) en présence. De ce fait, dérive et sélection opèrent simultanément au sein de petites populations.

Déséquilibre de liaison (*linkage disequilibrium*) : dans une population, association non aléatoire d'allèles appartenant à des locus différents.

E

Effet fondation (*Foundation effect*) : il obéit au même principe que la dérive génétique et le tirage aléatoire de gamètes: lors de la fondation d'une nouvelle population (ou d'une nouvelle espèce), les individus fondateurs (souvent en petit nombre) ne représentent qu'un faible échantillon de la diversité génétique initiale de la population originale. Ceci a pour effet une perte de diversité génétique pour la population (ou l'espèce) nouvellement créée: c'est ce que l'on nomme « l'effet de fondation », ou « goulot d'étranglement » (<http://www.eleves.ens.fr/home/agarnier/glossaire.htm>).

Effet maternel (*maternal effect*) : influence du phénotype maternel sur le phénotypes des descendants ; influence indépendante de la similarité génétique. Par exemple chez les mammifères, l'allaitement entraîne des effets maternels sur la descendance.

Epistasie (*epistasy*) : Action dominante d'un gène sur un autre gène non allèle, c'est-à-dire qui n'est pas placé au même niveau que l'autre sur les chromosomes d'une paire (<http://dictionnaire.mediadico.com>).

Erosion génétique (*genetic erosion*) : perte de la diversité génétique des populations soumises à un stress anthropique (d'après Van Straalen et Timmermans, 2002).

F

Fitness (*fitness*): voir valeur sélective.

G

Gène : unité d'information dont le support matériel est la séquence d'ADN (Danchin *et al.*, 2005).

Génome (*genome*) : ensemble de l'information génétique portée par un individu (Danchin *et al.*, 2005).

Génotype (*genotype*) : composition allélique du ou des *loci* étudiés chez un individu (Danchin *et al.*, 2005).

Goulot d'étranglement (*bottleneck*) : voir « effet fondation ».

H

Héritabilité (*heritability*) h^2 : l'héritabilité d'un trait correspond au rapport entre la variance additive et la variance phénotypique (V_A/V_P). L'héritabilité est donc la part des différences entre les individus (V_P) qui est transmise aux descendants (V_A). L'héritabilité est l'hérédité des différences (Falconer et MacKay, 1996).

I

Intensité de sélection (*intensity of selection*) i : au sein d'une population donnée, différence entre la valeur moyenne d'un trait après et avant sélection divisé par l'écart type de la distribution du trait dans la population avant sélection (Danchin *et al.*, 2005).

J

Jardin commun (*common garden*) : pour un trait donné, la valeur moyenne dans une population – la moyenne phénotypique – est déterminée par des facteurs génétiques,

l'environnement, et les interactions génotype-environnement (Falconer et Mackay, 1996). Par conséquent, pour discuter des différences phénotypiques entre plusieurs populations, il est nécessaire en premier lieu de déterminer dans les différences observées, quelle est la part due au génotype et celle due à l'environnement.

L'un des moyens de faire la distinction, entre la part génétique et la part environnementale dans l'induction de différences dans les traits entre les populations, est de réaliser des expériences de type « jardin commun » (*common garden*). Les individus issus de populations vivant dans des environnements contrastés, sont placés en laboratoire dans un même environnement. Si il y a eu par le passé une adaptation génétique des populations, alors les différences observées vont persister quelque soit l'environnement. En revanche, si les différences sont principalement dues à des phénomènes d'acclimatation, alors les différences entre les individus placés dans le même environnement vont s'estomper.

L

Larve (*larva*): stade autonome et précoce du développement, qui se distingue par des traits spécifiques par rapport au autre stade du cycle de vie de l'espèce (Anger, 2006).

Locus (*locus*) : position d'un gène sur le chromosome.

M

Micro-évolution (*microevolution*) : changement, à petite échelle, des fréquences alléliques dans une population qui survient au bout de quelques générations. Les mécanismes responsables de ces changements sont notamment les mutations, la sélection naturelle, les flux de gènes, et la dérive génétique (d'après : <http://en.wikipedia.org/wiki/Microevolution>).

Microsatellite (*microsatellite*) : séquence d'ADN constituée d'une répétition d'une, deux, trois, ou quatre bases. Comme tous les gènes, ces séquences sont héréditaires selon les lois de Mendel. Dans un génome eucaryote, Cette séquence est largement dispersée. L'étude de ces microsatellites a de nombreuses applications, notamment dans le domaine de la biologie de la conservation. (<http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/definition.htm>)

P

Phénotype (*phenotype*) : ensemble des caractéristiques d'un organisme qui résultent de l'interaction entre son génome et son environnement dans lequel il s'est développé (Danchin *et al.*, 2005).

Plasticité phénotypique (*phenotypic plasticity*) V_E : capacité d'un même génotype à donner différents phénotypes selon l'environnement dans lequel l'individu se développe.

La plasticité phénotypique peut être adaptative ou refléter des effets physiologiques qui n'ont pas de signification adaptative. Elle est favorisée par la sélection naturelle lorsqu'elle permet aux individus d'une population de s'ajuster efficacement aux différents environnements qu'ils peuvent rencontrer. Il existe cependant certains coûts liés aux mécanismes sensoriels et à la régulation nécessaire pour assurer un tel niveau de flexibilité, de telle sorte que la plasticité phénotypique reste limitée (Danchin *et al.*, 2005).

Pleiotropie (*pleiotropy*) : c'est la propriété qu'ont certains gènes d'influencer plusieurs caractères phénotypiques (Boivin, 2003).

Population (*population*) : groupe d'individus ayant une plus forte probabilité de se reproduire entre eux qu'avec d'autres individus de la même espèce.

R

Rayonnement alpha (*alpha emission*) : la radioactivité alpha (ou rayonnement alpha, symbolisé α) est une forme de désintégration radioactive où un noyau atomique X éjecte une particule alpha et se transforme en un noyau Y, de nombre de masse diminué de 4 et de numéro atomique diminué de 2.

Les rayons alpha sont une forme de rayonnement émis par des particules hautement ionisées et peu pénétrantes. Elles sont constituées de deux protons et deux neutrons combinés en une particule identique au noyau d'hélium ; elles peuvent donc s'écrire He^{2+} .

Les particules alpha sont émises par des noyaux radioactifs comme l'uranium ou le radium par l'intermédiaire d'un processus nommé désintégration alpha.

S

Sélection naturelle (*natural selection*) : la sélection naturelle correspond à un processus de tri des organismes en fonction de leur capacité à survivre et à se reproduire. La sélection naturelle est à la base de l'adaptation des organismes à leur milieu.

D'une part existent des conditions, indépendantes les unes des autres. D'autres part, lorsque ces conditions sont remplies simultanément, il en découle systématiquement des conséquences. Les conditions préalables à l'enclenchement du processus de sélection naturelle sont au nombre de trois :

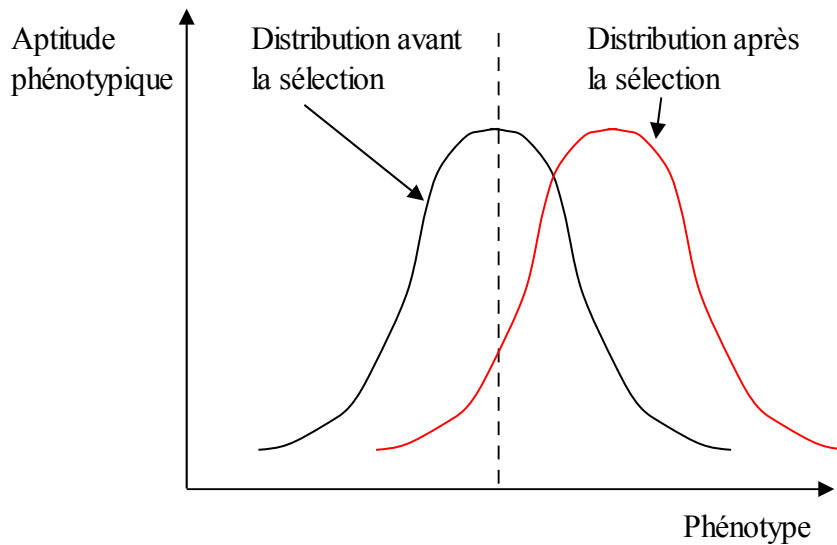
- (i) il existe une variation entre les individus pour un certain trait ;
- (ii) il existe une relation cohérente entre ce trait et la capacité des individus qui possèdent le trait à survivre et/ou à se reproduire. En d'autres termes, il existe une relation cohérente entre ce trait et l'aptitude phénotypique. C'est ce que l'on appelle la pression de sélection ;

(iii) il existe une hérédité de la variation sur le trait considéré, indépendamment des effets liés au fait que les générations successives puissent se développer dans le même environnement. Le trait doit donc être héritable.

Le processus de sélection peut être analysé à deux niveaux. (i) Le premier niveau est celui auquel s'opère le tri entre les individus d'une même espèce à l'intérieur d'une population. Ce tri s'effectue en fonction des caractéristiques des organismes qui varient d'un individu à l'autre à cause des mutations, c'est-à-dire des modifications génétiques créées accidentellement et qui à l'occasion contribuent à leur survie et à leur reproduction différentielle. (ii) Le second niveau d'analyse correspond à la réponse à la sélection naturelle au niveau des fréquences des différents allèles (Danchin *et al.*, 2005).

Sélection différentielle (*selection differential*) S : c'est l'écart qu'il y a entre la valeur phénotypique moyenne des individus sélectionnés comme parents, et la valeur phénotypique moyenne de la population avant la sélection (Falconer et Mackay, 1996).

Sélection directionnelle : en sélection directionnelle, les génotypes qui sous-tendent les phénotypes à un des deux extrêmes de la distribution sont favorisés. La moyenne va donc changer dans cette direction entre deux générations, et la variance peut éventuellement diminuer.



Stress environnemental (*environmental stress*) : conditions environnementales qui, lorsqu'elles s'appliquent pour la première fois, engendrent une diminution de la *fitness* des individus (d'après Sibly et Calow (1989) dans Bijlsma et Loeschke (2005)).

pour compenser cette réduction de *fitness*, les populations peuvent répondre phénotypiquement ou génétiquement, et élaborer des mécanismes adaptatifs afin de réduire l'impact du stress (Bijlsma et Loeschke, 2005).

I

Théorie des bons gènes (*good genes theory*) : théorie selon laquelle les femelles sont capables de discriminer les partenaires sexuels en fonction de leurs qualités génétiques (Danchin *et al.*, 2005).

Théorie des traits d'histoire de vie (*life history trait theory*) : un des points essentiels de la théorie est que les traits d'histoire de vie sont modifiés par la sélection naturelle de façon à optimiser le succès reproducteur des espèces.

Cette théorie prédit que toute perturbation entraînant une diminution de la survie des adultes va sélectionner une maturation précoce et un effort de reproduction accru. En revanche, l'inverse sera sélectionné si il y a une réduction de la survie des juvéniles.

Tolerance (*tolerance*) : aptitude d'un organisme à supporter, jusqu'à un certain seuil, une modification des conditions de son environnement (www.dictionnaire-environnement.com). A l'échelle de la population, c'est une mesure quantitative de résistance normalement distribuée (Firko et Hayes, 1990).

Traits d'histoire de vie (*life history traits*) : distribution des événements majeures au cours de la vie d'un individu qui contribuent directement à la production et la survie des descendants (<http://www.univ-tours.fr/irbi/UIEIS/Publis%20AL/Cours%20AL/Ecol%20cpte-chap3-Strat-reprod.pdf>).

V

Valeur adaptative (*adaptive value*) : voir valeur sélective.

Valeur phénotypique (*phenotypic value*) : c'est la valeur de la mesure d'un trait sur un individu de la population (Falconer et Mackay, 1996). On distingue deux composantes à cette valeur phénotypique (P) : la valeur génotypique (G) et la déviation environnementale (E).

$$P = G + E$$

G confère une certaine valeur au caractère de l'individu. E entraîne une déviation de cette valeur.

Valeur sélective (*fitness ou selective value*) : représente à la fois une estimation et une prédiction du taux de sélection naturelle.

On dit que les génotypes les plus efficaces dans leur réplication au sein de générations successives ont une plus grande valeur sélective. Ce concept s'applique à un ensemble (ou classe) d'individus définis en fonction de l'allèle (ou des allèles) qu'ils possèdent à un locus considéré (ou éventuellement plusieurs *loci* considérés simultanément). Il définit donc le succès relatif d'un allèle ou d'une combinaison d'allèles entre deux générations. Ce succès résulte directement de la survie et de la reproduction différentielle des individus de la population qui possèdent cet allèle ou cette combinaison d'allèle. Pris dans ce sens, le concept de valeur sélective n'a de sens qu'en référence à des classes d'individus et il n'est pas pertinent de valeur sélective d'un individu.

Variance génétique totale (V_G) : elle peut être décomposée en plusieurs composantes. Une partie de la contribution à la variance génétique est principalement le fait d'interactions qui se produisent spécifiquement au sein d'un individu donné. On peut en particulier identifier la composante de la variance due à la dominance entre les allèles du même locus (V_D) et les interactions dites épistatiques entre les allèles de différents *loci* (V_I). La ressemblance entre les parents et leurs enfants est déterminée par l'effet additif des allèles de chaque locus et des différents *loci* impliqués (V_A):

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

Variance phénotypique (V_P) : les différences observées entre les phénotypes des différents individus d'une population peuvent être d'origine génétique ou environnementale. Dans une majorité des cas, la variation observée entre les individus pour un trait donné procède à la fois d'effets génétiques et environnementaux. On peut donc décomposer la variance phénotypique ainsi :

$$V_P = V_G + V_E + V_{G*E}$$

Où V_G , V_E et V_{G*E} correspondent respectivement à la variance génétique, à la variance environnementale et à la variance résultant de l'interaction des deux précédentes (Danchin *et al.*, 2005).

Par approximation, la variance phénotypique résulte de l'héritabilité et de la plasticité phénotypique.

Références

bibliographiques

-A-

AFNOR. 2004. Qualité de l'eau. Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis à vis de *Chironomus riparius*. Partie 1: Sédiments naturels. Norme XP T 90-339-1. Association Française de Normalisation.

Agosta, S. J., et J. A. Klemens. 2009. Resource specialization in a phytophagous insect: no evidence for genetically based performance trade-offs across hosts in the field or laboratory. *Journal of Evolutionary Biology* 22:907-912.

Agrawal, A. A. 2001. Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294:321-326.

Akesson, M., S. Bensch, et D. Hasselquist. 2007. Genetic and phenotypic associations in morphological traits: a long term study of great reed warblers *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Avian Biology* 00:00.

Alves, L. C., U. Borgmann, et D. G. Dixon. 2008. Water-sediment interactions for *Hyaella azteca* exposed to uranium-spiked sediment. *Aquatic Ecology* In Press.

Anger, K. 2006. Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction and Development* 49:175-205.

Antonovics, J., et A. D. Bradshaw. 1970. Evolution in closely adjacent plant populations. VII Clinal patterns of a mine boundary. *Heredity* 25:349-362.

Antunes, S. C., D. R. De Figueiredo, S. M. Marques, B. B. Castro, R. Pereira, et F. Gonçalves. 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374:252-259.

Armitage, P., P. S. Cranston, et L. C. V. Pinder. 1995. *The Chironomidae, The Biology And Ecology Of Non-biting Midges*, 1st ed. Chapman & Hall, London, UK.

-B-

Bahrndorff, S., J. Ward, A. A. Hoffmann, et V. Pettigrove. 2006. A microcosm test of adaptation and species specific responses to polluted sediments applicable to indigenous chironomids (Diptera). *Environmental Pollution* 139:550-560.

BEAK International Incorporated. 1998. Toxicity of uranium and trace metals discharged to the aquatic environment project No.: 12020.1. Atomic Energy Control Board.

Bell, G., et S. Collins. 2008. Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications* 1:3-16.

Benamar, M. A., A. Zerrouki, Z. Idiri, et S. Tobbeche. 1997. Natural and artificial radioactivity levels in sediment in algiers bay. *Applied Radiation and Isotopes* 48:1161-1164.

Benoit, D. A., P. K. Sibley, J. L. Juenemann, et G. T. Ankley. 1997. *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environmental Toxicology & Chemistry* 16:1165-1176.

Bijlsma, R., et V. Loeschke. 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: An overview. *Journal of Evolutionary Biology* 18:744-749.

Boivin, T. 2003. Pléiotropie de la résistance aux insecticides: estimation, manifestations écologiques et modélisation chez le carpocapse des pommes *Cydia pomonella* (L.). PhD thesis. Université d'Avignon et Pays de Vaucluse, Avignon.

Bone, E., et A. Farres. 2001. Trends and rates of microevolution in plants. *Genetica* 112-113:165-182.

Bonzom, J. M. 1999. L'asymétrie fluctuante: un biomarqueur morphométrique pour évaluer la qualité de l'environnement. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Bourguet, D., T. Guillemaud, C. Chevillon, et M. Raymond. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58:128-135.

Burdett, A. S., M. M. Stevens, et D. L. MacMillan. 2001. Laboratory and field studies on the effect of molinate, clomazone, and thiobencarb on nontarget aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology & Chemistry* 20:2229-2236.

-C-

Caldwell, G. S., C. Lewis, P. J. W. Olive, et M. G. Bentley. 2005. Exposure to 2,4-decadienal negatively impacts upon marine invertebrate larval fitness. *Marine Environmental Research* 59:405-417.

Callaghan, A., G. Hirthe, T. Fisher, et M. Crane. 2001. Effect of short-term exposure to chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50:19-24.

Calow, P., R. M. Sibly, et V. Forbes. 1997. Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1983-1989.

Chapman, P. M., F. Wang, C. R. Janssen, R. R. Goulet, et C. N. Kamunde. 2003. Conducting Ecological Risk Assessments of Inorganic Metals and Metalloids: Current Status. *Human and Ecological Risk Assessment* 9:641-697.

Charles, A. L., S. J. Markich, A. L. Charles, L. F. De Filippis, et J. L. Stauber. 2002. The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology* 60:61-73.

Charles, S., M. Ferreol, A. Chaumot, et A. R. R. Pery. 2004. Food availability effect on population dynamics of the midge *Chironomus riparius*: a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling* 175:217-229.

Clarke, G. M., et J. A. McKenzie. 1987. Developmental stability of insecticide resistant phenotype in blowfly: a result of canalizing natural selection. *Nature* 325:345-346.

Clarke, G. M., et J. A. McKenzie. 1992. Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. *Journal of Economic Entomology* 85:2045-2050.

Clarke, G. M. 1995. Relationship between developmental stability and fitness: Application for conservation biology. *Conservation Biology* 9:18-24.

Clarke, G. M. 1995. Relationship between fluctuating asymmetry and fitness: how good is the evidence?

Clarke, G. M., J. L. Yen, et J. A. McKenzie. 2000. Wings and bristles: Character specificity of the asymmetry phenotype in insecticide-resistant strains of *Lucilia*

cuprina. Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences 267:1815-1818.

Clarke, G. M. 2003. Developmental stability-fitness relationships in animals: some theoretical considerations, p. 187-195. In M. Polak (ed.), Developmental instability: causes and consequences. Oxford University Press, New York.

Clements, W. H. 1994. Benthic invertebrate community responses to heavy metals in the Upper Arkansas River Basin, Colorado. Journal of the North American Benthological Society 13:30-44.

Coffman, W.P., *Chironomidae*, in An introduction to the aquatic insects of North America, M.C. R.W., K.W., Editor. 1978, Kendall & Hunt Publishing Company: Iowa, USA. p. 345-376.

Colle, C., J. Garnier-Laplace, S. Roussel-Debet, C. Adam, et J. P. Baudin. 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement, p. 187-211, L'uranium de l'environnement à l'homme. EDP sciences.

Crane, M., W. Sildanchandra, R. Kheir, et A. Callaghan. 2002. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. Ecotoxicology and Environmental Safety 53:361-369.

Curtis, G. P., P. Fox, J. A. Davis, et M. Kohler. 2004. Comparison of in situ uranium K_D values with a laboratory determined surface complexation model. Applied Geochemistry 19:1643-1653.

-D-

Dal Pos, N. 2008. Etudes des modifications phénotypiques d'une population d'invertébrés benthiques (*Chironomus riparius*) soumise à une exposition chronique à l'uranium dans le sédiment. Master 2. Université Paul Sabatier, Toulouse III, Toulouse.

Danchin, E., L. A. Giraldeau, et F. Cézilly. 2005. Ecologie comportementale, cours et question de réflexion. Dunod, Paris.

De Haas, E. M., C. Wagner, A. A. Koelmans, M. H. S. Kraak, et W. Admiraal. 2006. Habitat selection by chironomid larvae: fast growth requires fast food. *Journal of Animal Ecology* 75:148-155.

De Lange, H. J., V. Sperber, et E. T. H. M. Peeters. 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environmental Toxicology & Chemistry* 2006:452-457.

Dechamps, C., C. Lefebvre, N. Noret, et P. Meerts. 2007. Reaction norms of life history traits in response to zinc in *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites. *New Phytologist* 173:191-198.

Demers, S. 1999. Facteurs biologiques influençant l'asymétrie fluctuante au niveau des anneaux de croissance des cornes des mouflons d'Amérique. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Denison, F. 2004. Uranium (VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of freshwater bivalve. PhD thesis. IRSN/Université d'Aix Marseille I (France).

DeWitt, T. J., A. Sih, et D. S. Wilson. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 13:77-81.

Dias, V., C. Vasseur, B. Ksas, V. Camilleri, et J. M. Bonzom. 2008. Sublethal effects of sediment-associated uranium in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Chemosphere* 71:574-581.

Dongen, S. V. 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: Past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1727-1743.

Doretto, L., D. Ferrara, G. Barison, R. Gerbasio, et G. Battiston. 1992. Natural radionuclides in the muds and waters used in thermal therapy in Abano Terme, Italy. *Radiation protection dosimetry* 45:175-178.

Downes, J. A. 1969. The swarming and mating flight of Diptera. *Annual Review of Entomology* 14:271-298.

Ducrot, V., A. R. R. Pery, R. Mons, et J. Garric. 2004. Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge (*Chironomus riparius*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:225-231.

Ducrot, V. 2005. Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques: perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques. Université de Metz.

-E-

Edwards, D. D. 2004. In search of fluctuating asymmetry: No evidence among *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) parasitized by the ectoparasitic water mite *Unionicola foili* (Acari: Unionicolidae). *Acarologia* 44:209-217.

Engqvist, L. 2007. Environment-dependent genetic correlations between development time and body mass in a scorpionfly. *Zoology* 110:344-353.

Environnement Canada. 1997. Méthode d'essai biologique: essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. SPE 1/RM/32. Environnement Canada.

EPA. 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates EPA 600/R-99/064. U.S. Environmental Protection Agency.

Eränen, J. K. 2008. Rapid evolution towards heavy metal resistance by mountain birch around two subarctic copper-nickel smelters. *Journal of Evolutionary Biology* 21:492-501.

Estes, E. C., C. R. Katholi, et R. A. Angus. 2005. Elevated fluctuating asymmetry in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a river receiving paper mill effluent. *Environmental Toxicology & Chemistry* 25:1026-1033.

-F-

Falconer, D. S., et T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics, Longman Group Ltd ed. Prentice Hall, Edimbourg, England.

Farmer, G. J., D. Ashfield, et H. S. Samant. 1979. Effects of Zinc on Juvenile Atlantic Salmon *Salmo Salar*: Acute Toxicity, Food Intake, Growth and Bioaccumulation. *Environmental Pollution* 19:103-117.

Firko, M. J., et J. L. Hayes. 1990. Quantitative genetic tools for insecticide resistance risk assessment: estimating the heritability of resistance. *Journal of Economic Entomology* 83:647-654.

Floate, K. D., et S. Fox. 2000. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecological Applications* 10:1541-1550.

Forbes, V. E., P. Calow, et R. M. Sibly. 2001. Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment? *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:442-447.

Forbes, V. E., et P. Calow. 2002. Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 357:1299-1306.

Franklin, N. M., J. L. Stauber, N. M. Franklin, R. P. Lim, et S. J. Markich. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology* 48:275-289.

Fyodorova, M. V., et A. I. Azovsky. 2003. Interactions Between Swarming *Chironomus annularius* (Diptera: Chironomidae) Males: Role of Acoustic Behavior. *Journal of Insect Behavior* 16:295-306.

-G-

Gagliano, M., et M. I. McCormick. 2007. Maternal condition influences phenotypic selection on offspring. *Journal of Animal Ecology* 76:174-182.

Gangestad, S. W., et R. Thornhill. 2003. Fluctuating asymmetry, developmental instability, and fitness: toward model-based interpretation, p. 62-80. In M. Polak (ed.), *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford University Press, Oxford.

Garland, T. J. 2003. Selection experiments: an under-utilized tool in biomechanics and organismal biology, p. 23-56. In V. L. Bels, J. P. Gasc, et A. Casinos (ed.), *Vertebrate Biomechanics and Evolution*. Taylor & Francis Group, Oxford.

Gilchrist, G. W., R. B. Huey, et L. Serra. 2001. Rapide evolution of wing size clines in *Drosophila subobscura*. *Genetica* 112-113:273-286.

Gillis, P. L., L. C. Diener, T. B. Reynoldson, et D. G. Dixon. 2002. Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*) and *Chironomus riparius* (Diptera): correlation with reproduction and growth. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21:1836-1844.

Goddeeris, B.R., A.C. Vermeulen, E. De Geest, H. Jacobs, B. Baert, and F. Ollevier, Diapause induction in the third and fourth instar of *Chironomus riparius* (Diptera) from Belgian lowland brooks. *Archiv fur Hydrobiologie*, 2001. 150(2): p. 307-327.

Goedkoop, W., et M. Peterson. 2003. The fate, distribution, and toxicity of lindane in tests with *Chironomus riparius*: effects of bioturbation and sediment organic matter content. *Environmental Toxicology & Chemistry* 22:67-76.

Gomulkiewicz, R., et R. D. Holt. 1995. When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution* 49:201-207.

Groenendijk, D. 1999. Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. Amsterdam University.

Guedes, R. N. C., E. E. Oliveira, N. M. P. Guedes, B. Ribeiro, et J. E. Serrao. 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31:30-38.

Guillemaud, T., T. Lenormand, D. Bourguet, C. Chevillon, N. Pasteur, et M. Raymond. 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. *Evolution* 52:430-440.

-H-

Haimi, J., K. E. Knott, S. Selonen, et M. Laurikainen. 2006. Has long-term metal exposure induced changes in life history traits and genetic diversity of the enchytraeid worm *Cognettia sphagnetorum* (Vejd.)? *Environmental Pollution* 140:463-470.

Hardersen, S., et S. D. Wratten. 1998. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *Xathocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry. *Ecotoxicology* 7:297-304.

Hardersen, S., et C. M. Frampton. 1999. Effects of short term pollution on the level of fluctuating asymmetry - a case study using damselflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92:1-7.

Hardersen, S. 2000. Effects of carbaryl exposure on the last larval instar of *Xanthocnemis zealandica* - fluctuating asymmetry and adult emergence. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96:221-230.

Harshman, L. G., H. G. Müller, X. Liu, Y. Wang, et J. R. Carey. 2005. The Symmetry of Longevity. *Journal of Gerontology* 10:1233-1237.

Hart, D. R., P. M. Mc Kee, A. J. Burt, et M. J. Goffin. 1986. Benthic community and sediment quality assessment of Port Hop Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 12:206-220.

Hendrickx, F., J. P. Maelfait, et L. Lens. 2003. Relationship between fluctuating asymmetry and fitness within and between stressed and unstressed populations of the wolf spider *Pirata piraticus*. *Journal of Evolutionary Biology* November 16:1270-1279.

Hendrickx, F., J. P. Maelfait, M. Speelmans, et N. M. Van Straalen. 2003. Adaptive reproductive variation along a pollution gradient in a wolf spider *Pirata piraticus*. *Oecologia* 134:189-194.

Hendry, A. P., et M. T. Kinnison. 1999. Perspective: The pace of modern life: Measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution* 53:1637-1653.

Hendry, A. P., et M. T. Kinnison. 2001. An introduction to microevolution: Rate, pattern, process. *Genetica* 112-113:1-8.

Hendry, A. P., T. J. Farrugia, et M. T. Kinnison. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology* 17:20-29.

Hendry, A. P., et A. Gonzalez. 2008. Whither adaptation? *Biology and Philosophy* 23:673-699.

Hirthe, G., T. C. Fisher, M. Crane, et A. Callaghan. 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., et P. A. Parsons. 1991. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, New York.

Hoffmann, A. A., et P. A. Parsons. 1997. *Extreme Environmental Change and Evolution*. University Press, Cambridge.

Hoffmann, A. A., et R. E. Woods. 2003. Associating environmental stress with developmental stability: problems and patterns, p. 387-401. In M. Polak (ed.), *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford University Press, Oxford.

Honek, A. 1993. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 66:483-492.

Hooper, H. L., R. M. Sibly, T. H. Hutchinson, et S. J. Maund. 2003. The influence of larval density, food availability and habitat longevity on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *Oikos* 102:515-524.

Hooper, H. L., R. M. Sibly, T. H. Hutchinson, et S. J. Maund. 2005. Joint effects of density and a growth inhibitor on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:1140-1145.

Hunt, J., C. J. Breuker, J. A. Sadowski, et A. J. Moore. 2009. Male–male competition, female mate choice and their interaction: determining total sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology* 22:13-26.

Hynes, T. P. 1990. The impacts of the Cluff Lake uranium mine and mill effluents of northern Saskatchewan: M.Sc. thesis. University of Saskatchewan.

-I-

IRSN. 2007. Expertise globale du bilan décennal environnemental d'AREVA NC, 2ème partie: impact environnementale à l'échelle des bassins versants et évaluation de la surveillance. DEI/SARG/2007-042.

-J-

Janssens De Bisthoven, L., P. Nuyts, B. Goddeeris, et F. Ollevier. 1998. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: Clues to understanding their bioindicator value. *Freshwater Biology* 39:179-191.

Janssens De Bisthoven, L., A. Vermeulen, et F. Ollevier. 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.

Joshi, S. R., T. D. Waite, et R. F. Platford. 1989. Vertical distribution of uranium mill tailings contaminants in Langley Bay, lake Athabasca sediments. *Science of the Total Environment* 87-88:85-104.

-K-

Kasumovic, M. M., et M. C. B. Andrade. 2009. A change in competitive context reverses sexual selection on male size. *Journal of Evolutionary Biology* 22:324-333.

Kiffney, P. M., et W. H. Clements. 1994. Effects of heavy metals on a macroinvertebrate assemblage from a Rocky Mountain stream in experimental microcosms. *Journal of the North American Benthological Society* 13:511–523.

Kingsolver, J. G., et R. B. Huey. 2003. Introduction: The Evolution of Morphology, Performance, and Fitness. *Integrative and Comparative Biology* 43:361-366.

Kingsolver, J. G., K. R. Massie, G. J. Ragland, et M. H. Smith. 2007. Rapid population divergence in thermal reaction norms for an invading species: breaking the temperature–size rule. *Journal of Evolutionary Biology* 20:892-900.

Klerks, P. L. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution* 45:173-205.

Klerks, P. L., et J. S. Levinton. 1989. Rapide evolution of metal resistance in a benthic oligochaete inhabiting a metal-polluted site. *Biol. Bull.* 176:135-141.

Klerks, P. L., et J. S. Levinton. 1993. Evolution of resistance and changes in community composition in metal-polluted environments: a case study on Foundry Cove, p. 223-241. In R. Dallinger et P. S. Rainbow (ed.), *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis publishers.

Klerks, P. L., et S. A. Lentz. 1998. Resistance to lead and zinc in the western mosquitofish *Gambusia affinis* inhabiting contaminated Bayou Trepagnier. *Ecotoxicology* 7:11-17.

Klerks, P. L. 2002. Adaptation, ecological impacts, and risk assessment: insight from research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:971-982.

Kosalwat, P., et A. W. Knight. 1987. Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16:283-290.

Kuhne, W. W., C. A. Caldwell, W. R. Gould, P. R. Fresquez, et S. Finger. 2002. Effets of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyallela azteca*. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21:2198-2203.

Kurnaz, A., B. Küçükömeroglu, R. Keser, N. T. Okumusoglu, F. Korkmaz, G. Karahan, et U. Cevik. 2007. Determination of radioactivity levels and hazards of soil and sediment samples in Firtina Valley (Rize, Turkey). *Applied Radiation and Isotopes* 65:1281-1289.

Kwak, I.-S., et W. Lee. 2005. Mouthpart deformity and developmental retardation exposure of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) to tebufenozide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:859-865.

-L-

Labrot, F., J. F. Narbonne, M. Saint Denis, P. Ville, et D. Ribera. 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: Comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:167-178.

Lagauzere, S. 2008. Influence de la bioturbation des macroinvertébrés benthiques sur le comportement biogéochimique de l'uranium au sein des sédiments d'eau douce. Université d'Aix-Marseille II.

Lambrechts, A., L. Foulquier, et J. Garnier-Laplace. 1992. Natural radioactivity in the aquatic components of the main french rivers. *Radiation protection dosimetry* 45:253-256.

Landa, E. R. 2004. Uranium mill tailings: nuclear waste and natural laboratory for geochemical and radioecological investigations. *Journal of Environmental Radioactivity* 77:1-27.

Langmuir, D. 1978. Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:547-596.

Leary, R. F., et F. W. Allendorf. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4:214-217.

Lenihan, H. S., K. A. Kiest, K. E. Conlan, P. N. Slattery, B. H. Konar, et J. S. Oliver. 1995. Patterns of survival and behavior in Antarctic benthic invertebrates exposed to contaminated sediments: field and laboratory bioassay experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192:233-255.

Lenormand, T., T. Guillemaud, D. Bourguet, et M. Raymond. 1998. Appearance and sweep of a gene duplication: adaptive response and potential for a new function in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 52:1705-1712.

Leppanen, M. T., J. F. Postma, D. Groenendijk, J. V. K. Kukkonen, et M. C. Buckert-de Jong. 1998. Feeding Activity of Midge Larvae (*Chironomus riparius* Meigen) in Metal-Polluted River Sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41:251-257.

Lestaevel, P., P. Houpert, C. Bussy, B. Dhieux, P. Gourmelon, et F. Paquet. 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212:219-226.

Liber, K. 2010 in preparation. Toxicity of uranium, molybdenum, nickel, and arsenic to *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* in water-only and spiked-sediment toxicity test. Toxicology Centre, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.

Lopes, I., D. J. Baird, et R. Ribeiro. 2005. Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. *Chemosphere* 61:1189-1197.

Lopes, I., D. J. Baird, et R. Ribeiro. 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:275-285.

Lottermoser, B., P. Ashley, et M. Costelloe. 2005. Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology* 48:748-761.

Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby, et E. R. Landa. 1991. Microbial reduction of uranium. *Nature* 350:413-416.

Lovley, D. R., D. E. Holmes, et K. P. Nevin. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* 49:219-286.

Lozano, J. C., P. Blanco Rodriguez, et F. Vera Tome. 2002. Distribution of long-lived radionuclides of the ^{238}U series in the sediments of a small river in a uranium mineralized region of Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 63:153-171.

Luckinbill, L. S., et M. J. Clare. 1985. Selection for life span in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 55:9-18.

Luckinbill, L. S., T. A. Grudzien, S. Rhine, et G. Weisman. 1989. The genetic basis of adaptation to selection for longevity in *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary Ecology* 3:31-39.

Lynch, M., et B. Walsh. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

-M-

Magnusson, J., et C. Ramel. 1986. Genetic variation in the susceptibility to mercury and other metal compounds in *Drosophila melanogaster*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 6:289-305.

- Mallory-Smith, C., P. Hendrickson, et G. Mueller-Warrant. 1999. Cross-resistance of primisulfuron-resistant *Bromus tectorum* L. (downy brome) to sulfosulfuron. *Weed Science* 47:256-257.
- Manier, M. K., C. M. Seyler, et S. J. Arnold. 2007. Adaptive divergence within and between ecotypes of the terrestrial garter snake, *Thamnophis elegans*, assessed with FST-QST comparisons. *Journal of Evolutionary Biology* 20:1705-1719.
- Markich, S. J., P. L. Brown, R. A. Jeffree, et R. P. Lim. 2000. Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology* 51:155-175.
- Markich, S. J. 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *TheScientificWorldJournal* 2:707-729.
- Maroni, G., J. Wise, J. E. Young, et E. Otto. 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117:739-744.
- Martinez, E. A., L. Wold, B. C. Moore, J. Schaumloffel, et N. Dasgupta. 2006. Morphologic and growth responses in *Chironomus tentans* to arsenic exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:529-536.
- Mc Guigan, K. 2006. Studying phenotypic evolution using multivariate quantitative genetics. *Molecular Ecology* 15:883-896.
- Mc Kee, P. M., W. J. Snodgrass, D. R. Hart, H. C. Duthie, J. H. Mc Andrews, et W. Keller. 1987. Sedimentation rates and sediment core profiles of ^{238}U and ^{232}Th decay chain radionuclides in a lake affected by uranium mining and milling. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 44:390-398.

McLachlan, A., et M. Cant. 1995. Small males are more symmetrical - mating success in the midge *Chironomus plumosus* (diptera, chironomidae). *Animal Behaviour* 50:841-846.

McLachlan, A. J. 1997. Size or symmetry - an experiment to determine which of the two accounts for mating success in male midges. *Ecoscience* 4:454-459.

McLachlan, A., R. Ladle, et B. Crompton. 2003. Predator-prey interactions on the wing: aerobatics and body size among dance flies and midges. *Animal Behaviour* 66:911-915.

Medina, M. H., J. A. Correa, et C. Barata. 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67:2105-2114.

Meregalli, G., L. Pluymers, et F. Ollevier. 2001. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environmental Pollution* 111:241-246.

Mitchell, S. E., C. A. Caldwell, G. Gonzales, W. R. Gould, et R. Arimoto. 2005. Effect of depleted uranium on survival, growth, and metamorphosis in the african clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68:951-965.

Moeur, J. E., et C. A. Istock. 1980. Ecology and evolution of the pitcher-plant mosquito. IV. Larval influence over adult reproductive performance and longevity. *Journal of Animal Ecology* 49:775-792.

Moller, A. P., et J. P. Swaddle. 1997. *Asymmetry, Developmental stability and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.

Moller, A. P. 1997. Developmental stability and fitness: a review. *American Naturalist* 149:916-932.

- Nassar, R. 1979. Genetics of resistance to tetraethyllead. *Australian Journal of Biological Sciences* 32:127-132.
- Naylor, C., et J. Howcroft. 1997. Sediment bioassays with *Chironomus riparius*: Understanding the influence of experimental design on test sensitivity. *Chemosphere* 35:1831-1845.
- Neame, P. A., J. R. Dean, et B. G. Zytaruk. 1982. Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 91-92:355-361.
- Nebeker, A. V., M. A. Cairns, et W. C.M. 1984. Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper. *Environmental toxicology & contamination* 3:151-158.
- Neems, R. M., A. McLachlan, et R. Chambers. 1990. Body size and lifetime mating success of male midges (Diptera: Chironomidae). *Animal Behaviour* 40:648-652.
- Neems, R. M., J. Lazarus, et A. J. McLachlan. 1998. Lifetime reproductive success in a swarming midge - trade-offs and stabilizing selection for male body size. *Behavioral Ecology* 9:279-286.
- Nowak, C., T. Hankeln, E. R. Schmidt, et K. Schwenk. 2006. Development and localization of microsatellite markers for the sibling species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* (Diptera: Chironomidae). *Molecular Ecology Notes* in press.
- Nowak, C., D. Jost, C. Vogt, M. Oetken, K. Schwenk, et J. Oehlmann. 2007. Consequences of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 85:278-284.

Nowak, C., C. Vogt, M. Pfenninger, K. Schwenk, J. Oehlmann, B. Streit, et M. Oetken. 2009. Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations. *Environmental Pollution* 157:881-886.

-O-

OECD. 2001. Guidelines for the testing of chemicals: sediment-water chironomid toxicity test using spiked water. Draft document, Proposal for a new guideline 219. OECD.

-P-

Palmer, A. R., et C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17:391-421.

Palmer, A. R., et C. Strobeck. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica* 191:57-72.

Palmer, A. R. 1994. Fluctuating asymmetry: a primer. In T. A. Markov (ed.), *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Kluwer, Dordrecht.

Palmer, A. R., et C. Strobeck. 2001. Fluctuating asymmetry analysis revisited. In M. Polak (ed.), *Developmental Instability: Causes et Consequences*. Oxford University Press, Oxford.

Pascoe, D., K. A. Williams, et D. W. J. Green. 1989. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* meigen - effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia* 175:109-115.

Peck, M. R., D. A. Klessa, et D. J. Baird. 2002. A tropical sediment toxicity test using the dipteran *Chironomus crassiforceps* to test metal bioavailability with sediment pH change in tropical acid-sulfate sediments. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21:720-728.

Pergams, O. R. W., et M. V. Ashley. 2001. Microevolution in island rodents. *Genetica* 112-113:245-256.

Pery, A. R. R., R. Mons, P. Flammarion, L. Lagadic, et J. Garric. 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology & Chemistry* 21:2507-2513.

Pery, A. R. R., V. Ducrot, R. Mons, et J. Garric. 2003. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 65:281-292.

Pery, A. R. R. 2003. Modélisation des effets toxiques sur le chironome *Chironomus riparius* de l'individu à la population. PhD thesis. Université Claude Bernard, Lyon, France.

Petrauskiene, L. 2003. Water and sediment toxicity assessment by use of behavioural responses of medicinal leeches. *Environment International* 28:729-736.

Piola, R. F., et E. L. Johnston. 2006. Differential tolerance to metals among populations of the introduced bryozoan *Bugula neritina*. *Marine Biology* 148:997-1010.

Piscart, C., J.-C. Moreteau, et J.-N. Beisel. 2005. Decrease of fluctuating asymmetry among larval instars in an aquatic, holometabolous insect. *Comptes Rendus - Biologies* 328:912-917.

Pither, J., et P. D. Taylor. 2000. Directional and fluctuating asymmetry in the black-winged damselfly *Calopteryx maculata* (Beauvois) (Odonata: Calopterygidae). *Canadian Journal of Zoology* 78:1740-1748.

Polak, M. 2003. *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York.

Posthuma, L., et N. M. Van Straalen. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 106:11-38.

Postma, J. F., et C. Davids. 1995. Tolerance induction and life cycle changes in cadmium-exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 30:195-202.

Postma, J. F., M. Kyed, et W. Admiraal. 1995. Site specific differentiation in metal tolerance in the midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Hydrobiologia* 315:159-165.

Postma, J. F., A. Van Kleunen, et W. Admiraal. 1995. Alterations in life-history traits of *Chironomus riparius* (Diptera) obtained from metal contaminated rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29:469-475.

Powles, S. B., D. F. Lorraine-Coldwill, J. J. Dellow, et C. Preston. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46:604-607.

Prasad, N. G., et J. Amitabh. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of Genetics* 82:45-76.

-R-

Ragnarsdottir, K. V., et L. Charlet. 2000. Uranium behaviour in natural environments, p. 333-377. In M. S. o. G. B. Ireland (ed.), Environmental mineralogy microbial interactions. Anthropogenic influences. Contaminated land and waste management.

Raymond, M., C. Chevillon, T. Guillemaud, T. Lenormand, et N. Pasteur. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences 353:1707-1711.

Raymond, M., C. Berticat, M. Weill, N. Pasteur, et C. Chevillon. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: What have we learned about adaptation? Genetica 112-113:287-296.

Räsänen, K., et L. E. B. Kruuk. 2007. Maternal effect and evolution at ecological time-scales. Functional Ecology.

Reed, D. H., et R. Frankham. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. Conservation Biology February 17:230-237.

Reznick, D. N., et C. K. Ghalambor. 2001. The population ecology of contemporary adaptations: What empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. Genetica 112-113:183-198.

Reznick, D. N., et C. K. Ghalambor. 2005. Selection in nature: Experimental manipulations of natural populations. Integrative and Comparative Biology 45:456-462.

Ribera, D., F. Labrot, G. Tisnerat, et J. F. Narbonne. 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. Reviews of environmental contamination and toxicology 146:53-89.

Ristola, T., J. Pellinen, M. Ruokolainen, A. Kostamo, et J. V. K. Kukkonen. 1999. Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environmental Toxicology & Chemistry* 18:756-764.

Ritz, C., et J. C. Streibig. 2005. Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12:1-22.

Roff, D. 1992. *The evolution of life histories*. Chapman et Hall, New York.

Roff, D., et M. J. Bradford. 1998. The evolution of shape in the wing dimorphic cricket, *Allonemobius socius*. *Heredity* 80:446-455.

Roff, D. A., E. Heibo, et L. A. Vollestad. 2006. The importance of growth and mortality costs in the evolution of the optimal life history doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01155.x. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1920-1930.

Roff, D. 2007. Contributions of genomics to life-history theory. *Genetics* 8:116-125.

Roff, D., et D. J. Fairbairn. 2007. The evolution of trade-offs: where are we? *Journal of Evolutionary Biology* 20:433-447.

Roff, D. 2007. Contributions of genomics to life-history theory. *Genetics* 8:116-125.

-S-

Schlüns, H., E. A. Schlüns, J. Van Praagh, et R. F. A. Moritz. 2003. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* 34:577-584.

Servia, M. J., F. Cobo, et M. A. Gonzalez. 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 & Assessment January 90:101-112.

Servia, M. J., F. Cobo, et M. A. Gonzalez. 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 & Assessment January 90:101-112.

Sheppard, S. C., M. I. Sheppard, M.-O. Gallerand, et B. Sanipelli. 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. Journal of Environmental Radioactivity 79:55-83.

Shirley, M. D. F., et R. M. Sibly. 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. Evolution 53:826-836.

Sibley, P. K., D. A. Benoit, et G. T. Ankley. 1997. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. Environmental Toxicology & Chemistry 16:336-345.

Sibley, P. K., G. T. Ankley, et D. A. Benoit. 2001. Factors affecting reproduction and the importance of adult size on reproductive output of the midge *Chironomus tentans*. Environmental Toxicology & Chemistry 20:1296-1303.

Sibly, R. M., et P. Calow. 1989. A life-cycle theory of responses to stress. Biological Journal - Linnean Society 37:101-116.

Sibly, R. M. 1994. From organism to population: the role of life-history theory, p. 63-74. In D. W. Sutcliffe (ed.), Water quality and stress indicators in marine and freshwater ecosystems. Freshwater biology association, Ambleside.

Signoret, P. 2008. Effet d'un sédiment contaminé à l'uranium sur l'asymétrie fluctuante de *Chironomus riparius*. Rapport Master 2. Université Paul Valéry, Montpellier III, Montpellier.

Sotka, E. E. 2005. Local adaptation in host use among marine invertebrates. *Ecology Letters* 8:448-459.

Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.

Steiger, S., K. Richter, J. K. Müller, et A. E. Eggert. 2007. Maternal nutritional condition and genetic differentiation affect brood size and offspring body size in *Nicrophorus*. *Zoology* 110:360-368.

Stockwell, C. A., A. P. Hendry, et M. T. Kinnison. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18:94-101.

Swaddle, J. P. 2003. Fluctuating asymmetry, animal behavior, and evolution. *advances in the study of behavior* 32:169-205.

Swanson, S. M. 1985. Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Physics* 49:747-770.

-T-

Tachet, H., M. Bournaud, and P. Richoux, *Introduction à l'étude des macroinvertébrés des eaux douces*. 1980, Université de Lyon: Lyon.

Terrail, R., S. Lagauzere, et J. M. Bonzom. 2008. Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* In Press.

Thomas, P., et K. Liber. 2001. An estimation of radiation doses to benthic invertebrates from sediments collected near a Canadian uranium mine. *Environment International* 27:341-353.

Thompson, P. A., J. Kurias, et S. Mihok. 2005. Derivation and use of sediment quality guidelines for ecological risk assessment of metals and radionuclides released to the environment from uranium mining and milling activities in Canada. *Environmental Monitoring and Assessment* 110:71-85.

Tokeshi, M., et K. Reinhardt. 1996. Reproductive behaviour of *Chironomus anthracinus* (Diptera: Chironomidae), with a consideration of the evolution of swarming. *Journal of Zoology of London* 240:103-112.

Tsabaris, C., G. Eleftheriou, V. Kapsimalis, C. Anagnostou, R. Vlastou, C. Durmishi, M. Kedhi, et C. A. Kalfas. 2007. Radioactivity levels of recent sediments in the butrint lagoon and th adjacent coast of Albania. *Applied Radiation and Isotopes* 65:445-453.

Tschirren, B., A. N. Rutstein, E. Postma, M. Mariette, et S. C. Griffith. 2009. Short- and long-term consequences of early developmental conditions: a case study on wild and domesticated zebra finches. *Journal of Evolutionary Biology* 22:387-395.

-V-

Van Noordwijk, A. J., et G. De Jong. 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *American Naturalist* 128:137-142.

Van Straalen, N. M., T. B. A. Burghouts, M. J. Doornhof, G. M. Groot, M. P. Janssen, E. N. G. Joosse, J. H. Van Meerendonk, J. P. J. J. Theeuwen, H. A. Verhoef, et H. R. Zoomer. 1987. Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *Journal of Applied Ecology* 24:953-968.

Van Straalen, N. M., et M. J. T. N. Timmermans. 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: An evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:983-1002.

Vedamanikam, V. J., et N. A. M. Shazilli. 2008. The effect of multi-generational exposure to metals and resultant change in median lethal toxicity tests values over subsequent generations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80:63-67.

Vermeulen, A. C., P. C. Dall, C. Lindegaard, F. Ollevier, et B. Goddeeris. 1998. Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: A case study in three Danish lowland streams. *Archiv fur Hydrobiologie* 144:103-125.

Vermeulen, A. C., G. Liberloo, P. Dumont, F. Ollevier, et B. Goddeeris. 2000. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (diptera) to lead, mercury and beta-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere* 41:1581-1591.

Villisics, F., P. Solymos, et E. Hornung. 2005. Measuring fluctuating asymmetry of the terrestrial isopod *Trachelipus rathkii* (Crustacea: Isopoda, Oniscidea). *European Journal of Soil Biology* 41:85-90.

Vogt, C., C. Nowak, J. B. Diogo, M. Oetken, K. Schwenk, et J. Oehlmann. 2007. Multi-generation studies with *Chironomus riparius* - Effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere* 67:2192-2200.

Vogt, C., D. Belz, S. Galluba, C. Nowak, M. Oetken, et J. Oehlmann. 2007. Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera)—baseline experiments for future multi-generation studies. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42:1-9.

-W-

- Waddington, C. H. 1957. The strategy of the genes, Allan and Unwin ed, London.
- Ward, T. J., et W. E. Robinson. 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 24:2341-2349.
- Watson, P., et R. Thornhill. 1994. Fluctuating asymmetry and sexual selection. Trends in Ecology & Evolution 9:21-25.
- Watts, M. M., et D. Pascoe. 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., et D. Pascoe. 2000. Comparison of *Chironomus riparius* meigen and *Chironomus tentans Fabricius* (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. Environmental Toxicology and Chemistry 19:1885-1892.
- Watts, M. M., D. Pascoe, et K. Carroll. 2001. Chronic exposure to 17 β -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Aquatic Toxicology 55:113-124.
- Watts, M. M., D. Pascoe, et K. Carroll. 2003. Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. Ecotoxicology and Environmental Safety 54:207-215.
- Weill, M., O. Duron, P. Labbé, A. Berthomieu, et M. Raymond. 2003. La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides. Médecine Sciences 19:1190-1192.

Wenstel, R., A. Mc Intosh, Mc Cafferty, W.P., G. Atchinson, et V. Anderson. 1977. Avoidance response of midge larvae (*Chironomus tentans*) to sediment containing heavy metals. *Hydrobiologia* 55:171-175.

West, C. W., et G. T. Ankley. 1998. A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 35:20-24.

Williams, K. A., D. W. J. Green, D. Pascoe, et D. E. Gower. 1986. The acute toxicity to different larval stages of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* 70:362-366.

Windom, H., R. Smith, C. Alexander, et F. Niencheski. 2000. Uranium in rivers and estuaries of globally diverse, smaller watersheds. *Marine Chemistry* 68:307-321.

Woods, R. E., C. M. Sgro, M. J. Hercus, et A. A. Hoffmann. 2002. Fluctuating asymmetry, fecundity and development time in *Drosophila*: is there an association under optimal and stress conditions? *Journal of Evolutionary Biology* January 15:146-157.

-X-

Xie, L., et P. L. Klerks. 2003. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:313-320.

Xie, L., et P. L. Klerks. 2004. Changes in cadmium accumulation as a mechanism for cadmium resistance in the least killifish *Heterandria formosa*. *Aquatic Toxicology* 66:73-81.

Xue, R. D., et A. Ali. 1994. Oviposition, fecundity, and body size of a pestiferous midge, *Chironomus crassicaudatus* (diptera, chironomidae). Environmental Entomology 23:1480-1484.

-Y-

Yardley, R. B., J. M. Lazorchak, et L. C. Gast. 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. Environmental Toxicology & Chemistry 15:1532-1537.

-Z-

Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis 4th edition, Prentice Hall International ed, Upper Saddle River, New jersey, USA.

Annexe 1

Chironomus riparius: biologie et écologie

C. riparius fait parti de l'embranchement des Arthropodes, de la classe des Insectes (Diptère) (Tachet *et al.*, 1980). L'espèce appartient à la famille des *Chironomidae*, à la sous-famille des *Chironominae*, à la tribu des *Chironomini* et au genre *Chironomus*.

La famille des *Chironomidae* est le groupe d'insectes le plus ubiquiste et le plus abondant parmi tous les invertébrés benthiques (Environnement Canada, 1997): il existe plus de 15000 espèces de Chironomides dans le monde. *C. riparius* est une espèce benthique commune dans les zones mi-continentales de l'Amérique du nord et de l'Europe. Plus généralement, les chironomes sont présents dans tous les types de milieux aquatiques et de manière abondante dans les cours d'eau et les lacs eutrophes et mésotrophes (Environnement Canada, 1997). Les lacs et les étangs eutrophes contiennent au minimum 50 espèces différentes de Chironomides (Coffman, 1978). Les ruisseaux peuvent abriter 50000 individus/m².

Les chironomes sont une des composantes majeures du réseau trophique. Les larves de chironomes sont recherchées aussi bien par les oiseaux, les poissons et les batraciens que par les invertébrés aquatiques. Les adultes (imago) sont la proie d'insectes carnassiers et d'oiseaux. Ils peuvent être un vecteur important dans les transferts de contaminants, et leur disparition peut affecter la composition et la structure du réseau trophique.

Le cycle de vie des chironomes se décompose en quatre stades de développement différents : l'œuf, le stade larvaire, le stade nymphal et le stade imago (figure 37).

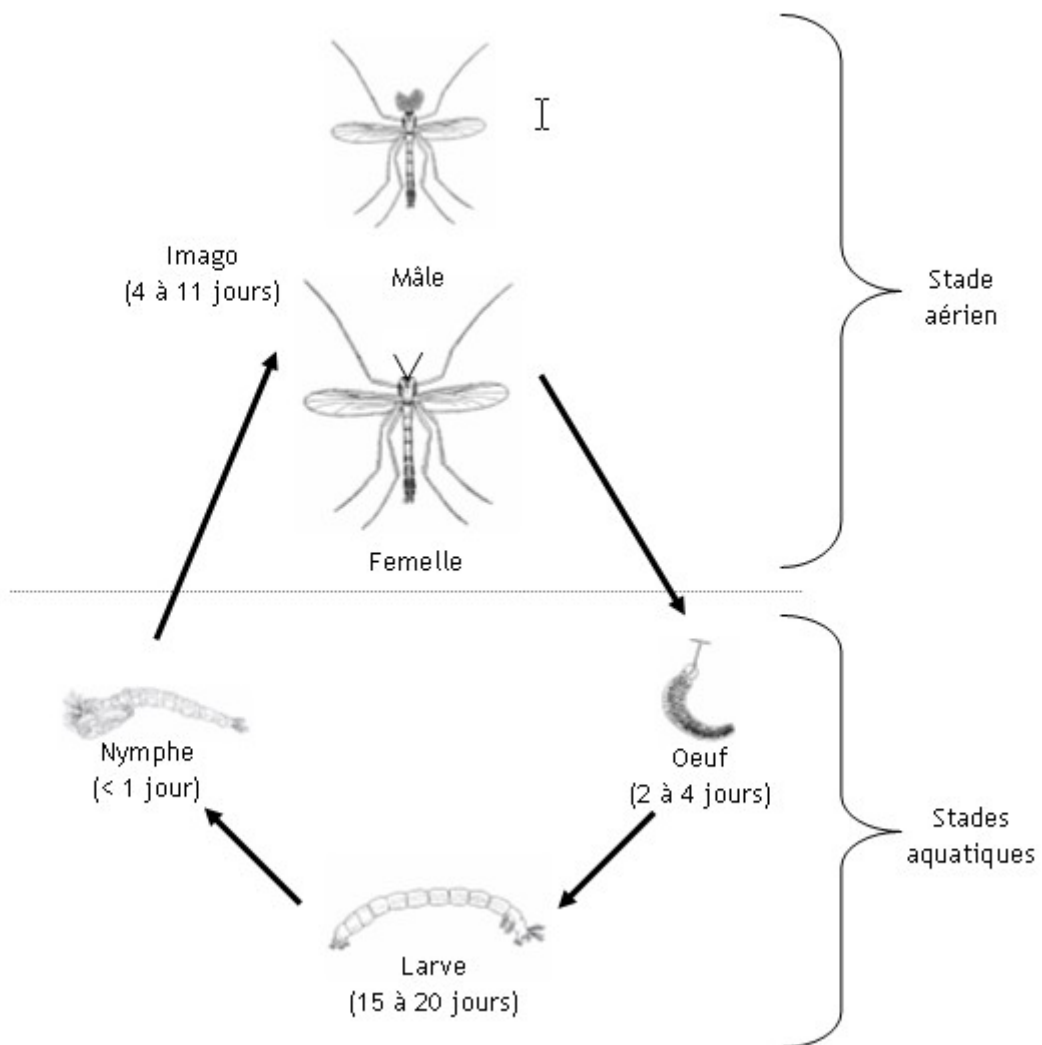


Figure 37. Cycle de vie de *Chironomus riparius* à $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les femelles adultes pondent des masses d'œufs entourées d'un manteau mucilagineux.

Le cycle larvaire des chironomes se décompose en 4 stades distincts :

- Le stade 1 où les larves sont blanches. Au cours de ce stade, les larves sont planctoniques ;
- Le stade 2 où les larves deviennent roses avec le début de la production d'hémoglobine. A partir de ce stade, les larves occupent la couche superficielle du sédiment, et construisent des tubes grâce aux particules sédimentaires et à leur salive ;
- Le stade 3 où les larves sont rouges vifs ;
- Le stade 4 où les larves voient leur tête devenir brun jaunâtre. A la fin de ce stade, la larve devient nymphe.

La nymphe quitte le sédiment pour nager à la surface de l'eau où elle émerge en imago, stade adulte et aérien.

En milieu naturel, la durée du cycle biologique de *C. riparius* est principalement contrôlée par la température. Dans les hautes latitudes, l'espèce présente un cycle de vie univoltin (1 génération par an). Dans les basses latitudes, elle présente un cycle de vie multivoltin (plusieurs générations par an). Durant les mois d'hiver, les températures basses ainsi que la courte durée d'ensoleillement déclenchent une diapause entre le troisième et le quatrième stade larvaire de *C. riparius* (Goddeeris et al., 2001). Les adultes émergent de nouveau au printemps.

C. riparius, comme de nombreux insectes aquatiques, présente un régime alimentaire omnivore. Chez les larves, on distingue quatre comportements alimentaires qui sont fonction de la taille de la larve, du type de nourriture, ou encore de la composition du sédiment (Armitage *et al.*, 1995):

- Le comportement «collecteur actif». Ce comportement consiste à se nourrir des fines particules de matière organique qui se sont déposées sur un substrat. Pour cela, la larve de chironome sort la partie antérieure de son corps hors du tube et explore la surface du sédiment autour du tube.

- Le comportement «collecteur filtreur ». La source alimentaire est ici la matière en suspension dans la colonne d'eau. Dans les écosystèmes aquatiques, la larve ondule pour faire circuler l'eau dans le tube.
- Le comportement « racleur ». A l'aide de ses pièces buccales, la larve de chironome est capable de brouter la couverture biologique (biofilm) et les particules détritiques fixées sur les surfaces rocheuses, les sédiments, le bois ainsi que d'autres substrats.
- Le comportement « déchiqueteur ». Grâce à ses mandibules, la larve de chironome est capable de déchiqueter de grosses particules organiques, spécialement des tissus végétaux vivants ou morts et des organismes associés.
- Le comportement « prédateur ».

Le chironome est un organisme pertinent pour l'étude des contaminants associés aux sédiments. Les raisons motivant l'utilisation de cet invertébré sont multiples, mais les principales sont : (i) sa relative facilité d'élevage en laboratoire (Environnement Canada, 1997), (ii) sa large utilisation dans les tests d'écotoxicité des sédiments (EPA, 2000), (iii) son étroit contact avec le sédiment au stade larvaire, (iv) son cycle de vie – d'une durée totale de 20 à 30 jours à 21°C – permet l'étude de *scénarii* d'exposition chronique d'une ou plusieurs générations, sur une durée relativement courte, (v) son ubiquité (Environnement Canada, 1997), (vi) son rôle-clef dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et donc sa pertinence écologique.

Annexe 2

Données physico-chimiques de l'expérience 1

1.1.Uranium

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$)	$[U]_{\text{sédiment}} \text{ mesurées}$ ($\mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$)	$[U]_{\text{eau}} \text{ mesurée}$ (mg U L^{-1})	
		J0	J7
0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
32	$29,0 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,3$
64	$59,2 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,5$	$9,0 \pm 0,3$
128	$120,7 \pm 0,5$	$14,6 \pm 0,4$	$12,3 \pm 0,6$
512	$482,5 \pm 1,2$	$19,1 \pm 1,7$	$15,8 \pm 0,4$
1024	$926,3 \pm 0,8$	$27,5 \pm 1,9$	$22,2 \pm 0,6$

n.d.: non détectable

1.2.Suivie physico-chimique

Au cours des sept jours d'exposition, la température a été maintenue à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, l'oxygène dissous dans la colonne d'eau à une concentration supérieure à 5 mg L^{-1} , la conductivité comprise entre 397 et $467 \mu\text{S cm}^{-1}$, et un pH compris entre 7,43 et 8,20.

Annexe 3

Analyses préliminaires de l'asymétrie fluctuante sur les adultes *Chironomus riparius* de l'expérience 2 (d'après Signoret, 2008)

1.1.Évaluation des erreurs de mesure

L'ANOVA à deux facteurs sur la taille de tous les caractères a révélé une interaction coté x individu significative (tableau 1). Par conséquent, l'erreur de mesure est significativement inférieure à l'asymétrie fluctuante.

Tableau 1. Évaluation de l'erreur et de la reproductibilité des mesures sur les adultes *Chironomus riparius*.

Organe	Caractère	ANOVA à 2 facteurs (interaction côté x individu)	Erreur de mesure (%)	de Reproductibilité de la mesure (%)
Ailes	1	$F_{56,228} = 5$ $p < 0,001$	19,13	86,16
	2	$F_{56,228} = 5$ $p < 0,001$	18,55	91,24
	3	$F_{56,228} = 10$ $p < 0,001$	10,29	98,35
	4	$F_{56,228} = 15$ $p < 0,001$	6,47	98,32
	5	$F_{56,228} = 6$ $p < 0,001$	16,77	94,36
Pattes	II	$F_{55,224} = 5$ $p < 0,001$	17,06	75,76
	III	$F_{55,224} = 8$ $p < 0,001$	12,68	95,46

L'erreur de mesure ainsi que la reproductibilité des mesures ont présenté des niveaux satisfaisant.

1.2.Asymétrie directionnelle et antisymétrie

Pour les sept caractères, les test-t de Student n'a pas montré de différence significative entre la moyenne (D-G) et zéro (tableau 2).

Les différences (D-G) des longueurs de chacun des caractères pour chacune des générations avaient une distribution normale (test de Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,05$).

Tableau 2. Moyenne (D-G) \pm SD en mm des sept caractères mesurés sur les adultes *Chironomus riparius*, et résultat du test-t pour chaque génération.

Génération	Caractère													
	1		2		3		4		5		II		III	
	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t	$\mu \pm SD$	Test-t
0	0,003 \pm 0,019	$t_{221}=-1,91$	-0,001 \pm 0,027	$t_{210}=-0,71$	0,001 0,025	$\pm t_{172}=0,64$	0,003 0,032	$\pm t_{170}=1,27$	0,000 0,029	$\pm t_{205}=1,14$	-0,001 0,023	$\pm t_{177}=-0,41$	0,001 0,028	$\pm t_{125}=0,37$
1	0,001 \pm 0,016	$t_{186}=0,79$	0,000 \pm 0,020	$t_{178}=0,14$	0,000 0,023	$\pm t_{142}=0,26$	0,002 0,027	$\pm t_{133}=0,77$	-0,001 0,026	$\pm t_{169}=-0,58$	0,001 0,017	$\pm t_{151}=0,99$	-0,000 0,023	$\pm t_{127}=-0,26$
2	0,002 \pm 0,017	$t_{176}=1,59$	-0,003 \pm 0,025	$t_{178}=-1,88$	-0,002 0,024	$\pm t_{170}=-1,09$	0,001 0,030	$\pm t_{169}=0,62$	-0,001 0,024	$\pm t_{174}=-0,52$	-0,002 0,017	$\pm t_{173}=-1,89$	0,001 0,023	$\pm t_{166}=0,81$
3	0,002 \pm 0,017	$t_{168}=1,22$	-0,001 \pm 0,018	$t_{166}=-0,49$	-0,002 0,015	$\pm t_{159}=-1,65$	0,001 0,021	$\pm t_{158}=-0,90$	0,001 0,023	$\pm t_{165}=0,48$	-0,000 0,015	$\pm t_{155}=-0,11$	0,001 0,017	$\pm t_{154}=0,71$
4	0,000 \pm 0,015	$t_{154}=0,06$	-0,000 \pm 0,016	$t_{155}=-0,19$	-0,002 0,014	$\pm t_{153}=-1,46$	-0,000 0,019	$\pm t_{150}=-0,27$	0,001 0,019	$\pm t_{153}=0,83$	0,002 0,014	$\pm t_{145}=1,42$	0,001 0,015	$\pm t_{147}=0,56$
5	0,002 \pm 0,014	$t_{156}=1,50$	-0,000 \pm 0,015	$t_{156}=-0,21$	-0,002 0,015	$\pm t_{149}=-1,93$	0,000 0,018	$\pm t_{146}=0,03$	0,001 0,018	$\pm t_{154}=0,95$	0,002 0,015	$\pm t_{138}=1,38$	0,000 0,019	$\pm t_{147}=0,28$
6	-0,001 \pm 0,013	$t_{156}=-0,96$	-0,002 \pm 0,017	$t_{157}=-1,25$	-0,002 0,016	$\pm t_{151}=-0,39$	-0,003 0,021	$\pm t_{150}=-1,73$	-0,003 0,020	$\pm t_{154}=-1,91$	-0,001 0,014	$\pm t_{136}=-0,53$	0,001 0,019	$\pm t_{141}=0,97$
7	0,001 \pm 0,013	$t_{152}=0,88$	0,001 \pm 0,015	$t_{154}=0,94$	0,001 0,015	$\pm t_{141}=0,62$	0,002 0,017	$\pm t_{137}=1,78$	0,003 0,018	$\pm t_{150}=1,96^*$	-0,001 0,014	$\pm t_{121}=-0,75$	-0,001 0,015	$\pm t_{124}=-0,47$

* $p < 0,05$

1.3. Taille dépendance de l'asymétrie fluctuante

Pour chaque caractère étudié, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre $|D-G|$ et le taille moyenne du caractère (tableau 3).

Tableau 3. Estimation de la taille dépendance pour chaque caractère de |D-G| en fonction de la taille moyenne des caractères mesurés sur les adultes *Chironomus riparius* par régression linéaire à chaque génération. Pour tous les caractères, à toutes les générations, aucune corrélation n'a été statistiquement significative ($p > 0,05$).

Génération <i>n</i>	Caractère																				
	I			2			3			4			5			II			III		
	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>r</i> ²	<i>n</i>
0	2,86	0,01	221	2,78	0,0	210	3,72	0,02	17	3,3	0,0	170	3,7	0,02	205	0,02	0,00	17	2,29	0,02	12
				1					2	4	2	8						7			5
1	3,44	0,02	186	3,75	0,0	178	3,78	0,03	14	3,6	0,0	133	3,4	0,02	169	0,08	0,00	15	2,73	0,02	12
				2					2	9	2	7						1			7
2	0,36	0,00	176	0,99	0,0	178	2,85	0,02	17	2,5	0,0	169	0,6	0,00	174	0,66	0,00	17	2,41	0,01	16
				1					0	5	1	6						3			6
3	0,02	0,00	168	0,37	0,0	166	1,61	0,01	15	1,1	0,0	158	1,6	0,01	165	3,38	0,02	15	1,93	0,01	15
				0					9	9	1	7						5			4
4	2,55	0,02	154	0,60	0,0	155	0,00	0,00	15	0,0	0,0	150	0,7	0,00	153	0,23	0,00	14	0,35	0,00	14
				0					3	0	0	0						5			7
5	0,25	0,00	156	0,03	0,0	156	0,09	0,00	14	1,0	0,0	146	0,3	0,00	154	1,63	0,12	13	2,25	0,02	14
				0					9	1	1	8						8			7
6	0,41	0,00	156	0,49	0,0	157	0,41	0,00	15	0,0	0,0	150	1,2	0,02	154	1,43	0,01	13	0,01	0,00	14
				0					1	8	0	4						6			1
7	0,63	0,00	152	1,12	0,0	154	0,03	0,00	14	0,5	0,0	137	0,2	0,00	150	0,14	0,00	12	1,37	0,01	12
				1					1	7	0	5						1			4

De plus aucune corrélation n'a été significative entre le $\log(\text{var}(D-G))$ et la moyenne des tailles moyennes, sauf à la première génération (G0) au niveau des ailes (tableau 4). Il existe donc pour cet organe un niveau d'asymétrie différent selon le caractère.

Tableau 4. Régression linéaire entre le logarithme de la variance de la différence entre les cotés ($\log(\text{var}(D-G))$) et la longueur moyenne des caractères mesurés sur les ailes et les pattes des adultes *Chironomus riparius*.

Génération	Ailes			Pattes		
	F	r ²	n	F	r ²	n
0	14,02***	0,08	163	0,03	0,00	120
1	2,16	0,02	125	0,98	0,01	120
2	0,21	0,00	165	1,54	0,01	159
3	0,04	0,00	156	2,75	0,02	144
4	0,05	0,00	149	0,26	0,00	140
5	0,01	0,00	144	0,06	0,00	135
6	2,63	0,02	135	0,69	0,00	148
7	0,16	0,00	134	1,11	0,01	114

*** $p < 0,001$

1.4.Choix de l'indice d'asymétrie fluctuante

Afin de prendre en compte la dépendance inter-caractères de l'AF, l'indice FA2 a été choisit (Palmer, 2001) pour le reste des analyses.

Annexe 4

Données physico-chimiques de l'expérience 2

1.1.Uranium

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	Génération	$[U]_{\text{sédiment}}$ mesurée ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	$[U]_{\text{eau}}$ moyen (mg U L^{-1})
32	F0	$29,3 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,3$
	F1	$29,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,5$
	F2	$28,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,4$
	F3	$29,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,5$
	F4	$28,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$
	F5	$28,6 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,6$
	F6	$28,7 \pm 0,1$	$1,6 \pm 1,1$
64	F7	$28,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,6$
	F0	$59,1 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,6$
	F1	$58,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 1,1$
	F2	$58,5 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,9$
	F3	$59,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,7$
	F4	$57,9 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,8$
	F5	$58,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 1,4$
128	F6	$58,3 \pm 0,1$	$3,2 \pm 1,9$
	F7	$57,8 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,8$
	F0	$120,3 \pm 0,4$	$5,9 \pm 1,3$
	F1	$119,5 \pm 0,3$	$7,0 \pm 2,0$
	F2	$118,8 \pm 0,1$	$4,9 \pm 2,8$
	F3	$120,8 \pm 0,2$	$5,2 \pm 1,1$
	F4	$115,7 \pm 0,4$	$5,6 \pm 2,3$
F5	$119,2 \pm 0,2$	$7,8 \pm 2,1$	
F6	$117,6 \pm 0,9$	$7,8 \pm 2,1$	
F7	$118,5 \pm 0,1$	$5,3 \pm 1,1$	

1.2.Suivie physico-chimique

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	Génération	Température ($^{\circ}\text{C}$)	pH	O2 dissous (mg L^{-1})	Conductivité ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
0	F0	21,9 \pm 0,2	7,85 \pm 0,04	6,9 \pm 0,2	424 \pm 18
	F1	21,4 \pm 0,7	7,91 \pm 0,03	7,4 \pm 0,2	442 \pm 15
	F2	21,5 \pm 0,8	7,68 \pm 0,02	6,5 \pm 0,1	469 \pm 16
	F3	21,5 \pm 0,2	7,63 \pm 0,04	6,8 \pm 0,2	424 \pm 7
	F4	21,9 \pm 0,2	7,55 \pm 0,02	6,2 \pm 0,3	455 \pm 15
	F5	21,2 \pm 0,1	7,55 \pm 0,06	6,2 \pm 0,3	444 \pm 14
	F6	21,8 \pm 0,3	7,68 \pm 0,03	6,0 \pm 0,3	478 \pm 10
	F7	21,6 \pm 1,2	7,84 \pm 0,12	6,6 \pm 0,5	421 \pm 6
32	F0	21,4 \pm 0,2	7,90 \pm 0,03	7,0 \pm 0,2	415 \pm 14
	F1	21,3 \pm 0,7	7,80 \pm 0,05	7,1 \pm 0,2	431 \pm 14
	F2	21,3 \pm 0,7	7,68 \pm 0,02	6,4 \pm 0,2	459 \pm 14
	F3	21,9 \pm 0,4	7,80 \pm 0,03	7,1 \pm 0,1	441 \pm 11
	F4	21,2 \pm 0,5	7,68 \pm 0,03	6,7 \pm 0,2	442 \pm 13
	F5	21,3 \pm 0,1	7,56 \pm 0,05	5,9 \pm 0,3	449 \pm 14
	F6	21,8 \pm 0,2	7,71 \pm 0,03	6,3 \pm 0,2	467 \pm 10
	F7	21,6 \pm 0,6	7,89 \pm 0,11	6,5 \pm 0,4	433 \pm 11
64	F0	21,3 \pm 0,1	7,92 \pm 0,02	7,3 \pm 0,1	418 \pm 16
	F1	21,3 \pm 0,6	7,79 \pm 0,03	7,4 \pm 0,2	435 \pm 16
	F2	21,3 \pm 0,6	7,80 \pm 0,02	6,8 \pm 0,2	461 \pm 16
	F3	21,0 \pm 0,3	7,65 \pm 0,02	6,8 \pm 0,2	429 \pm 9
	F4	20,9 \pm 1,0	7,73 \pm 0,03	6,9 \pm 0,2	435 \pm 12
	F5	21,4 \pm 0,2	7,68 \pm 0,04	6,5 \pm 0,3	450 \pm 15
	F6	21,6 \pm 0,2	7,72 \pm 0,03	6,3 \pm 0,2	462 \pm 9
	F7	21,5 \pm 0,3	7,94 \pm 0,08	6,8 \pm 0,3	435 \pm 11
128	F0	21,4 \pm 0,1	7,98 \pm 0,02	7,4 \pm 0,1	428 \pm 19
	F1	21,2 \pm 0,5	7,82 \pm 0,02	7,5 \pm 0,2	435 \pm 15
	F2	21,1 \pm 0,7	7,84 \pm 0,02	7,0 \pm 0,2	459 \pm 16
	F3	21,3 \pm 0,1	7,74 \pm 0,02	6,9 \pm 0,1	432 \pm 9
	F4	20,7 \pm 1,3	7,85 \pm 0,01	7,2 \pm 0,1	435 \pm 12
	F5	21,6 \pm 0,1	7,80 \pm 0,02	7,0 \pm 0,2	468 \pm 18
	F6	21,5 \pm 0,2	7,79 \pm 0,02	6,7 \pm 0,1	474 \pm 10
	F7	21,2 \pm 0,1	7,98 \pm 0,06	7,3 \pm 0,2	431 \pm 10

Annexe 5

Taille (moyenne \pm ES) des traits mesurés au niveau des ailes et des pattes antérieures des adultes à chaque génération en fonction du traitement de l'expérience 2

Mâle

Traitement	Génération	Trait 1 (mm)	Trait 2 (mm)	Trait 3 (mm)	Trait 4 (mm)	Trait 5 (mm)	Trait II (mm)	Trait III (mm)	Taille (PC1)
0	F0	1,53 (0,03)	1,16 (0,03)	1,88 (0,08)	3,41 (0,06)	2,69 (0,03)	1,44 (0,02)	1,98 (0,01)	0,95 (0,55)
	F1	1,59 (0,03)	1,13 (0,01)	1,80 (0,02)	3,41 (0,03)	2,72 (0,04)	1,43 (0,02)	1,98 (0,02)	0,88 (0,57)
	F2	1,53 (0,01)	1,08 (0,01)	1,74 (0,01)	3,26 (0,03)	2,61 (0,02)	1,38 (0,01)	1,92 (0,02)	-0,85 (0,31)
	F3	1,57 (0,03)	1,12 (0,02)	1,77 (0,03)	3,34 (0,05)	2,69 (0,05)	1,43 (0,02)	1,97 (0,03)	0,35 (0,70)
	F4	1,50 (0,02)	1,07 (0,01)	1,71 (0,01)	3,20 (0,03)	2,56 (0,03)	1,40 (0,02)	1,91 (0,03)	-1,26 (0,49)
	F5	1,55 (0,01)	1,10 (0,01)	1,74 (0,01)	3,30 (0,01)	2,65 (0,01)	1,42 (0,01)	1,95 (0,01)	-0,14 (0,18)
	F6	1,49 (0,02)	1,06 (0,01)	1,70 (0,01)	3,19 (0,03)	2,54 (0,03)	1,41 (0,02)	1,92 (0,04)	-1,29 (0,48)
	F7	1,47 (0,02)	1,05 (0,01)	1,70 (0,01)	3,16 (0,02)	2,51 (0,02)	1,38 (0,03)	1,90 (0,03)	-1,83 (0,48)
32	F0	1,52 (0,03)	1,09 (0,03)	1,72 (0,05)	3,39 (0,05)	2,61 (0,06)	1,39 (0,01)	1,93 (0,03)	-0,29 (0,51)
	F1	1,46 (0,01)	1,07 (0,01)	1,70 (0,00)	3,17 (0,02)	2,53 (0,02)	1,38 (0,03)	1,93 (0,03)	-1,62 (0,33)
	F2	1,55 (0,03)	1,08 (0,02)	1,73 (0,04)	3,28 (0,06)	2,63 (0,04)	1,39 (0,01)	1,92 (0,03)	-0,68 (0,57)
	F3	1,53 (0,01)	1,09 (0,01)	1,75 (0,02)	3,28 (0,03)	2,62 (0,01)	1,40 (0,02)	1,91 (0,03)	-0,62 (0,40)
	F4	1,51 (0,01)	1,07 (0,01)	1,75 (0,03)	3,25 (0,03)	2,58 (0,02)	1,39 (0,01)	1,91 (0,02)	-1,05 (0,36)
	F5	1,55 (0,01)	1,11 (0,01)	1,79 (0,02)	3,34 (0,03)	2,65 (0,02)	1,46 (0,01)	1,98 (0,03)	0,43 (0,37)
	F6	1,52 (0,02)	1,12 (0,01)	1,81 (0,03)	3,33 (0,04)	2,64 (0,03)	1,42 (0,01)	1,94 (0,03)	-0,02 (0,46)
	F7	1,52 (0,02)	1,09 (0,01)	1,77 (0,02)	3,28 (0,01)	2,60 (0,01)	1,42 (0,01)	1,98 (0,02)	-0,31 (0,17)

Traitement	Génération	Trait 1	Trait 2	Trait 3	Trait 4	Trait 5	Trait II	Trait III	Taille
------------	------------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	-----------	--------

$(\mu\text{g U g}^{-1}\text{ps})$	ation	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(PCI)
64	F0	1,49 (0,03)	1,09 (0,03)	1,67 (0,07)	3,23 (0,05)	2,58 (0,06)	1,38 (0,01)	1,87 (0,07)	-1,41 (0,81)
	F1	1,39 (0,01)	0,95 (0,00)	1,41 (0,01)	2,75 (0,04)	2,34 (0,01)	1,38 (0,00)	1,89 (0,07)	-4,43 (0,06)
	F2	1,46 (0,02)	1,02 (0,02)	1,59 (0,05)	3,05 (0,07)	2,47 (0,04)	1,37 (0,01)	1,85 (0,02)	-2,82 (0,58)
	F3	1,53 (0,02)	1,06 (0,04)	1,68 (0,07)	3,21 (0,09)	2,59 (0,06)	1,41 (0,01)	1,89 (0,02)	-1,14 (0,82)
	F4	1,42 (0,01)	1,06 (0,01)	1,70 (0,01)	3,12 (0,01)	2,48 (0,01)	1,31 (0,03)	1,81 (0,02)	-2,89 (0,23)
	F5	1,53 (0,02)	1,13 (0,01)	1,80 (0,01)	3,33 (0,02)	2,66 (0,02)	1,44 (0,00)	1,95 (0,01)	0,25 (0,26)
	F6	1,51 (0,02)	1,07 (0,01)	1,74 (0,01)	3,25 (0,02)	2,57 (0,02)	1,43 (0,02)	1,96 (0,01)	-0,61 (0,34)
F7	1,53 (0,01)	1,07 (0,01)	1,71 (0,02)	3,24 (0,02)	2,59 (0,02)	1,43 (0,01)	1,94 (0,01)	-0,66 (0,31)	
128	F0	1,42 (0,03)	0,96 (0,03)	1,44 (0,06)	2,97 (0,01)	2,37 (0,07)	1,35 (0,01)	1,82 (0,03)	-4,18 (0,62)
	F1	1,36 (0,03)	0,87 (0,03)	1,25 (0,07)	2,80 (0,13)	2,23 (0,06)	1,37 (0,01)	1,87 (0,03)	-5,59 (0,89)
	F2	1,49 (0,02)	1,02 (0,02)	1,58 (0,07)	3,09 (0,08)	2,50 (0,04)	1,37 (0,01)	1,83 (0,03)	-2,68 (0,63)
	F3	1,50 (0,02)	1,06 (0,02)	1,70 (0,02)	3,20 (0,02)	2,56 (0,02)	1,38 (0,02)	1,91 (0,03)	-1,47 (0,26)
	F4	1,49 (0,01)	1,06 (0,02)	1,69 (0,04)	3,18 (0,05)	2,55 (0,03)	1,35 (0,02)	1,89 (0,02)	-1,82 (0,50)
	F5	1,53 (0,01)	1,08 (0,01)	1,74 (0,01)	3,27 (0,02)	2,59 (0,02)	1,42 (0,01)	1,94 (0,02)	-0,57 (0,29)
	F6	1,49 (0,03)	1,06 (0,02)	1,72 (0,03)	3,21 (0,05)	2,54 (0,05)	1,41 (0,02)	1,94 (0,02)	-1,14 (0,59)
F7	1,54 (0,01)	1,03 (0,01)	1,65 (0,02)	3,20 (0,03)	2,56 (0,02)	1,44 (0,02)	1,92 (0,01)	-1,08 (0,30)	

Femelles

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	Géné- ratio n	Trait 1 (mm)	Trait 2 (mm)	Trait 3 (mm)	Trait 4 (mm)	Trait 5 (mm)	Trait II (mm)	Trait III (mm)	Taille (PCI)
0	F0	1,48 (0,01)	1,27 (0,00)	2,11 (0,02)	3,58 (0,02)	2,75 (0,01)	1,46 (0,02)	2,04 (0,05)	2,65 (0,37)
	F1	1,50 (0,01)	1,27 (0,00)	2,10 (0,01)	3,65 (0,03)	2,77 (0,00)	1,48 (0,01)	2,15 (0,02)	3,48 (0,18)
	F2	1,46 (0,01)	1,24 (0,01)	2,04 (0,02)	3,48 (0,02)	2,70 (0,01)	1,42 (0,01)	2,08 (0,01)	1,87 (0,18)
	F3	1,48 (0,03)	1,28 (0,02)	2,10 (0,03)	3,59 (0,06)	2,76 (0,01)	1,46 (0,02)	2,13 (0,03)	3,08 (0,68)
	F4	1,41 (0,03)	1,22 (0,01)	2,03 (0,02)	3,44 (0,05)	2,63 (0,04)	1,43 (0,02)	2,07 (0,03)	1,37 (0,66)
	F5	1,44 (0,01)	1,23 (0,01)	2,05 (0,02)	3,48 (0,03)	2,67 (0,02)	1,45 (0,02)	2,08 (0,02)	1,92 (0,33)
	F6	1,40 (0,03)	1,20 (0,02)	2,01 (0,02)	3,41 (0,05)	2,60 (0,04)	1,44 (0,02)	2,07 (0,03)	1,18 (0,64)
	F7	1,42 (0,01)	1,22 (0,02)	2,01 (0,03)	3,43 (0,05)	2,63 (0,03)	1,43 (0,02)	2,10 (0,03)	1,43 (0,63)
32	F0	1,49 (0,02)	1,25 (0,01)	2,05 (0,03)	3,58 (0,02)	2,74 (0,02)	1,45 (0,01)	2,15 (0,02)	2,84 (0,19)
	F1	1,41 (0,02)	1,20 (0,00)	1,99 (0,00)	3,40 (0,01)	2,61 (0,01)	1,40 (0,02)	2,06 (0,02)	0,77 (0,27)
	F2	1,41 (0,02)	1,19 (0,01)	1,96 (0,01)	3,39 (0,03)	2,60 (0,03)	1,41 (0,02)	2,04 (0,03)	0,66 (0,48)
	F3	1,47 (0,03)	1,26 (0,03)	2,09 (0,05)	3,57 (0,08)	2,72 (0,06)	1,45 (0,04)	2,11 (0,04)	2,63 (1,02)
	F4	1,45 (0,01)	1,24 (0,01)	2,07 (0,03)	3,51 (0,03)	2,68 (0,03)	1,42 (0,01)	2,11 (0,02)	1,98 (0,43)
	F5	1,52 (0,00)	1,28 (0,01)	2,13 (0,01)	3,64 (0,02)	2,79 (0,01)	1,51 (0,02)	2,17 (0,01)	3,89 (0,22)
	F6	1,44 (0,02)	1,27 (0,02)	2,09 (0,03)	3,53 (0,05)	2,70 (0,03)	1,44 (0,02)	2,11 (0,02)	2,38 (0,55)
	F7	1,43 (0,02)	1,22 (0,02)	2,02 (0,02)	3,47 (0,03)	2,64 (0,03)	1,42 (0,03)	2,08 (0,03)	1,43 (0,57)

Traitement ($\mu\text{g U g}^{-1}$ ps)	Géné- ratio n	Trait 1 (mm)	Trait 2 (mm)	Trait 3 (mm)	Trait 4 (mm)	Trait 5 (mm)	Trait II (mm)	Trait III (mm)	Taille (PCI)
64	F0	1,44 (0,03)	1,19 (0,03)	1,90 (0,07)	3,38 (0,05)	2,63 (0,06)	1,43 (0,02)	2,04 (0,04)	0,75 (0,65)
	F1	1,36 (0,00)	1,08 (0,00)	1,69 (0,02)	3,16 (0,11)	2,44 (0,00)	1,42 (0,00)	2,01 (0,02)	-1,53 (0,37)
	F2	1,37 (0,02)	1,12 (0,02)	1,78 (0,08)	3,20 (0,12)	2,49 (0,05)	1,39 (0,02)	1,95 (0,06)	-1,38 (0,91)
	F3	1,49 (0,01)	1,23 (0,02)	2,06 (0,02)	3,54 (0,03)	2,72 (0,02)	1,45 (0,01)	2,10 (0,01)	2,40 (0,30)
	F4	1,39 (0,01)	1,20 (0,00)	2,01 (0,00)	3,40 (0,01)	2,58 (0,01)	1,38 (0,01)	2,02 (0,01)	0,46 (0,20)
	F5	1,45 (0,01)	1,26 (0,01)	2,11 (0,02)	3,56 (0,02)	2,71 (0,02)	1,48 (0,02)	2,12 (0,02)	2,85 (0,40)
	F6	1,46 (0,02)	1,25 (0,01)	2,09 (0,02)	3,54 (0,03)	2,70 (0,03)	1,47 (0,02)	2,13 (0,03)	2,68 (0,51)
	F7	1,44 (0,03)	1,25 (0,01)	2,06 (0,01)	3,49 (0,04)	2,68 (0,03)	1,47 (0,02)	2,13 (0,02)	2,37 (0,48)
128	F0	1,35 (0,03)	1,06 (0,05)	1,61 (0,09)	3,02 (0,12)	2,41 (0,08)	1,40 (0,01)	1,90 (0,05)	-2,75 (1,07)
	F1	1,33 (0,01)	1,01 (0,03)	1,50 (0,06)	3,07 (0,10)	2,34 (0,04)	1,43 (0,02)	2,01 (0,05)	-2,72 (0,69)
	F2	1,37 (0,02)	1,09 (0,02)	1,72 (0,05)	3,10 (0,08)	2,45 (0,04)	1,40 (0,02)	1,95 (0,03)	-1,88 (0,38)
	F3	1,39 (0,01)	1,21 (0,03)	1,97 (0,03)	3,36 (0,03)	2,59 (0,03)	1,40 (0,02)	2,06 (0,02)	0,60 (0,49)
	F4	1,38 (0,03)	1,15 (0,02)	1,88 (0,06)	3,26 (0,08)	2,53 (0,04)	1,38 (0,02)	1,97 (0,06)	-0,68 (0,85)
	F5	1,43 (0,01)	1,23 (0,01)	2,00 (0,03)	3,42 (0,03)	2,65 (0,01)	1,46 (0,02)	2,07 (0,02)	1,60 (0,25)
	F6	1,47 (0,02)	1,17 (0,04)	1,95 (0,08)	3,42 (0,08)	2,63 (0,04)	1,43 (0,03)	2,04 (0,06)	0,99 (1,03)
	F7	1,46 (0,03)	1,23 (0,01)	2,02 (0,02)	3,48 (0,05)	2,68 (0,04)	1,48 (0,04)	2,10 (0,04)	2,25 (0,78)