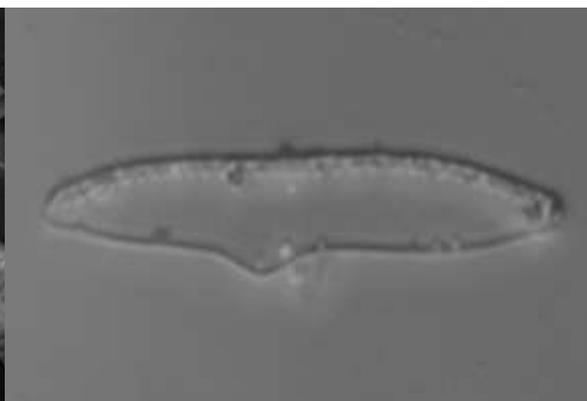
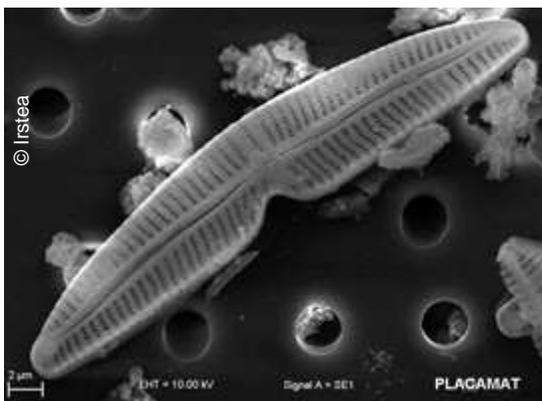


Application de la morphométrie géométrique à l'évaluation de la sévérité des déformations chez les diatomées



Aout 2017
CERISIER, Angélique
VEDRENNE, Jacky
BOUTRY, Sébastien
JAMONEAU, Aurélien
LAVOIE, Isabelle
TISON-ROSEBERY, Juliette
MORIN, Soizic

Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du LabEx COTE (ANR-10-LABX-45), par le financement de la bourse de stage d'A.C.

Merci à Hélène Arambourou (Irstea, centre de Lyon-Villeurbanne) pour ses conseils et commentaires sur l'applicabilité de la morphométrie géométrique aux déformations des diatomées, au démarrage du projet.

Sommaire

Remerciements	
Introduction.....	1
I. Matériels et Méthodes	2
1. Méthodes de morphométrie géométrique et évaluation de la sévérité de déformations	2
2. Spécimens étudiés.....	4
II. Résultats et Discussion pour la diatomée <i>Gomphonema gracile</i>	6
1. Aspects méthodologiques	6
2. Etude sur l'ensemble des individus	9
3. Etude de l'indice de déformation.....	11
III. Résultats et Discussion pour la diatomée <i>Nitzschia palea</i>	16
IV. Résultats et Discussion pour la diatomée <i>Achnantheidium minutissimum</i>	19
V. Discussion générale sur les apports de la morphométrie géométrique à l'évaluation de la sévérité des déformations.....	27
VI. Bibliographie	29
Annexes	31
Résumé.....	59

Introduction

Les **diatomées** sont des microalgues unicellulaires photosynthétiques vivant dans les eaux douces mais aussi dans les eaux salées. Leur taille varie entre 5 et 500 μm et elles peuvent se présenter en cellules isolées ou regroupées en colonies. Elles possèdent une paroi cellulaire composée de silice appelée frustule. De par leur présence ubiquiste, ces organismes sont beaucoup étudiés pour permettre une évaluation de la qualité du milieu (Coste et al., 2009). En effet, les diatomées sont des espèces sensibles au changement climatique mais aussi aux différentes pressions anthropiques comme les pollutions métalliques (Morin et al., 2012). Suite à cette exposition, les diatomées présentent un **pourcentage de déformations** plus ou moins important. Ces déformations se traduisent dans plus de 50 % des cas par une asymétrie de l'organisme (celui-ci étant parfaitement symétrique lorsqu'il ne subit aucun stress) (Figure 1) (Lavoie et al., 2017). Dans un premier temps, la capacité des approches de **morphométrie géométrique** à mettre en évidence une déformation du frustule est évaluée. Cette méthode a pour but d'acquérir, de traiter et d'analyser des points-repères, en préservant leurs relations géométriques. Elle permet la comparaison de différentes configurations spatiales. Cette méthode est déjà utilisée sur de nombreux organismes comme les chironomes (Arambourou et al., 2014), les diptères (Prudhomme et al., 2016), les drosophiles (Debat et al., 2003) mais aussi sur les poissons (Avigliano et al., 2017), sur les microalgues (Neustupa et al., 2013). Elle est principalement utilisée pour distinguer différentes espèces entre elles (Frankova et al., 2009). De plus, les premiers travaux de recherche sur l'application de cette méthode sur les diatomées ne sont que très récents (Pappas et al., 2014 ; Woodard et al., 2016) et limités à la différenciation de différentes espèces (Woodard et al., 2016) ou taxons (Potapova et al., 2007).

Si ce pourcentage de déformations permet de mettre en évidence l'existence d'une pression toxique dans un cours d'eau, il ne permet en revanche pas d'en quantifier l'importance. Certains chercheurs suggèrent, aujourd'hui, d'améliorer cet indicateur en y incluant une composante visant à évaluer la sévérité de la déformation, qui pourrait renseigner sur l'intensité du niveau de contamination (Lavoie et al., 2017). Cependant, aucune méthode permettant d'évaluer la sévérité de la déformation des diatomées n'a été à ce jour développée.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'applicabilité des méthodes de mesures de morphologie géométrique (Bookstein et al., 1991), pour la quantification de la divergence à la symétrie normale des individus.

I. Matériels et Méthodes

1. Méthodes de morphométrie géométrique et évaluation de la sévérité de déformations

Afin d'étudier les déformations sur les diatomées en s'affranchissant des différences de taille, de position et d'orientation entre les individus sur la photographie, la superposition de Procruste est utilisée (Graham et al., 2010). Cette méthode comporte plusieurs étapes :

1. Choix des photographies selon leur qualité. Si la qualité n'est pas correcte, le positionnement des points-repères sur le contour de la forme sera complexe. Le terme « forme » dans ce travail comprend la notion de taille et de conformation. Sa conformation est donc la forme de l'objet qui est indépendante de sa taille.

2. Positionnement précis des points-repères sur le contour de la forme, avec le logiciel TpsDig. Ceux-ci sont nécessaires à l'étude de la conformation géométrique de l'organisme. Il s'agit de points précis et homologues caractérisés par des coordonnées (x ; y). Le nombre de points-repères doit être au maximum deux fois inférieur au nombre d'individus par échantillon (Arambourou H., 2013). Il existe plusieurs types de points-repères :

- type I : point situé à l'intersection de deux lignes
- type II : point situé au maximum d'une courbure
- type III : point situé à une distance d'un élément anatomique repérable.

3. Mise à l'échelle des configurations à partir de l'ensemble du jeu de coordonnées de points-repères obtenu pour chaque individu. Une configuration est l'ensemble des points-repères décrivant l'objet.

Cette étape est réalisée en utilisant la « taille centroïde » qui correspond à la racine carrée de la somme des distances des points-repères jusqu'au centroïde (centre de gravité).

4. Superposition des individus. Cette étape permet de superposer les configurations d'une diatomée non déformée et d'une diatomée déformée, ou de superposer les configurations des diatomées déformées entre elles afin de mettre en évidence le gradient de déformation.

5. Rotation des configurations autour de leurs centroïdes. Cette étape permet d'avoir une superposition optimale des points-repères homologues et donc de minimiser la somme des écarts au carré entre les repères jumelés (Bookstein et al., 2016).

A la suite de ces étapes, de nouvelles coordonnées sont obtenues. Ces dernières sont caractéristiques de la forme étudiée et serviront pour les tests statistiques menés avec le logiciel tpsRelw32 et le logiciel R avec un seuil α de 5 %. Le logiciel tpsRelw32 permet d'obtenir une analyse TPS (Thin-Plate Spline). Cet outil statistique est très utilisé et puissant dans le monde de la morphométrie. En effet, il permet une visualisation des différences de formes, en les représentant sur des grilles de déformations spécifiques à chaque axe.

L'analyse TPS permet donc de quantifier les variations de formes d'un individu à un autre grâce aux déformations relatives des spécimens (Relative Warps ou RW). Les RW est une

analyse des composantes principales de la variation d'un échantillon dans la géométrie d'une sphère. Elle représente les changements de direction de formes par rapport à une moyenne. RW est calculée à partir de PW (Partial Warps) qui correspond à une structure auxiliaire pour l'interprétation des variations de formes et qui décrit l'information de la déformation le long de chaque coordonnée des axes (en respectant les coordonnées de x et de y). Pour obtenir RW, nous avons besoin de PW où W correspond au poids de la matrice et égal à VP (V= matrice qui donne la différence entre la référence et l'échantillon aligné et P est une formule contenant E qui sont les principales warps). Il s'agit d'une matrice contenant le nombre de points-repères) permettant de normaliser la matrice des vecteurs propres. RW est donc W/\sqrt{n} où n est le nombre de dimensions. RW permet d'avoir un vecteur qui va montrer la différence entre la position des points-repères sur l'échantillon de référence et les spécimens hypothétiques après superposition dans un nombre de dimension le plus petit possible.

La méthode de Procruste est basée sur les matrices de distances. En effet, une mesure entre chaque point-repère est effectuée c'est ce que l'on appelle la distance de Procruste qui est la racine carré de la somme des différences au carré entre les positions des points-repères dans les 2 configurations superposés optimales à la taille du centroïde. Cette matrice basée sur les distances de Procruste permet de créer une matrice de Kendall's shape space (espace courbe, non euclidien, dans lequel un individu correspond à un point). C'est grâce à la géométrie de cet espace qu'une estimation des formes moyennes et une description moyenne de formes de l'échantillon peut être réalisée. Cependant, il est difficile de réaliser des tests statistiques sur un espace courbe. Une projection des configurations dans l'espace euclidien tangent au shape space est réalisée.

Le protocole détaillé des étapes de morphométrie géométrique est disponible en Annexe 1.

Il est important de savoir qu'il existe différents types de distance de Procruste :

- Partielle
- Complète qui a été utilisée dans cette étude. Elle donne une superposition de Procruste totale avec une standardisation de la taille des individus qui permet de calculer RW.

Puis, une ANOVA a été réalisée pour mettre en évidence le gradient de déformations (conditions d'application de ce test ayant été vérifiées) suivit d'un test post-hoc (le test de Tukey). Ce test permet de comparer deux à deux les moyennes des coordonnées de RW1 et RW2 en fonction des indices de déformations.

2. Spécimens étudiés

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé 3 espèces de diatomées : *Gomphonema gracile*, *Nitzschia palea* et pour finir *Achnantheidium minutissimum*.

Gomphonema gracile a été isolée de l'amont de la Leyre (tributaire majeur du Bassin d'Arcachon) par micromanipulation sous microscope inversé, et maintenue en culture dans du milieu Dauta à Irstea (Coquille et al., 2015). C'est une **diatomée benthique** acidophile d'une longueur comprise entre 20 et 100 μm et d'une largeur comprise entre 4 et 11 μm . Elle fait partie de la catégorie des diatomées **pennées** car elle présente une symétrie bilatérale. Comme la plupart des espèces du genre *Gomphonema*, elle présente une légère hétéropolarité (Figure 1). Il s'agit d'une espèce très sensible aux différents types de pollutions (Coquille et al., 2015).

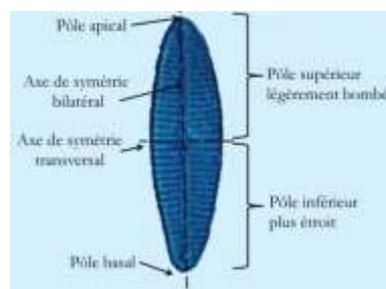


Figure 1 : axe de symétrie bilatérale et hétéropolarité chez *Gomphonema gracile*

Les cultures étudiées sont deux lignées filles de *G. gracile* de même génération, ayant divergé morphologiquement (Figure 2). La culture fille GT (*G. gracile* tératologique) présente une déformation typique en forme de boomerang, avec une invagination marquée du côté opposé au stigma. La culture fille GNT (*G. gracile* non tératologique) est morphologiquement proche de la culture d'origine (GGRA), mais de dimensions moyennes plus faibles, ce qui résulte des cycles de division asexuée de la culture. En effet, les diatomées peuvent se reproduire de deux façons différentes : asexuée et sexuée.

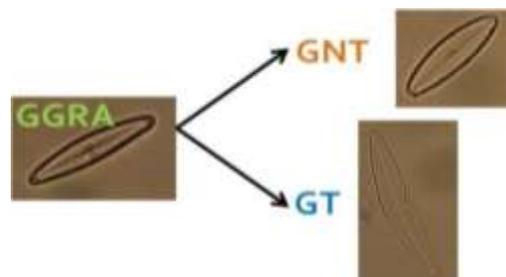


Figure 2 : schéma représentant les lignées-filles non tératologiques (GNT) et tératologiques (GT) à partir de la culture initiale (GGRA) (© Morin, 2015)

Nitzschia palea est une espèce de diatomée retrouvée partout en France principalement dans des zones chargées en matière organique. Par conséquent, lorsque cette dernière est présente, elle va faire baisser la note de l'IBD. Dans cette étude, cette dernière a été exposée au cadmium et présente des individus tératologiques.

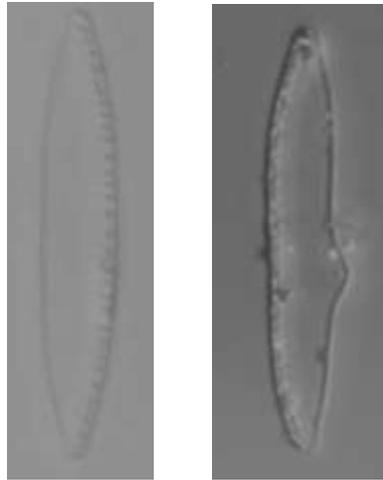


Figure 3 : photographie de *Nitzschia palea* non déformée (à gauche) et déformée (à droite)

Achnanthis minutissimum est une espèce pionnière, retrouvée partout en France, d'une longueur comprise entre 6 et 21 μm ce qui rend son identification difficile et amène à de nombreuses erreurs. Son caractère pionnier en fait une espèce fréquemment rencontrée dans des environnements soumis à un stress toxique (Lavoie et al., 2012 ; Morin et al., 2012 ; Lainé et al., 2014). Comme cette espèce est généralement rencontrée dans des environnements oligotrophes, des abondances élevées contribueront à augmenter la note d'IBD. Dans cette étude, les diatomées proviennent du milieu naturel avec de fortes proportions de cette espèce et des pourcentages d'individus tératologiques exceptionnellement hauts pour une étude « in situ » en aval d'une usine. En effet, des prélèvements ont été réalisés en amont, en aval proche et en aval lointain de l'usine sur 4 années. Cette démarche permet l'obtention d'une iconographie quantitativement suffisante pour l'analyse morphométrique. Voici les différentes lames observées :

- 2014 :
 - o N° 18507 (Aval lointain = AVL, lames de verre T30 jours)
 - o N° 18508 (Aval proche = AVP, lames de verre T30 jours)
- 2013 :
 - o N° 18166 (AVL, galets)
 - o N° 18167 (AVP, galets)
- 2012 :
 - o N°17719 (AVL, galets)
 - o N°17720 (AVP, galets)
- 2009 :
 - o N° 16324 (AVP, galets)



Figure 4 : photographie d'*Achnantheidium minutissimum* non déformée (à gauche) et déformée (à droite)

II. Résultats et Discussion pour la diatomée *Gomphonema gracile*

1. Aspects méthodologiques

Afin de trouver la meilleure méthode permettant d'évaluer la sévérité des déformations chez les diatomées, différents tests ont été réalisés notamment sur le **positionnement des points-repères**. Tout d'abord, un point-repère est positionné sur chaque extrémité de la diatomée (point-repère de type I) car il s'agit de points faciles à placer sur tous les individus (points 1 et 2 sur la Figure 5a et 5b). Afin de positionner les points-repères aux mêmes endroits de part et d'autre de la diatomée, les relations de proportionnalité seront utilisées. En effet, deux points symétriques selon l'axe de symétrie bilatéral sont placés à la moitié de la diatomée (points 3 et 4 sur la Figure 5a). Puis, deux autres points toujours symétriques selon l'axe de symétrie bilatéral sont placés au quart de la diatomée en partant du côté apical (points 5 et 6 la Figure 5a). Il en est de même pour le côté basal (points 7 et 8 sur la Figure 5a). Pour finir, 2 μm sont mesurés à partir du point central vers le côté apical et le côté basal de la diatomée (points 9, 10, 11 et 12 sur la Figure 5a).

Au final, le contour de l'individu déformé et non déformé est caractérisé par **12 points-repères** (Figure 5a). Au vu du nombre d'individus disponibles (30 individus par date), nous pouvions positionner jusqu'à 15 points-repères. Initialement, le nombre élevé de 12 points-repères a été choisi dans le but de caractériser au mieux toutes les variations de formes du contour de l'individu.

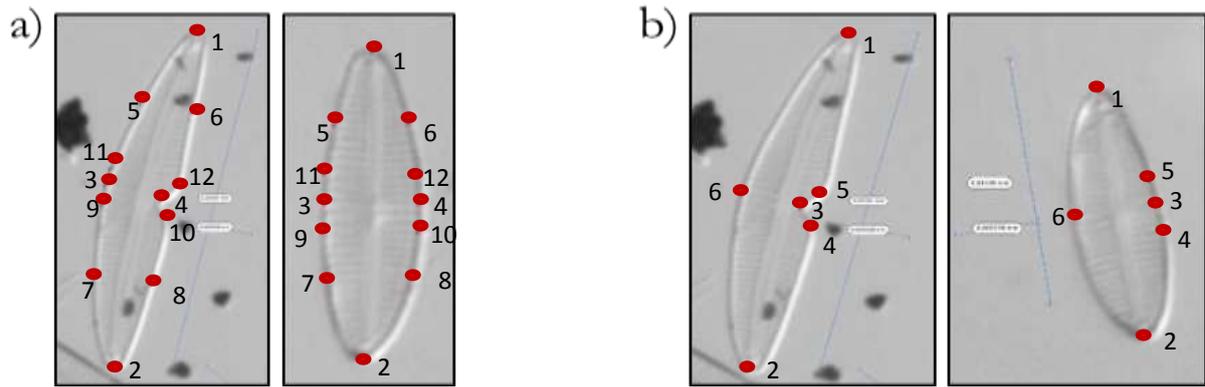


Figure 5 : photographie d'une diatomée déformée (à gauche) et d'une diatomée non déformée (à droite) caractérisée par (a) 12 points-repères (figurés par les points rouges) et (b) 6 points-repères

A la suite des analyses, le placement des points-repères permet bien de distinguer les diatomées déformées des non déformées (Figure 6a).

Malgré la caractérisation précise du contour de l'individu, cette méthode demande beaucoup de temps (environ 3h pour 37 individus) et s'avère trop complexe au vu des bénéfices attendus. Il s'agit là d'une des limites de la morphométrie géométrique. Par conséquent, nous avons fait l'hypothèse qu'il était possible de réduire le nombre de points-repères sans perdre en qualité de discrimination entre morphotypes, et avons choisis de reproduire l'analyse avec **6 points-repères**. Les points aux extrémités de la diatomée et le point placé à la moitié de cette dernière du côté non déformé sont conservés (points 1, 2 et 6 sur la Figure 5b). En effet, ces points restent faciles à placer. Un point est placé au sommet de la courbe de déformation (point-repère de type II, point 3 sur la Figure 5b) et deux autres points sont positionnés aux deux zones d'inflexions (point-repère de type II, points 4 et 5 sur la Figure 5b). Ces points permettent de garder la caractérisation de la déformation. En ce qui concerne la diatomée non déformée, les points-repères sont placés de la même façon que ceux de la méthode des 12 points-repères sauf les points-repères placés au quart de la diatomée qui eux sont supprimés (Figure 5b).

Cette nouvelle méthode est plus rapide (environ 45 minutes pour 37 individus) car elle nécessite moins de mesures et après analyses, cette dernière donne les mêmes résultats que la méthode utilisant 12 points-repères (Figure 6a et b).

Sur ces graphiques, chaque diatomée est caractérisée par un point numéroté. Chaque axe est défini par RW (RW1 pour l'axe 1 et RW2 pour l'axe 2), expliqué à des pourcentages différents. En tout point du graphique, l'analyse TPS donne des grilles de déformations représentant une diatomée « virtuelle ». Il est important d'ajouter que nous avons choisi de mettre en évidence les grilles de déformations des extrémités des axes. En revanche, les photos placées sur ce graphique correspondent à un point numéroté qui sont des individus réels.

L'axe 1 explique à 76,71 % (Figure 6a) ou à 86,87 % (Figure 6b) la déformation de la diatomée (le creux). Plus cette dernière est à gauche du graphique, plus elle est déformée. En revanche, l'axe 2 présente un pourcentage d'explication plus faible pour les deux graphiques (7,54 % pour la Figure 6a et 5,14 % pour la Figure 6b). Ce dernier explique une légère asymétrie selon l'axe transversal de la diatomée. Plus la diatomée se situe vers le bas du graphique, plus elle est hétéropolaire (Figure 6a). Pour la Figure 6b, l'axe 2 explique le ratio longueur/largeur. En effet, plus la diatomée se situe vers le bas du graphique, plus elle est allongée.

Grâce à l'interprétation des axes, une **distinction entre GT et GNT** est observée pour les deux méthodes.

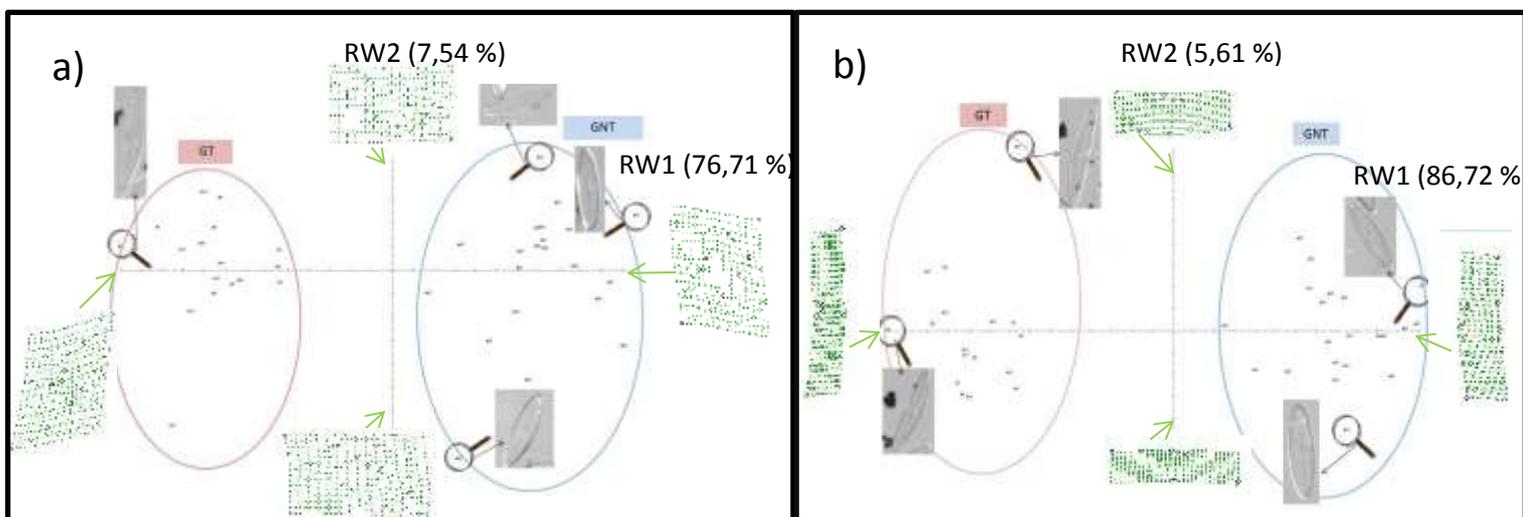


Figure 6 : TPS représentant la variation de forme entre GNT et GT sur 37 individus avec l'utilisation de (a) 12 points-repères puis (b) 6 points-repères*¹

Cependant, la méthode du positionnement des points-repères est discutable. En effet, la mesure permettant de connaître l'emplacement du point mais aussi son positionnement se font manuellement, et à l'œil nu. La qualité de la photographie joue un rôle important. En effet, selon le contraste entre l'objet et le fond de la photographie, le positionnement des points-repères peut varier. Par conséquent, l'incertitude face au positionnement du point doit être prise en compte.

De plus, ces points sont spécifiques du type de déformation étudiée et la démarche doit être réadaptée en fonction du type d'individus et de sa déformation (cf. sections III et IV).

Enfin, il est important de préciser que l'ordre de positionnement des points est très important. Si l'ordre n'est pas respecté entre chaque diatomée, les points ne sont plus homologues d'un individu à un autre, pouvant poser un problème dans l'interprétation des résultats.

* Les numéros indiqués en exposant renvoient à la liste des noms des fichiers correspondants (ici ¹) dans le filer\Morphometrie\, listés en Annexe 2

2. Etude sur l'ensemble des individus

2.1. Mise en évidence des populations déformées

Après avoir testé la méthode sur un faible échantillon, l'analyse a été réalisée sur l'ensemble des individus GNT et GT soit 269 diatomées (Figure 7).

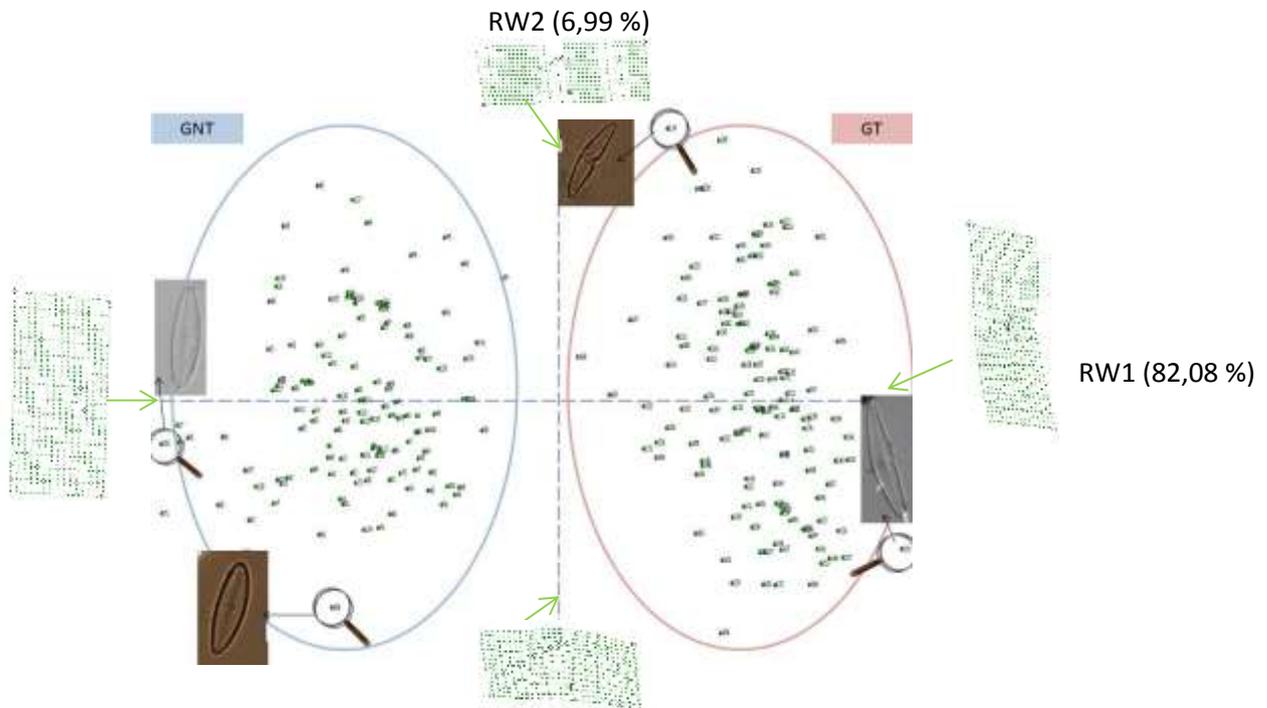


Figure 7 : TPS représentant la variation de GNT et GT sur l'ensemble des diatomées²

Les résultats confirment le bon fonctionnement de la méthode. En effet, deux ensembles bien distincts sont observés. A droite, l'ensemble d'individus correspond aux diatomées tératologiques (139 individus) tandis qu'à gauche il s'agit d'individus non tératologiques (130 individus). Cette distinction est réalisée grâce aux grilles de déformations proposées par l'analyse.

L'axe 1 explique la déformation ou non des diatomées à 82,08 %, tandis que l'axe 2 explique l'allongement de la diatomée à 6,99 %. En effet, plus les individus sont vers la droite du graphique plus ils sont déformés (forme boomerang et creux) et inversement vers la gauche du graphique. Puis, plus les diatomées sont vers le haut du graphique, plus elles sont allongées (et inversement vers le bas du graphique). Les résultats obtenus correspondent bien aux observations visuelles réalisées.

La morphométrie géométrique a pour but de comparer des formes très proches ; en choisissant de faire cette analyse sur des individus morphologiquement très différents, il y a des risques que des informations sur de plus faibles variations de formes aient été perdues (Metairie, 2014). Cependant, le but de ce résultat était de seulement voir si le placement des points-repères était correct pour permettre la **séparation entre GT et GNT**. Une fois la

méthode approuvée, nous avons souhaité comparer des spécimens morphologiquement similaires : la souche mère (GGRA) à la génération suivante (GNT) pour mettre en évidence ou non une variation de forme entre les deux cultures non déformées (Figure 8).

2.2. Pouvoir de discrimination entre souches non déformées

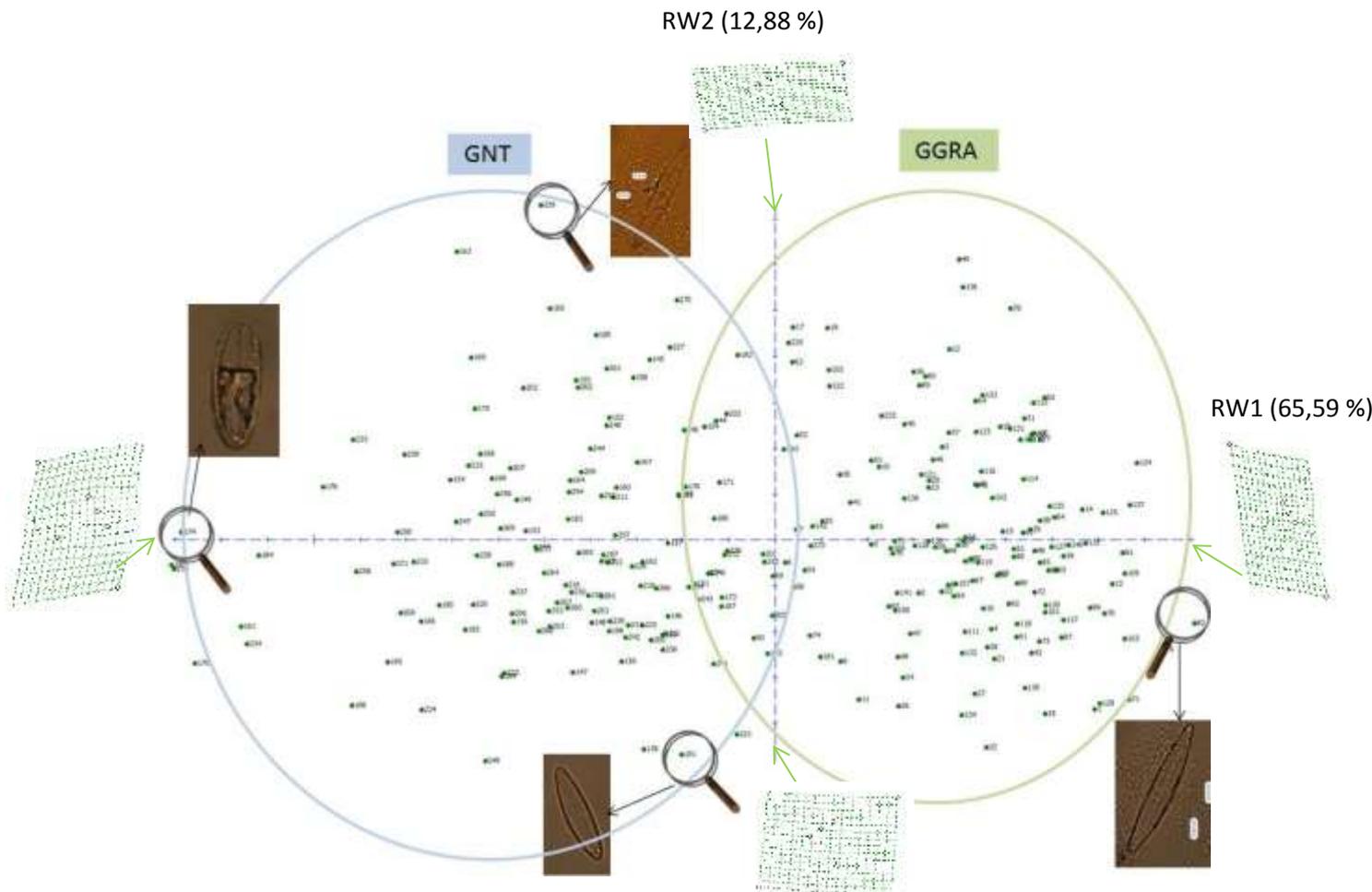


Figure 8 : TPS représentant la variabilité de forme entre GNT et GGRA sur l'ensemble des individus³

Les résultats mettent en évidence une **variation de forme subtile entre GGRA et GNT**. A droite, les individus correspondent à GGRA (143 individus) tandis qu'à gauche ils correspondent à GNT. Cette discrimination est réalisée grâce aux grilles de variation morphologique et à l'identification de chaque point sur le graphique. Au centre du graphique, une zone de recoupement entre les deux ensembles est observée. Les variations de formes entre les deux ensembles sont expliquées principalement par l'axe 1. Ce dernier explique à 65,59 % la variation de forme des individus, tandis que l'axe 2 explique à 12,88 % une légère hétéropolarité de la diatomée. L'axe 1 traduit des variations du rapport longueur/largeur : plus les diatomées sont vers la droite du graphique plus elles sont

allongées. Sur l'axe 2, plus la diatomée est vers le haut du graphique, plus elle est hétéropolaire (et inversement vers le bas du graphique).

Cette distinction entre les deux ensembles peut être expliquée par la différence d'âge entre les deux cultures. En effet, une différence de un an est observée entre GGRA (prélevée en mars 2014) et GNT (prélevée en mars 2015). Ces résultats permettent donc de montrer la capacité de la méthode à séparer finement des formes paraissant similaires visuellement (Metairie, 2014). Cette analyse prouve donc la performance de la morphométrie géométrique à séparer des individus ayant des formes proches. Cela sera un atout pour permettre de mettre en évidence différents indices de déformations des diatomées.

3. Etude de l'indice de déformation

La méthode fonctionnant sur l'ensemble des individus, l'étude de l'intensité de la déformation peut être réalisée (Figure 9). Préalablement, des indices de déformations allant de 1 (très peu déformés) à 7 (très déformés) ont été déterminés visuellement sur les individus déformés afin de réaliser une classification *a priori* de la sévérité de déformation (Figure 10). Cette classification a ensuite été confrontée aux résultats de l'analyse TPS pour évaluer la capacité de la méthode à mettre en évidence le degré de déformation.

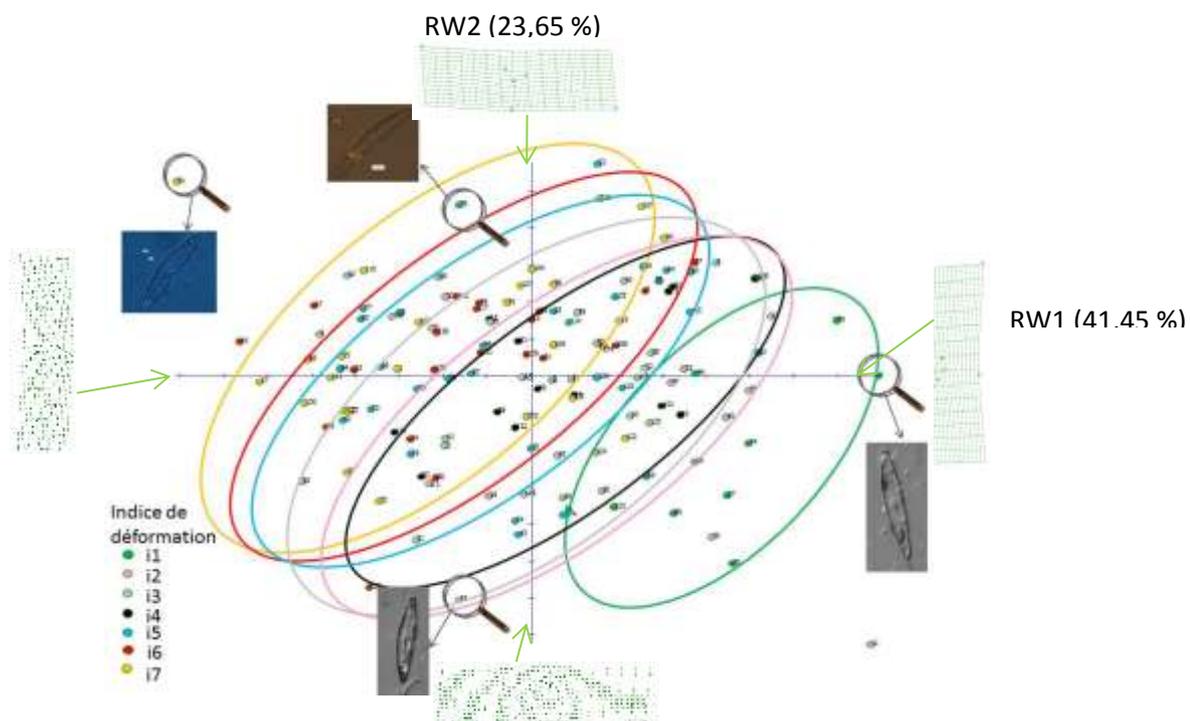


Figure 9 : TPS représentant le gradient d'indices de déformations (ix) sur l'ensemble des diatomées déformées (à noter que les ellipses sont positionnées manuellement)⁴

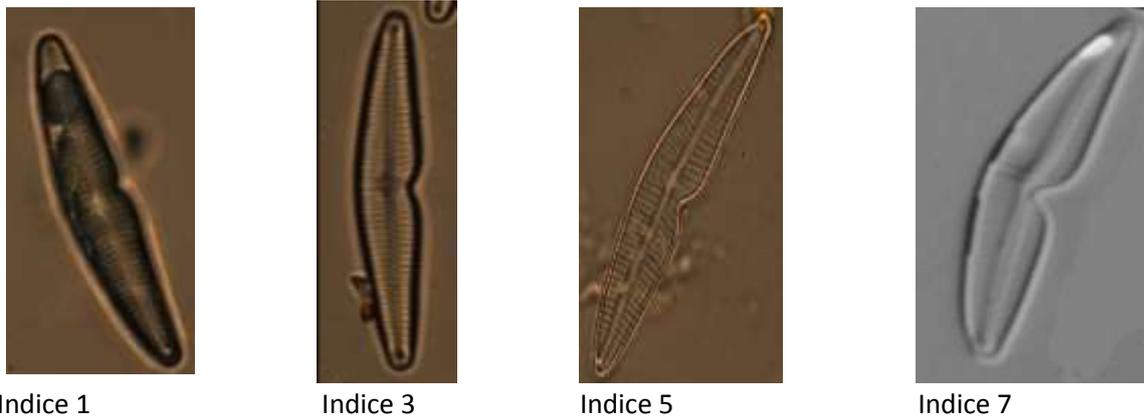


Figure 10 : photographie montrant la classification *a priori* des déformations

Ces résultats mettent en évidence la présence d'un **gradient de déformation** établi *a priori*. En effet, l'indice 1 noté i_1 représenté par une ellipse verte, est l'indice le plus à droite sur le graphique. Par conséquent, les individus sont peu courbés (expliqué par l'axe 1 à 41,45 %) et ont une invagination peu marquée (expliqué par l'axe 2 à 23,65 %). Plus les ellipses se situent vers la gauche du graphique (c'est-à-dire plus les coordonnées de RW1 sont négatives), plus l'invagination et la courbure de la diatomée sont importantes : une diatomée en forme de boomerang et creuse est obtenue. En effet, l'indice 7 noté i_7 est l'indice de déformation le plus important *a priori* et se retrouve bien le plus à gauche du graphique.

Entre les deux ellipses les plus extrêmes, un gradient de déformation est observé avec seulement un mauvais positionnement (relatif) d' i_4 . En effet, lors de la réalisation de la classification, nous avons seulement considéré l'invagination et non la courbure de la diatomée. Toutefois, il est à noter que la distribution des médianes des groupes, le long de l'axe principal (RW1), est ordonnée conformément aux indices croissants (Figure 11, Figure 13).

Grâce à ces résultats, le lien entre la courbure de la diatomée et sa déformation peut être mis en évidence. Afin d'appuyer statistiquement ces résultats, une ANOVA est réalisée à partir des coordonnées des individus le long de l'axe RW1 (Figure 11).

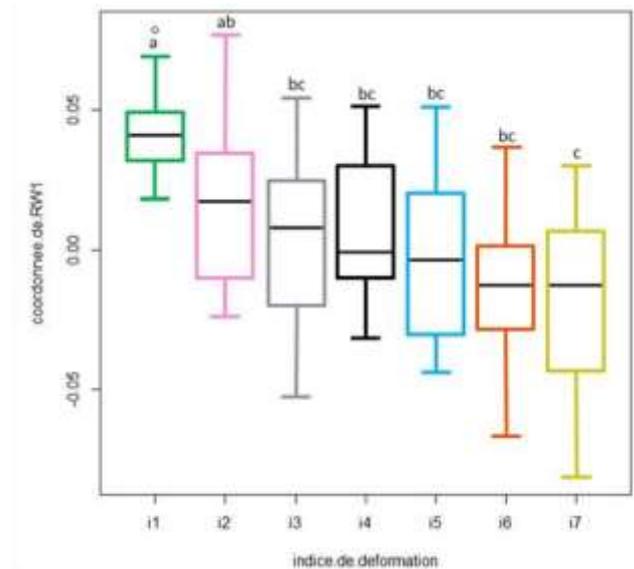


Figure 11 : graphique représentant les indices de déformations en fonction des coordonnées de RW1. Les lettres différentes indiquent les groupes statistiquement différents identifiés par l'ANOVA⁵

La diminution des valeurs médianes des coordonnées TPS le long de l'axe RW1 (le plus explicatif) avec l'augmentation des valeurs d'indice de déformation, traduit la présence du gradient de déformation déjà mis en évidence dans le graphique précédent (Figure 10). Pour appuyer ces résultats, des différences significatives entre i1 et i3, i4, i5, i6, i7 et entre i2 et i7 sont observées. Un gradient de déformation est donc clair entre i1 et tous les autres indices, et l'ANOVA permet de discriminer les indices extrêmes. Cependant, l'analyse pourrait être améliorée en travaillant non pas sur l'axe 1, mais sur l'axe « transversal », visible sur la Figure 13, le long duquel les groupes se séparent le mieux.

Afin de prouver statistiquement le placement des ellipses sur la Figure 9, des tests statistiques supplémentaires ont été réalisés sur les coordonnées de RW2 en fonction des indices de déformation (Figure 12).

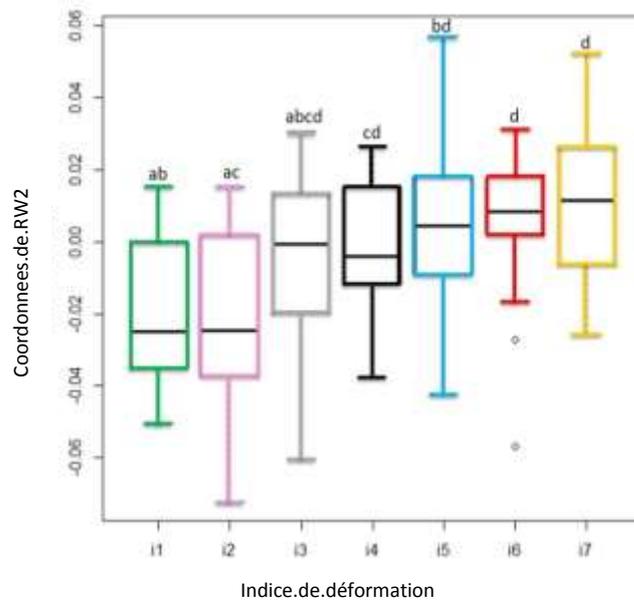


Figure 12 : graphique représentant les indices de déformations en fonction des coordonnées de RW2. Les lettres différentes indiquent les groupes statistiquement différents identifiés par l'ANOVA⁵.

Grâce à ces deux graphiques (Figure 11 et 12), nous avons pu placer les médianes des coordonnées de RW1 et de RW2 sur le graphique de la TPS (Figure 9).

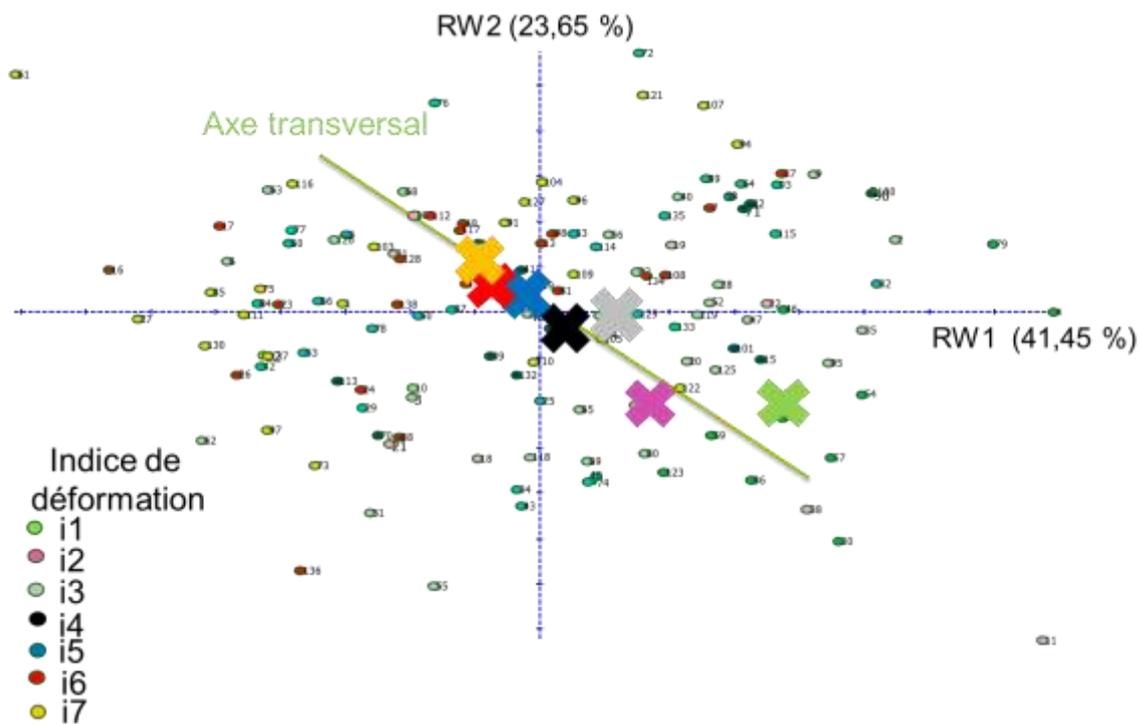


Figure 13 : TPS représentant le gradient d'indices de déformations (ix) sur l'ensemble des diatomées déformées. Les croix représentent les médianes des coordonnées de RW1 et RW2 pour chaque indice de déformations⁴

Sur cette figure, nous avons observé que les groupes semblent mieux se séparer selon l'axe transversal. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la figure suivante (Figure 14). Sur cette figure, on observe bien que la séparation des indices de déformations se fait mieux par rapport aux graphiques précédents.

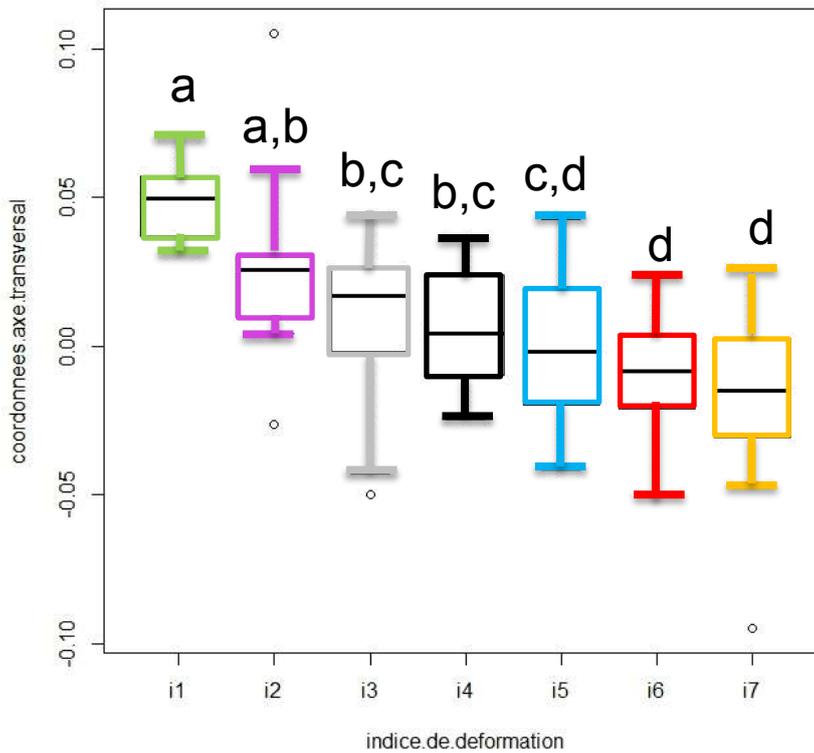


Figure 14 : graphique représentant les indices de déformations en fonction des coordonnées de l'axe transversal. Les lettres différentes indiquent les groupes statistiquement différents identifiés par l'ANOVA⁵.

III. Résultats et Discussion pour la diatomée *Nitzschia palea*

La méthode étant approuvée chez *Gomphonema gracile*, nous avons souhaité la tester sur *Nitzschia palea* telle quelle, à savoir caractériser la forme de *Nitzschia palea* avec 6 points-repères placés de la même façon que pour *Gomphonema gracile*. Au contraire de *G. gracile*, cette déformation de *N. palea* se traduit par la présence d'une excroissance (bosse) localisée en zone médiane de l'axe longitudinal. Nos analyses comportent 49 individus.

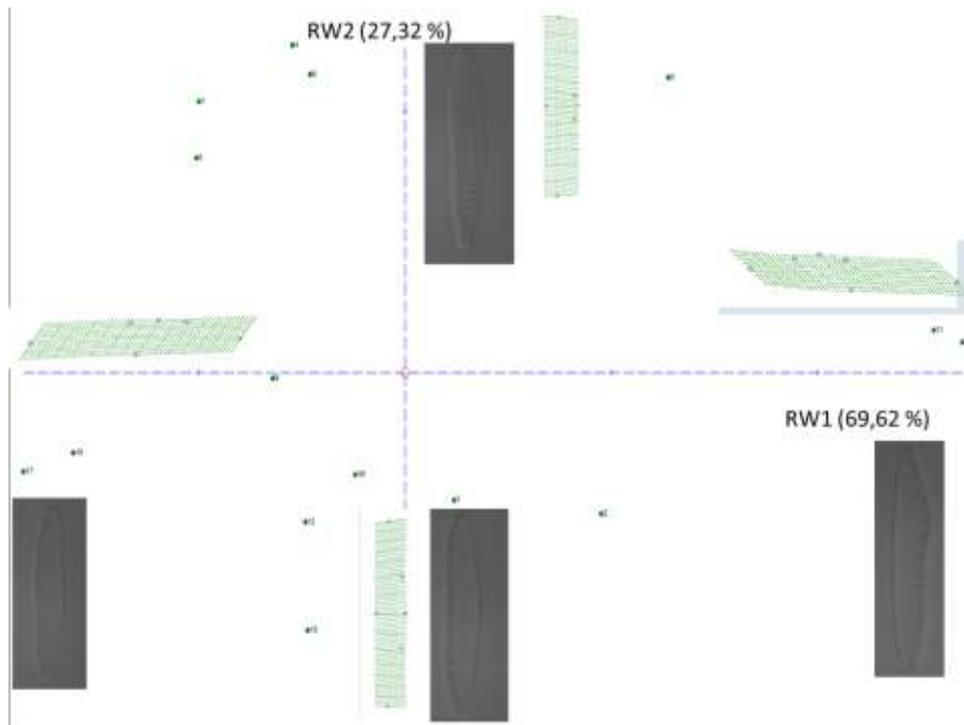


Figure 15 : TPS représentant les variations de formes chez les diatomées *Nitzschia palea* déformées⁶

Ces résultats mettent en évidence un placement des points-repères inapproprié. En effet, aucun gradient de déformation n'est observé. L'axe 1 explique à 69,62 % l'emplacement de la déformation (en haut ou en bas de la diatomée par rapport au point central), tandis que l'axe 2 explique à 27,32 %, la distance entre les points-repères caractérisant l'excroissance.

Afin de pallier ce problème, nous avons décidé de placer un nombre deux fois plus important de points-repères, soient 12 points-repères. Nous avons placé les points-repères selon les relations de proportionnalité avec le côté fibule toujours placé à droite (les points 3 et 4 sont placés à la moitié, les points 5-6 et 7-8 sont placés au quart et pour finir les points 9-10 et 11-12 sont placés à 2 μm des points 3-4). Ils sont placés à cette distance car l'étalement de la bosse peut mesurer au minimum 3 μm (Figure 16).

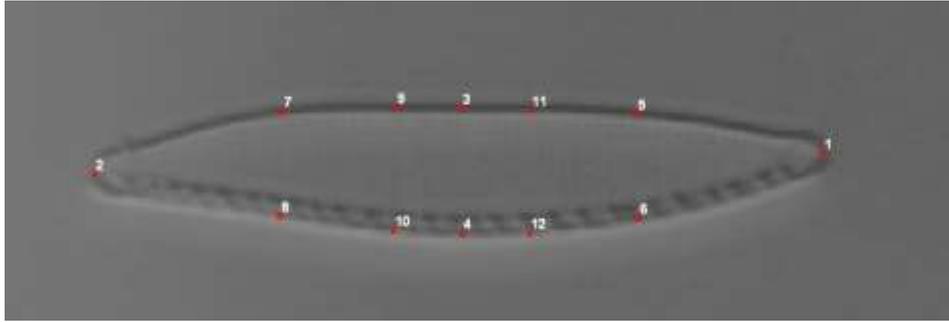


Figure 16 : Placement des 12 points-repères sur *Nitzschia palea*

Les résultats obtenus avec 12 points-repères, visibles dans la Figure 17, montrent la présence de 2 groupes. Un groupe composé des individus ayant la déformation opposée aux fibules (NF-NPAL) et un second groupe comprenant les individus ayant la déformation du côté des fibules (F-NPAL) et ceux n'ayant pas de déformations (NPAL). L'axe 1 explique à 36,43 % le ratio longueur/largeur tandis que l'axe 2 explique à 21,57 % la forme sigmoïde de la diatomée. On observe donc la séparation de ces 2 groupes car les diatomées ayant la déformation du côté opposé aux fibules, semblent présentées une bosse plus marquée. Cependant, là encore, le placement des points-repères restent inappropriés pour séparer correctement les 3 groupes.

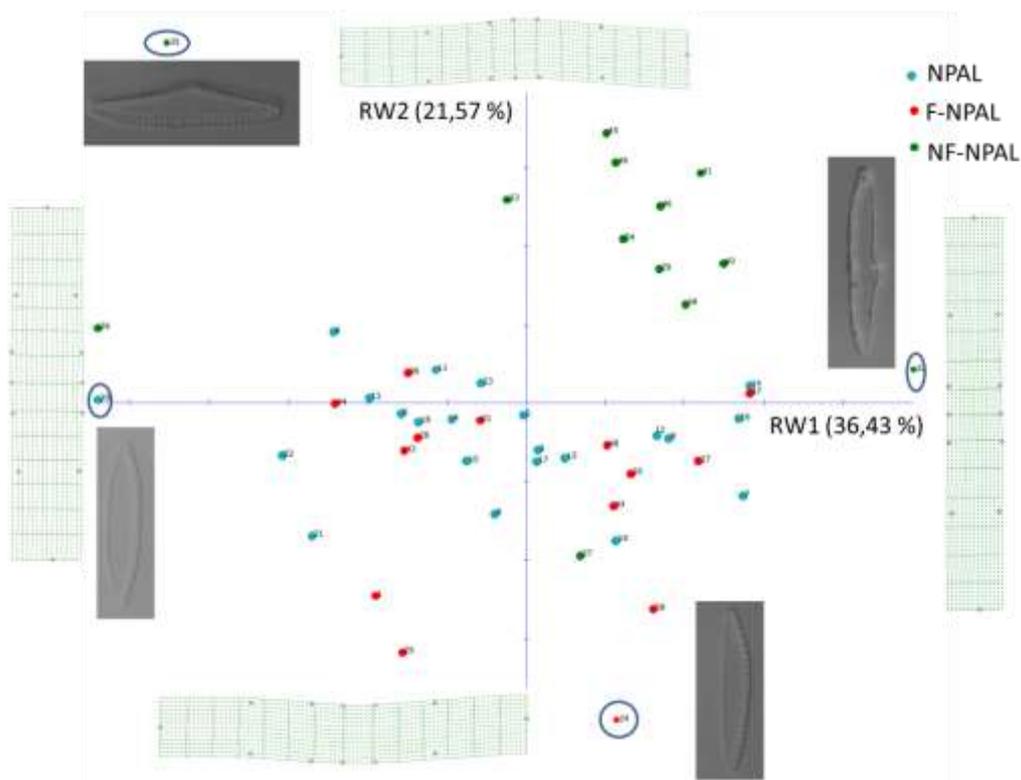


Figure 17 : TPS représentant les variations de formes entre NPAL, NF-NPAL, F-NPAL sur 12 points-repères⁷

Afin de mieux séparer ces groupes, nous avons décidé de placer 16 points-repères, où les points 13-14-15-16 sont placés à 2 µm des points 9-10-11-12. (Figure 18). L'hypothèse faite

était que la discrimination entre groupes pourrait être affinée en caractérisant plus précisément la zone de boursouffure. L'augmentation du nombre de points-repères était supposée permettre de mieux en décrire l'étalement et l'amplitude.

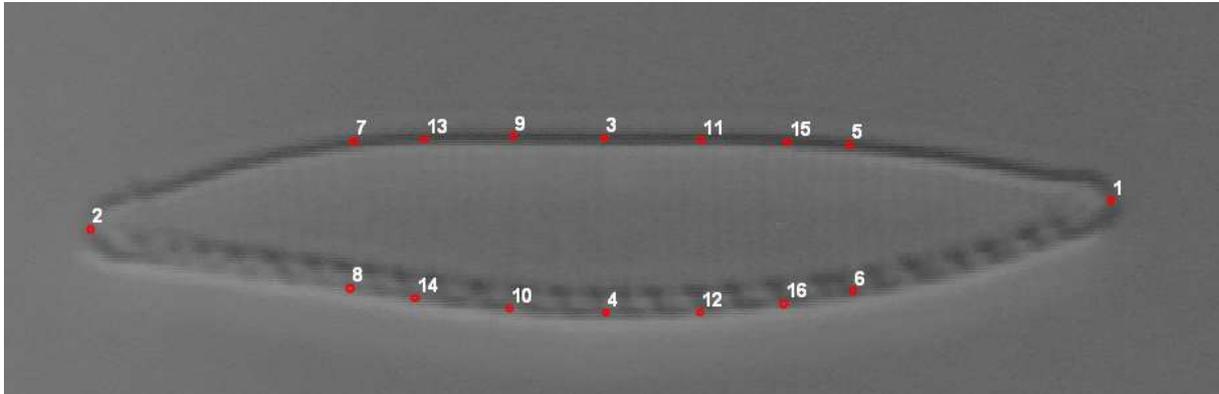


Figure 18 : Placement des 16 points-repères sur *Nitzschia palea*

Malgré cela, la séparation des groupes ne s'effectue toujours pas (Figure 19).

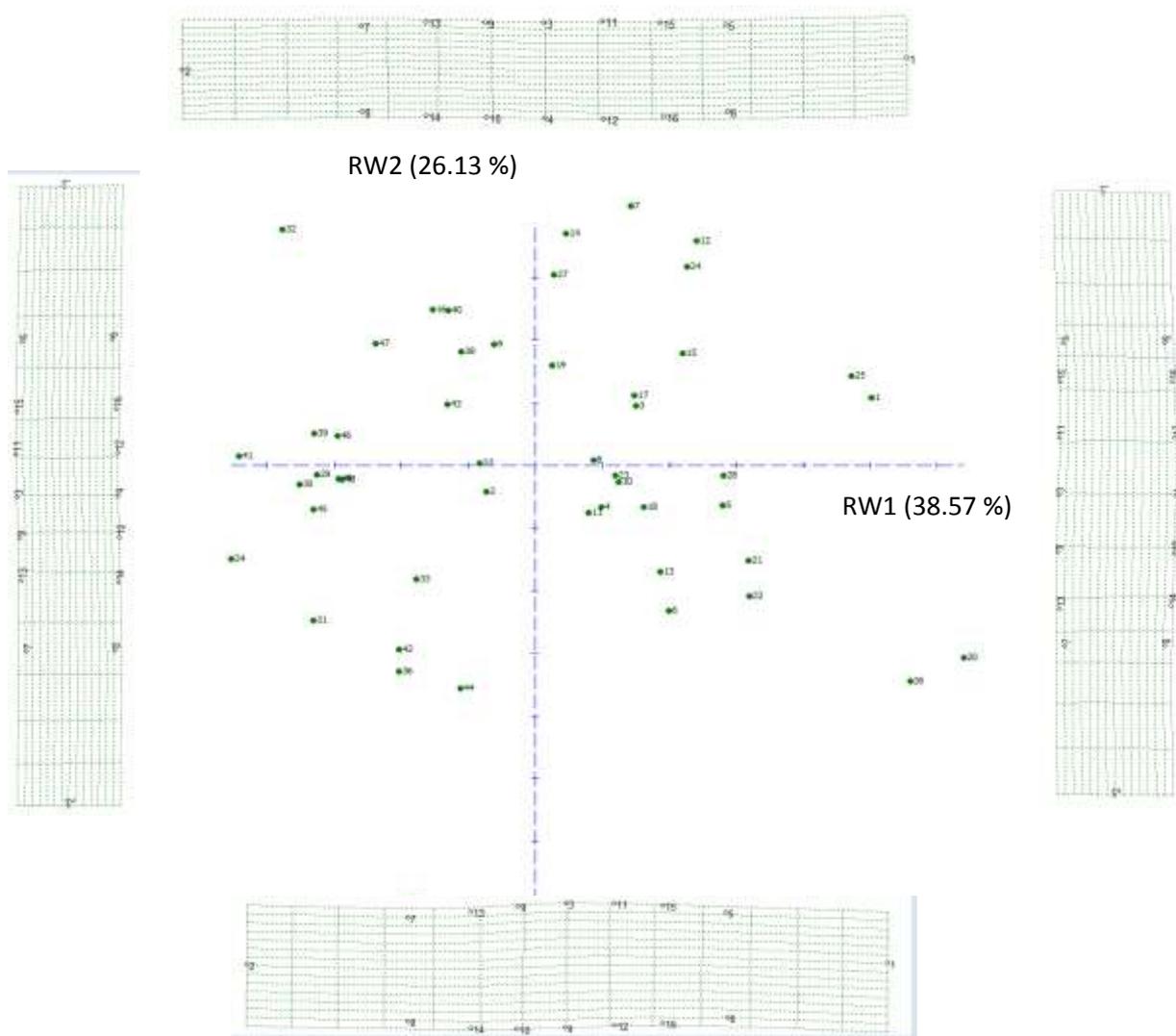


Figure 19 : TPS montrant les variations de formes chez la diatomée *Nitzschia palea*⁸

Dans ces analyses, nous avons fait l'hypothèse que l'apparition du secteur déformé côté fibule ou non était un critère important, non aléatoire, pour la caractérisation de la déformation. Cependant, selon la valve observée il est possible que la présence ou non de fibule soit un paramètre secondaire, dépendant uniquement du hasard d'observer une valve ou l'autre. En conséquence, un nouveau test a été réalisé toujours avec 16 points-repères en positionnant les déformations toujours du même côté, afin de déterminer si la sévérité de la déformation pouvait être mieux estimée. Ainsi, il est possible de discriminer les individus déformés des individus normaux à partir des coordonnées des points sur l'axe 1, mais la séparation entre les deux types de déformations ne se fait toujours pas bien (Annexe 3).

Un second test a été réalisé : mettre toujours le côté fibule à droite seulement pour NF et F-NPAL. La séparation ne se fait toujours pas de façon satisfaisante pour nos objectifs (Annexe 4).

IV. Résultats et Discussion pour la diatomée *Achnantheidium minutissimum*

Afin de caractériser au mieux la déformation chez cette espèce, nous avons placé les points-repères de la même façon que pour *Gomphonema gracile* en gardant toujours la déformation à gauche de l'image car la majorité des images prises possèdent une déformation sur la gauche. Pour cela, un reflet de l'image d'origine doit être fait sur certaines photos. Le point 1 et 2 aux extrémités, le point 3 et 4 au niveau de l'aire centrale où la densité de stries est plus faible, le point 5 au sommet de l'invagination, les points 6 et 7 au point d'inflexion de la déformation (Figure 20). Il faut savoir que l'invagination est presque tout le temps opposée à une zone de l'aire centrale où il y a une absence de stries. Le point n°3 est justement toujours placé du côté où on constate une absence de stries, c'est ce qui permet d'avoir toujours la déformation à gauche. Dans l'étude, nous avons constaté la présence d'individus ayant une double déformation, cependant avec des effectifs trop faibles (11 individus au total/ 335 individus observés) pour autoriser une analyse statistique dédiée. Pour l'étude, nous avons placé les points-repères de façon à ce qu'une des deux déformations soit aussi placée à gauche.

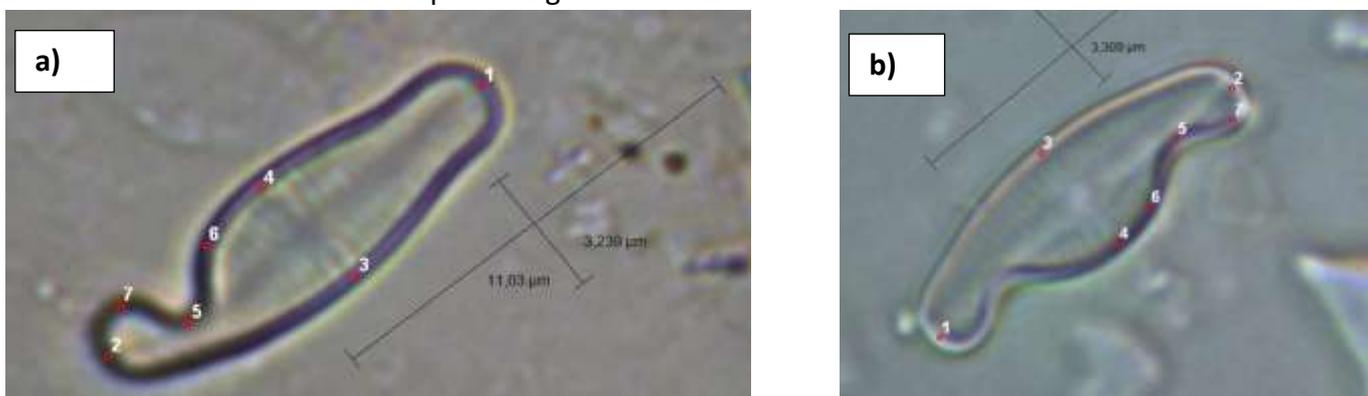


Figure 20 : Placement des 7 points-repères sur *Achnantheidium minutissimum* déformée (a) et d'une diatomée ayant une double déformation (b)

Pour les diatomées non déformées, il faut savoir que chaque extrémité de la diatomée a une partie rostrée, qui correspond approximativement à la zone d'invagination des individus déformés. En conséquence, les points numérotés de 1 à 4 sont placés de la même façon pour tous les morphotypes et les 5-6-7 sont placés dans cette zone rostrée (avec le point 5 placé dans la zone creuse et les points 6-7 placés aux points d'inflexion) (Figure 21).

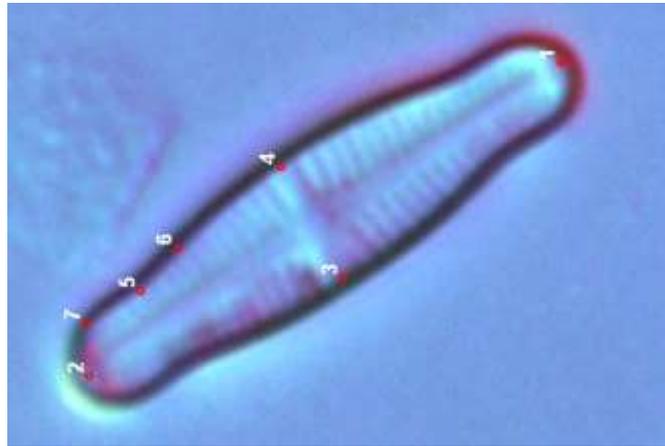


Figure 21 : Placement des points-repères sur *Achnantheidium minutissimum* non déformée

Pour s'assurer du placement reproductible du point 3, les photos ont été prises de façon à voir le raphé. Il est important de signaler que des tests ont été réalisés avec seulement les 3 points repères 5-6 et 7 permettant de caractériser au mieux la déformation uniquement (Annexe 5). Cependant, pour la majorité des analyses, nous avons décidé de travailler avec 7 points-repères car nous avons une caractérisation de la forme globale de la diatomée en lien avec son invagination.

Nous avons ensuite réalisé une TPS des individus déformés avec les individus non déformés avec 7 points-repères (Figure 22).

	Non déformés		Déformés	
	AvP	AvL	AvP	AvL
2009	34	0	28	0
2012	25	29	5	34
2013	13	29	2	36
2014	26	33	6	35
Total	189		146	

Tableau 1 : Nombre total d'individus utilisés pour l'étude

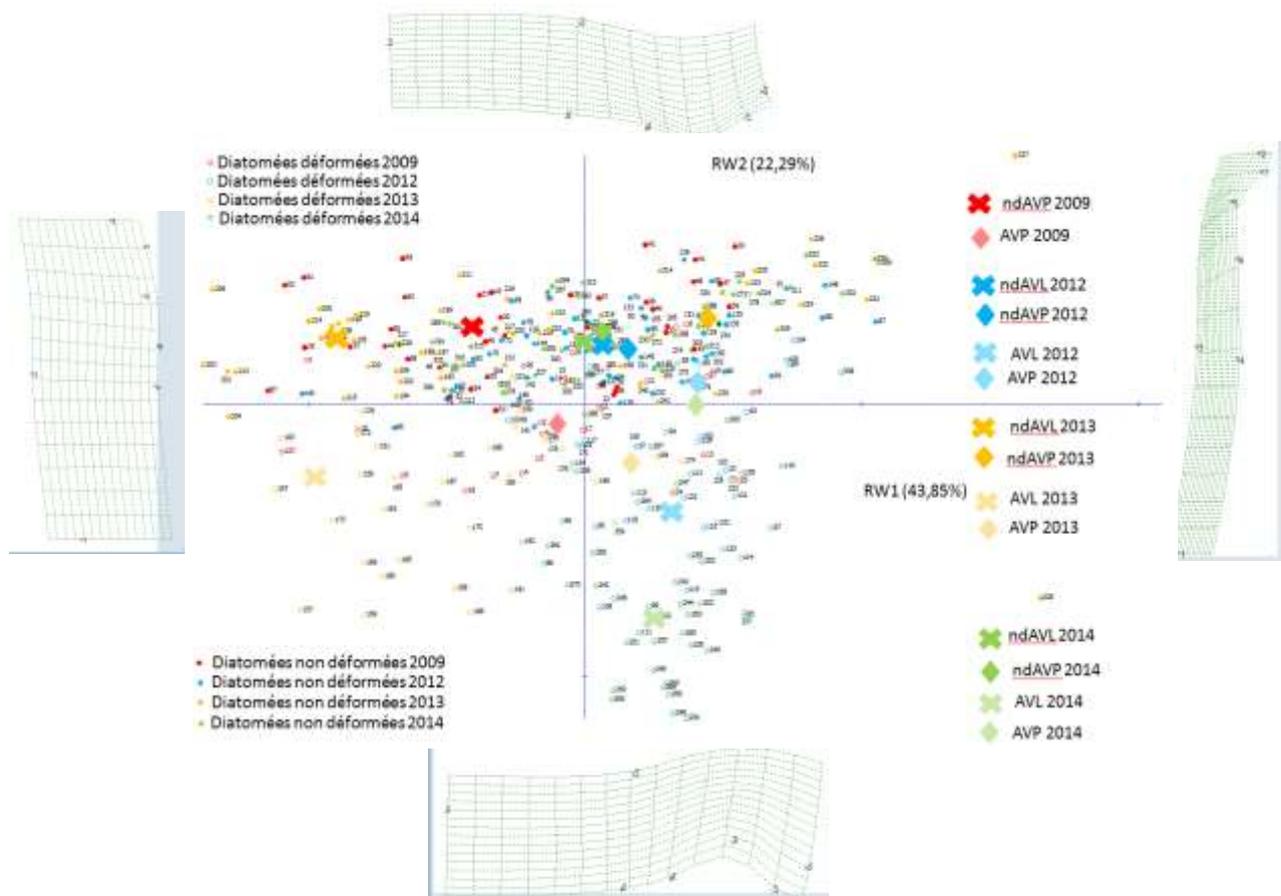


Figure 22 : TPS représentant les variations de formes entre les individus déformés et non déformés⁹

Les croix ainsi que les losanges, qui correspondent aux coordonnées médianes de chaque groupe, ont été placés grâce aux boxplots exprimant les coordonnées de x ou de y en fonction des années ou des sites (Annexe 8). L'axe 1 explique à 43,85 % le ratio longueur/largeur tandis que l'axe 2 explique à 22,29 % l'invagination plus ou moins marquée de la diatomée.

Ce graphique montre que les individus non déformés (que ce soit des AVL ou des AVP) sont placés dans la partie haute du graphique. Tandis que les individus déformés sont plutôt placés dans la partie basse du graphique. On observe aussi, selon l'axe 2, un gradient de déformation selon les sites. En effet, les individus AVL sont plus déformés que les individus AVP. De plus, on observe aussi un gradient de déformation selon les années. En effet, les individus AVL 2014 sont plus déformés que les individus AVL 2012, que les individus AVL 2013 (AVL 2013 < AVL 2012 < AVL 2014).

Pour les AVP, AVP 2013 sont plus déformés que les AVP 2009, que les AVP 2014 et que les AVP 2012 (AVP 2012 < AVP 2014 < AVP 2009 < AVP 2013).

Nous avons donc décidé de réaliser une TPS mais seulement sur les individus déformés selon les sites (Figure 23) puis selon les années (Figure 24).

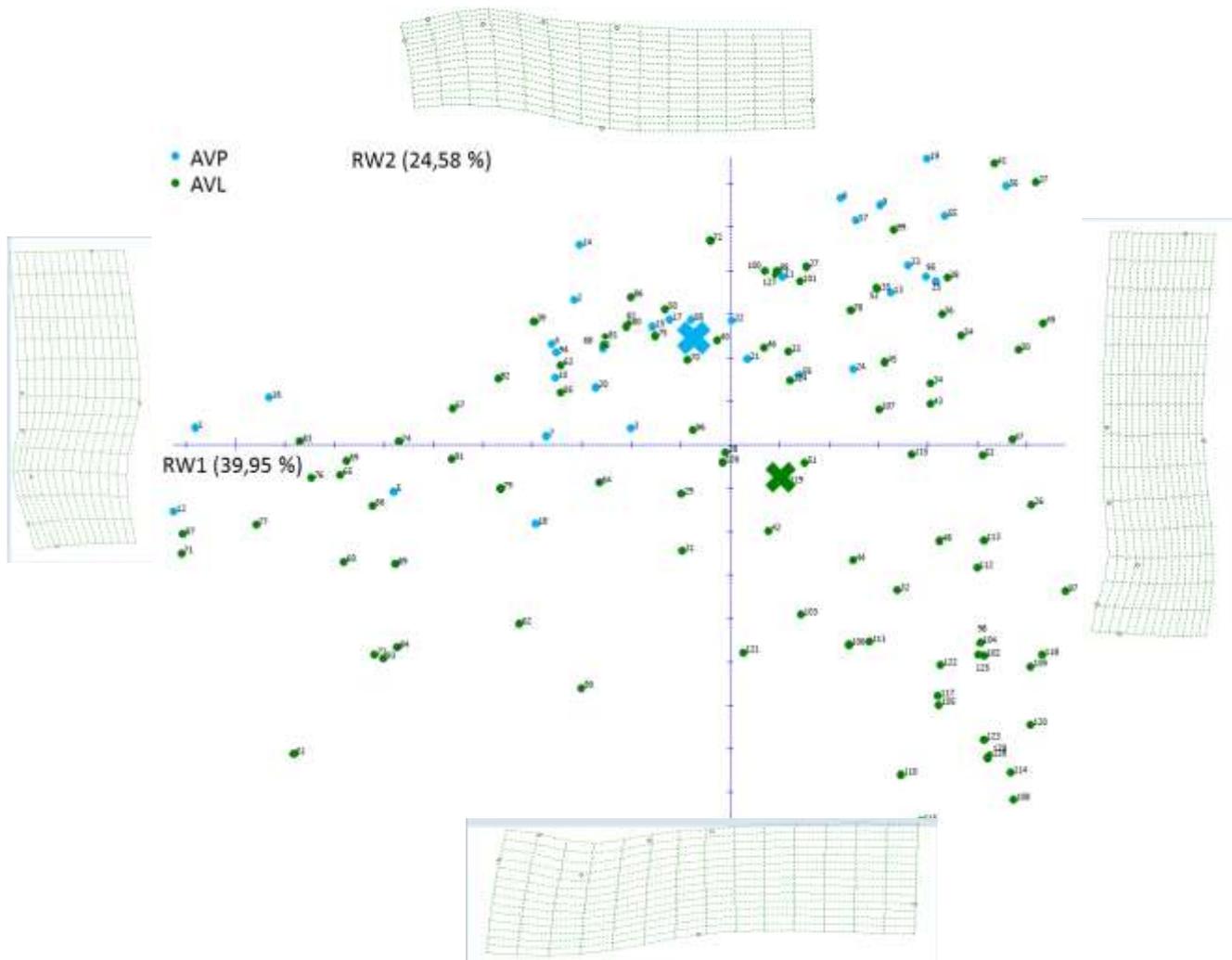


Figure 23 : TPS représentant les variations de formes selon les sites¹⁰

Sur la Figure 23, l'axe 1 explique à 39,95 % le ratio longueur/largeur tandis que l'axe 2 explique à 24,58 % l'invagination de la diatomée. On observe donc que les individus AVL sont plus déformés que les individus AVP.

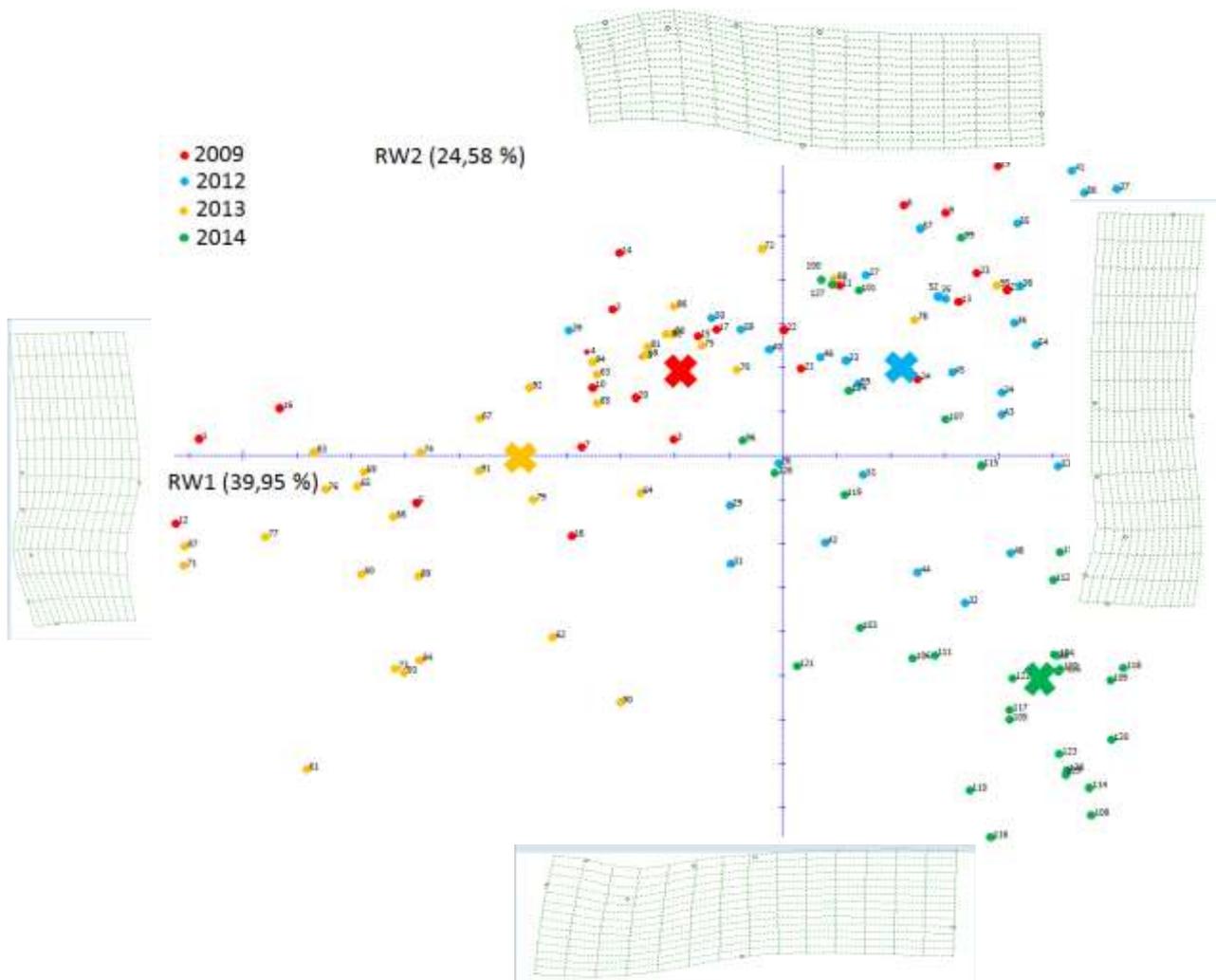


Figure 24 : TPS représentant les variations de formes selon les années¹⁰

Sur la Figure 24, on observe que les individus de 2014 sont donc moins larges et plus déformés que les individus de 2012, 2009 ou 2013 (valeurs croissances des médianes le long de RW1).

Lorsque l'on compare ces 2 graphiques, on s'aperçoit que l'axe 1 explique plutôt un effet « année » tandis que l'axe 2 explique plutôt un effet « site ».

Au vu des résultats, nous avons voulu regarder les différences de longueur au sein des individus déformés et non déformés selon les années et selon les sites.

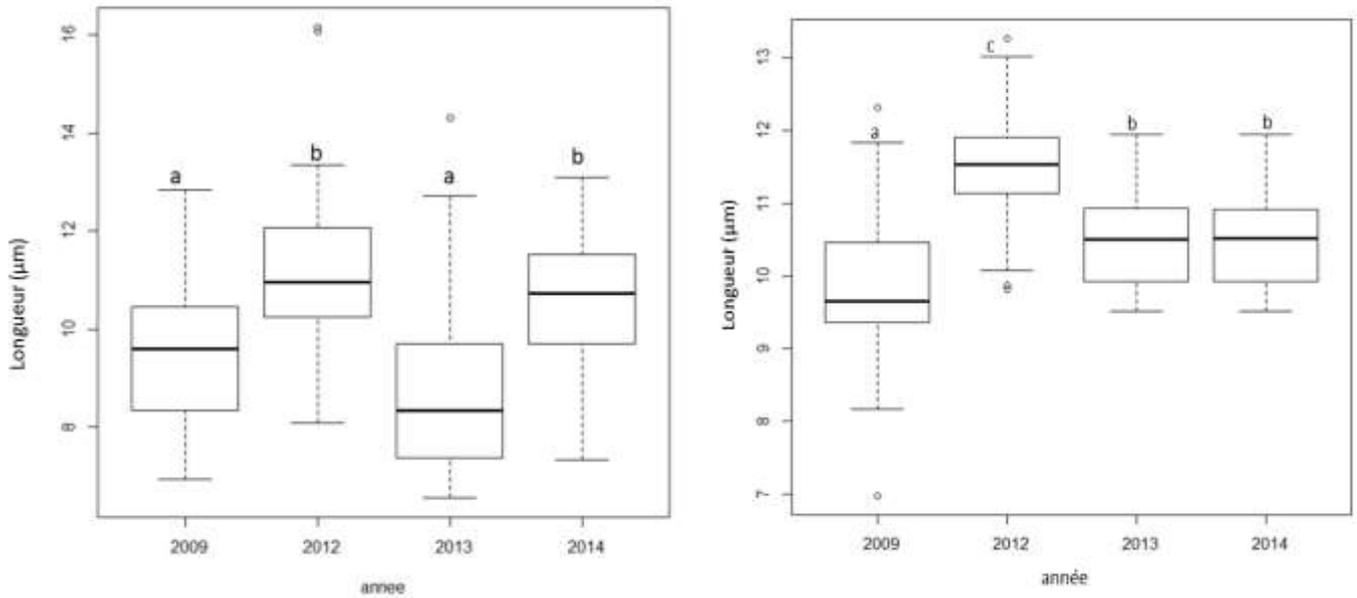


Figure 25 : graphique représentant les longueurs des diatomées chez les individus non déformés (à gauche, n=183) et chez les individus déformés (à droite, n=129), en fonction des années d'échantillonnage

La Figure 25 montre des variations de forme significatives au sein des individus déformés et non déformés en fonction des années. En effet, les populations diffèrent selon les années. Les tailles entre les individus déformés et les individus non déformés sont approximativement les mêmes pour une même année (à part 2013, où les individus non déformés sont plus petits que les individus déformés)¹¹. Ceci semblerait indiquer que les individus déformés sont une sous-population (ou une population « dégénérée ») de la population synchrone, normale, d'*A. minutissimum*.

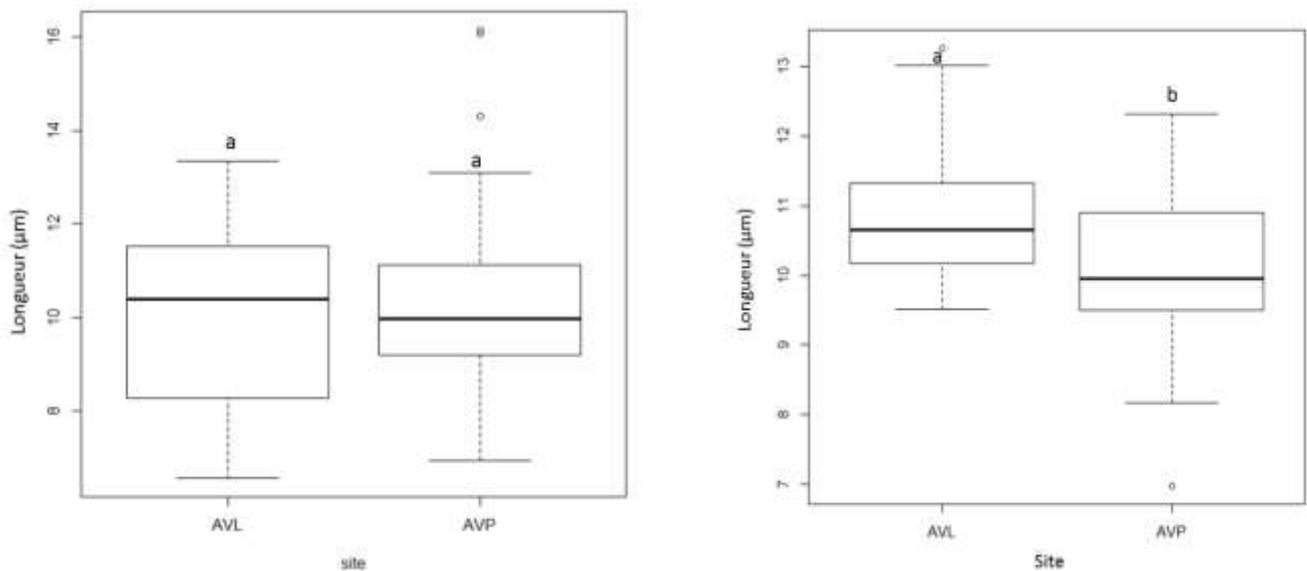


Figure 26 : graphique représentant la longueur des individus non déformés (à gauche, n=183) et des individus déformés (à droite, n=129) selon les sites

Lorsque l'on observe les graphiques illustrant les variations de longueur des populations en fonction des sites de prélèvement, on constate que les tailles des individus déformés et non déformés sont sensiblement les mêmes. Cependant, les longueurs des individus déformés entre les sites sont significativement différentes. En effet, les individus AVL sont plus longs que les individus AVP¹¹. En revanche, les tailles des individus non déformés sont sensiblement les mêmes. Cette contraction peut s'expliquer par le fait que nous avons réalisé un test statistique comparant les longueurs des diatomées déformées et non déformées en mélangeant toutes les années.

Nous avons donc aussi, essayé de savoir s'il y avait un lien entre la longueur de la diatomée et les coordonnées de l'invagination. Nous avons réalisé cette analyse car nous avons observés des variations de longueur entre chaque population et nous nous sommes donc posé la question de savoir s'il y avait un lien entre la longueur de la diatomée et l'invagination qui est plus ou moins marquée (les coordonnées de l'invagination ont été trouvées grâce au placement de 3 points-repères seulement sur l'invagination). Pour cela, nous avons réalisé une TPS toutes années confondues et nous avons constaté que l'axe 1 expliquait l'invagination (Annexe 5), par conséquent, nous avons pris les coordonnées de x pour réaliser cette analyse¹². Pour les individus AVL, on note une tendance significative (p-val=0,02) à la diminution de taille pour des intensités de déformation (coordonnées positives de x) croissantes (Figure 27). Cette relation est plus marquée en 2013 et 2014 (Annexe 6), pouvant traduire une sorte de « recourbement » des individus (qui pourrait éventuellement se vérifier en mesurant la longueur pôle à pôle en suivant le raphé). Au contraire, aucune corrélation n'est mise en évidence pour les individus AVP (p-val=0.72)

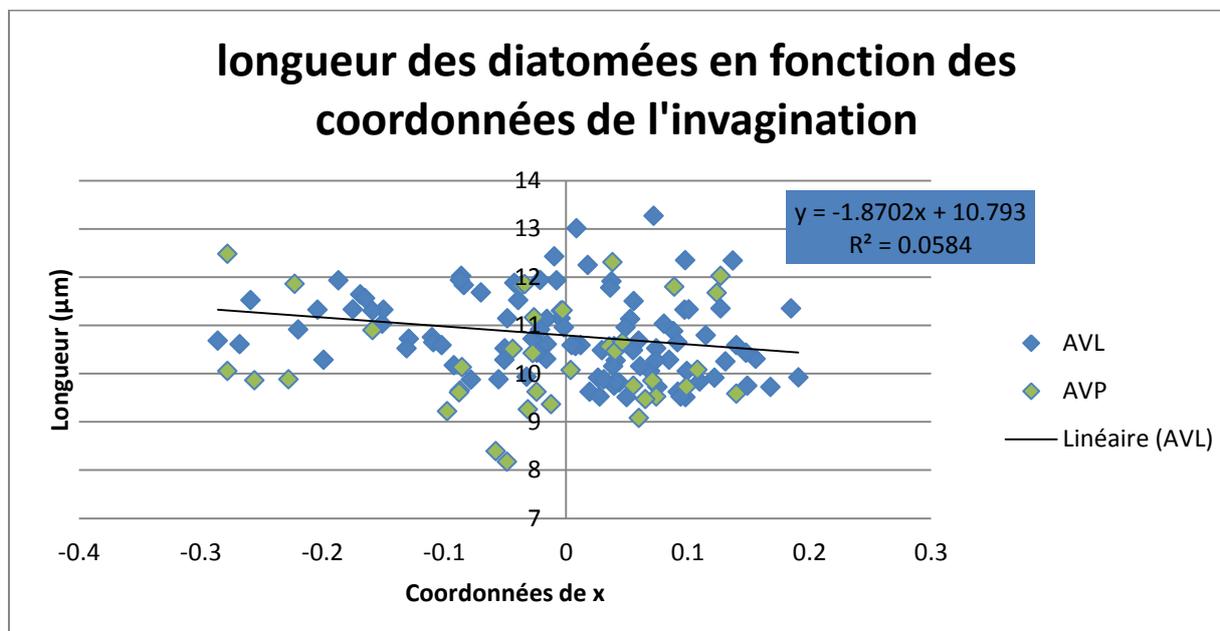


Figure 27 : Graphique représentant la longueur de la diatomée en fonction des coordonnées de x, toutes années confondues

Nous avons voulu ensuite essayer d'expliquer ce gradient de déformation par les paramètres physico-chimiques de la rivière, et notamment la pression toxique, dans la mesure où l'apparition de déformations du contour du frustule sont souvent attribuées à de la contamination métallique (Lavoie et al., 2017). Pour cela, différents graphiques ont été tracés et seulement un paramètre peut expliquer ces variations de formes. Il s'agit du zinc dissous (Figure 28). D'autres études récentes ont mis en évidence une augmentation du pourcentage de diatomées déformées avec l'augmentation des concentrations en zinc (Corcoll et al., 2012 ; Morin et al., 2014).

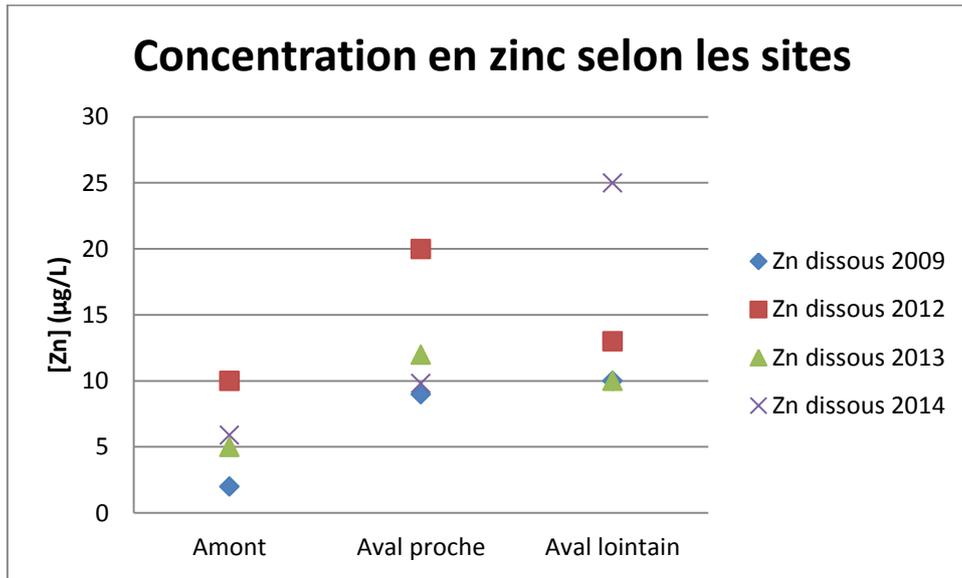


Figure 28 : graphique représentant les concentrations en zinc dans le milieu

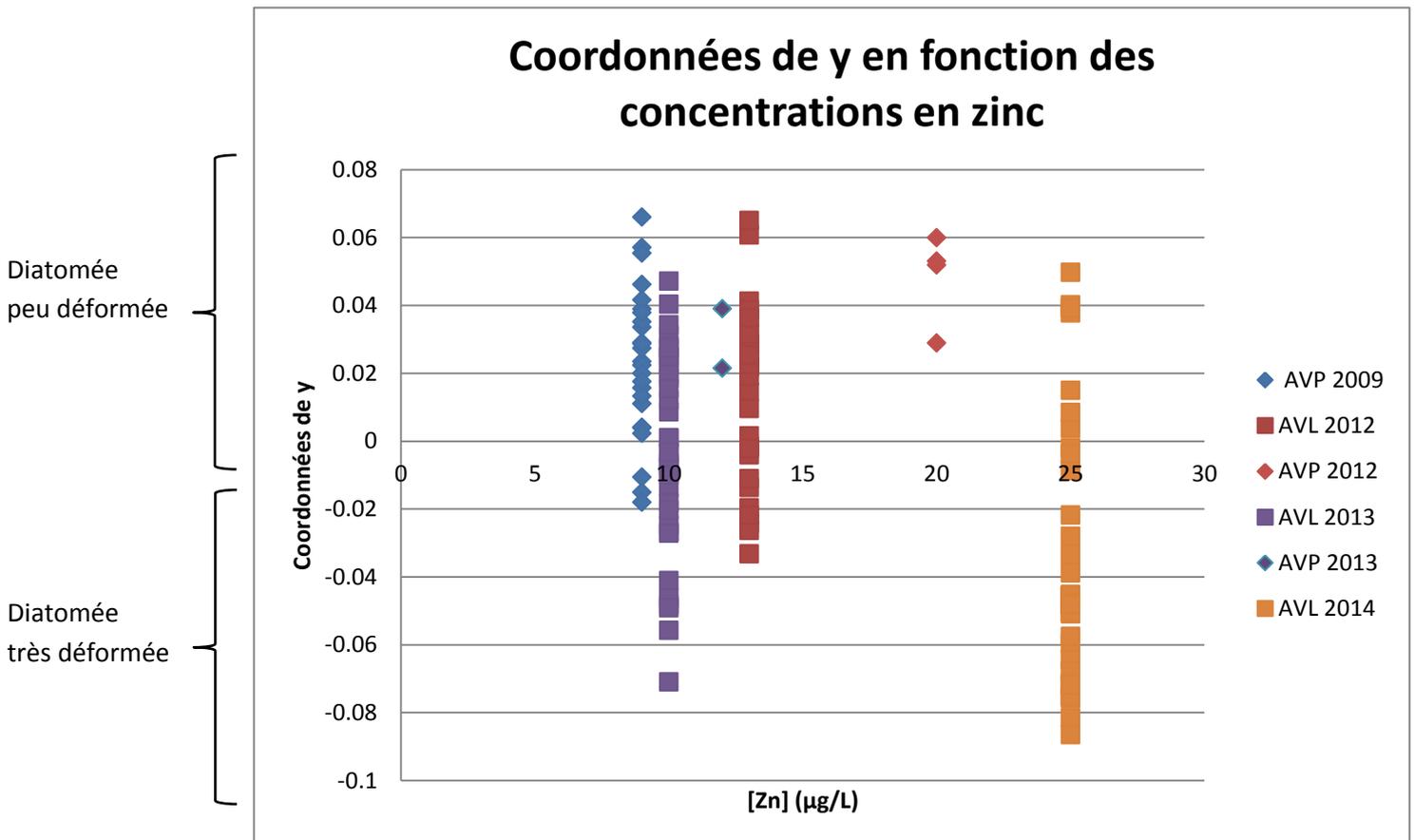


Figure 29 : graphique représentant les coordonnées de y (donc la déformation) en fonction des concentrations en Zn

Les diatomées les plus fortement déformées dans le site aval lointain sont les diatomées de 2014, ce qui correspond à la concentration en zinc qui est maximale à ce site durant 2014. De plus, on observe que les diatomées les moins déformées sont les diatomées de 2013. Ce constat correspond aussi avec les concentrations en zinc qui sont très basse à cette période. En ce qui concerne les diatomées de l'aval proche, nous ne pouvons pas nous prononcer car les concentrations en zinc ne suivent pas l'intensité de déformations des diatomées. En effet, dans cette rivière, nous sommes face à une pollution multiple (Lainé et al., 2014). Par conséquent, différents paramètres peuvent intervenir simultanément (effets de mélanges) et ainsi compliquer l'interprétation des résultats. Une seconde hypothèse portant sur la dissolution du métal dans la colonne d'eau pourrait être évoquée. En effet, la disponibilité des contaminants contenus dans les effluents pourrait dépendre de l'étendue et de la géométrie du panache de contaminants à partir du point de rejet, ainsi que des propriétés physicochimiques des contaminants et du milieu récepteur. En fonction de la distance au site de rejet, la distribution (et/ou la solubilité) des toxiques serait plus hétérogène à proximité de l'usine (AVP), et s'homogénéiserait dans la totalité de la colonne d'eau à mesure que l'on s'éloigne de la source, à la faveur d'un brassage des eaux plus important.

Pourtant, les concentrations de l'aval lointain ne sont pas toujours supérieures à celles de l'aval proche selon les années, les diatomées de l'aval proche devraient donc être autant ou plus déformées que celle de l'aval lointain pour les années 2013, 2012 et 2009.

Or, lorsque l'on regarde ce n'est pas le cas : les diatomées de l'aval lointain sont toujours plus déformées que les diatomées de l'aval proche quelles que soit les années. Deux hypothèses peuvent contribuer à expliquer ce résultat. L'une est liée au prélèvement d'eau, réalisé : i) au milieu du cours d'eau, à quelques dizaines de centimètres des cagettes : selon l'homogénéité de la contamination, il est possible que la méthode de prélèvement ne traduise pas exactement le niveau d'exposition des biofilms ; ii) ponctuellement : la contamination au temps de prélèvement ne rend pas compte de l'exposition intégrée dans le temps (rejets fluctuants). L'autre hypothèse est liée aux facteurs biologiques ; en effet ces résultats pourraient traduire un taux de mortalité plus élevé à l'aval proche qu'à l'aval lointain. En effet, pour les années 2009, 2012 et 2014, la mortalité des diatomées (évaluée sur la totalité de la communauté* mature) prélevée sur substrats artificiels en parallèle des échantillons analysés ici était en effet plus importante à l'aval proche qu'à l'aval lointain.

V. Discussion générale sur les apports de la morphométrie géométrique à l'évaluation de la sévérité des déformations

La morphométrie géométrique serait une méthode intéressante pour évaluer la sévérité de déformations des diatomées. Cette évaluation est importante car elle permettrait de

* *A. minutissimum* étant (sub)dominante dans tous les échantillons

corrélér la pression toxique du milieu subit par le milieu et les réponses des organismes face à ce stress. Ceci pourrait amener à développer différents indices supplémentaires pour qualifier de façon plus précise l'état trophique d'un milieu.

Dans cette étude, la morphométrie géométrique a permis d'apporter des précisions quant à son utilisation pour évaluer la sévérité des déformations. Tout d'abord, cette méthode est capable de discriminer des individus déformés d'individus non déformés. De plus, lors de cette étude, nous avons constaté que les dimensions des individus tératologiques étaient sensiblement les mêmes que celles des individus non tératologiques. Cela suggère qu'il s'agit d'une même population qui subit, pour certains individus, la déformation. Puis, cette méthode permet de quantifier une intensité de déformations (visible sur *Gomphonema gracile*). Enfin, elle permet aussi de visualiser une corrélation entre les déformations à une intensité de pression toxique (visible sur *Achnanthydium minutissimum*). Par conséquent, l'utilisation de cette méthode pour l'étude environnementale est justifiée.

De plus, l'utilisation de cette méthode dans notre étude, est relativement rapide. En effet, nous avons utilisé au maximum 16 points-repères, ce qui permet un gain de temps non négligeable quant au placement des points-repères. En effet, dans la plupart des études portant sur la morphométrie géométrique, le nombre de points-repères est bien plus élevé car les chercheurs veulent caractériser la totalité du contour de l'individu (de l'ordre de 40 points-repères) (Olenici et al., 2017). Cependant, la caractérisation de la forme complète de l'individu n'est pas nécessaire. En effet, dans notre étude, nous avons mis en évidence la corrélation entre les déformations et la concentration en zinc dans le milieu avec seulement 6 points-repères pour *Achnanthydium minutissimum*, contre 40 points-repères pour obtenir des corrélations similaires dans Olenici et al. (2017). Par conséquent, le placement des points-repères est très important, car il conditionne leur nombre et permet un gain de temps pour une efficacité de discrimination identique.

Cependant, il est important de noter que cette méthode possède tout de même des limites. Tout d'abord, cette méthode est pertinente lorsque la déformation est placée toujours dans la même zone sur la diatomée. De plus, il est nécessaire d'avoir deux fois plus d'individus que de points-repères pour que cette méthode fonctionne (Arambourou H., 2013). Cette limite peut être transformée en un avantage. En effet, moins nous utiliserons de points-repères, moins nous aurons besoin d'individus, par conséquent nous pourrons réaliser des analyses avec un faible pourcentage d'individus déformés. Cependant, le placement et le nombre de points-repères pourra varier selon la déformation à caractériser. Si cette dernière demande un nombre de points-repères assez important et que la population a un trop faible pourcentage d'individus déformés, cette méthode sera difficilement applicable.

De plus, il existe d'autres types de déformations en plus de celles du contour de l'individu. En effet, ce dernier peut présenter des déformations internes, au niveau des stries. Cette méthode pourrait-elle être utilisée pour caractériser les déformations des stries ? Cela

pourrait éventuellement être possible, car cette méthode est déjà utilisée pour caractériser les déformations internes des ailes de Chironomes (au niveau de leur nervure) par le positionnement de points-repères « de type 1 », correspondant à l'intersection entre 2 lignes. Des tests pourraient donc être réalisés en vue de confirmer ou non cette nouvelle utilisation de la méthode.

VI. Bibliographie

- Arambourou, H. (2013). Stress toxique et variations de forme chez *Chironomus riparius* (Insecte, Diptère), thèse de l'Université de Lorraine, 213 pages.
- Arambourou, H., Beisel, J. N., Branchu, P., & Debat, V. (2014). Exposure to sediments from polluted rivers has limited phenotypic effects on larvae and adults of *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 484(1), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.010>
- Avigliano, E., Domanico, A., Sanchez, S., & Volpedo, A. V. (2017). Otolith elemental fingerprint and scale and otolith morphometry in *Prochilodus lineatus* provide identification of natal nurseries. *Fisheries Research*, 186, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.07.026>
- Bookstein F.L., Rolf F.J. (2016) A glossary for Geometric morphometrics. Disponible sur <http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>
- Bookstein FL (1991) Morphometric Tools for Landmark Data. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 435 pages
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., & Morin, S. (2015). Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquatic Toxicology*, 158, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.021>
- Corcoll N, Bonet B, Morin S, Tlili A, Leira M, Guasch H. 2012. The effect of metals on photosynthesis processes and diatom metrics of biofilm from a metal-contaminated river: A translocation experiment. *Ecological Indicators* 18: 620-631.
- Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F. 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, 9, 621-650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>
- Debat, V., Bégin, M., Legout, H., & David, J. R. (2003). Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*, 57(12), 2773–2784. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01519.x>
- Frankova M., Poulickva A., Neustupa J., Pichrtova M., Marvan P. (2009). Geometric morphometrics – a sensitive method to distinguish diatom morphospecies: a case on the sympatric populations of *Reimeria sinuata* and *Gomphonema tergestinum* (Bacillariophyceae) from the River Beeva, Czech Republic. *Nova Hedwigia*, 88, 81-95. <http://doi.org/10.1127/0029-5035/2009/0088-0081>
- Graham, J. H., Raz, S., Hel-Or, H., & Nevo, E. (2010). Fluctuating asymmetry: Methods, theory, and applications. *Symmetry*, 2(2), 466–540. <https://doi.org/10.3390/sym2020466>

- Lainé M, Morin S, Tison-Rosebery J. 2014. A multicompartiment approach - diatoms, macrophytes, benthic macroinvertebrates and fish - to assess the impact of toxic industrial releases on a small French river. *PLoS ONE* 9: e102358.
- Lavoie I, Lavoie M, Fortin C. 2012. A mine of information: Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Science of the Total Environment* 425: 231-241.
- Lavoie I., Hamilton P., Morin S., Kim Tiam S., Kahlert M., Gonçalves S., Falasco E., Fortin C., Gontero B., Heudre D., Kojadinovic-Sirinelli M., Manoylov K., Pandey L.K., Taylor J.C. (2017) Diatom teratologies as biomarkers of contamination: are all deformities ecologically meaningful? *Ecological Indicators*, sous presse.
- Metairie, L. (2014). Apports de la morphométrie géométrique à la paléanthropologie dentaire, thèse de l'Université Claude Bernard – Lyon 1, 51 pages.
- Morin S, Cordonier A, Lavoie I, Arini A, Blanco S, Duong TT, Tornés E, Bonet B, Corcoll N, Faggiano L, Laviale M, Pérès F, Becares E, Coste M, Feurtet-Mazel A, Fortin C, Guasch H, Sabater S (2012) Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. *Handbook of Environmental Chemistry*, 19, 117-146. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5
- Morin S, Corcoll N, Bonet B, Tlili A, Guasch H. 2014. Diatom responses to zinc contamination along a Mediterranean river. *Plant Ecology and Evolution* 147: 325-332.
- Neustupa, J. (2013). Patterns of symmetric and asymmetric morphological variation in unicellular green microalgae of the genus *Micrasterias* (Desmidiaceae, Viridiplantae). *Fottea Olomouc*, 13(1), 53–63. <https://doi.org/10.5507/fot.2013.005>
- Olenici A, Blanco S, Borrego-Ramos M, Momeu L, Baciuc C (2017) Exploring the effects of acid mine drainage on diatom teratology using geometric morphometry. *Ecotoxicology*, DOI : 10.1007/s10646-017-1830-3
- Pappas, J. L., Kocielek, J. P., & Stoermer, E. F. (2014). Quantitative morphometric methods in diatom research. *Nova Hedwigia*, 143, 281–306. <https://doi.org/10.1127/1436-7270/2014/015>
- Potapova M., Hamilton P.B. (2007). Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. *Journal of Phycology* 43, 561-575. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00332.x>
- Prudhomme, J., Cassan, C., Hide, M., Toty, C., Rahola, N., Vergnes, B., Dujardin, J.P., Alten, B., Sereno, D., Bañuls, A.-L. (2016). Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach. *Parasites & Vectors*, 9(1), 578. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1872-z>
- Woodard, K., & Neustupa, J. (2016). Morphometric asymmetry of frustule outlines in the pennate diatom *Luticola poulickovae* (Bacillariophyceae). *Symmetry*, 8(12), 6–9. <https://doi.org/10.3390/sym8120150>
- Woodard K., Kulichova J., Polackova T., Neustupa J. (2016). Morphometric allometry of representatives of three naviculoid genera throughout their life cycle. *Diatom Research*, 31(3), 231-242. <http://dx.doi.org/10.1080/0269249X.2016.1227375>

Annexes

Annexe 1 : Protocole détaillé des étapes de morphométrie géométrique

Il faut tout d'abord installer les logiciels suivants :

- tpsUtil32 : permet de générer un fichier TPS nécessaire pour utiliser les 2 autres logiciels (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-utility.html>)
- tpsDig232 : permet de placer les points repères
- tpsrelw32 : permet de générer la TPS
- XnView : permet de réaliser le reflet d'une image

Il est important de savoir que sur chaque logiciel, une notice d'utilisation existe en cliquant sur « Help » → « Contents »

Si vous souhaitez faire des choses non expliquées dans ce protocole ou que vous ne savez pas faire une tâche, voici le mail du chercheur ayant créé les logiciels : "f james rohlf" f.james.rohlf@stonybrook.edu. Il répondra à vos questions.

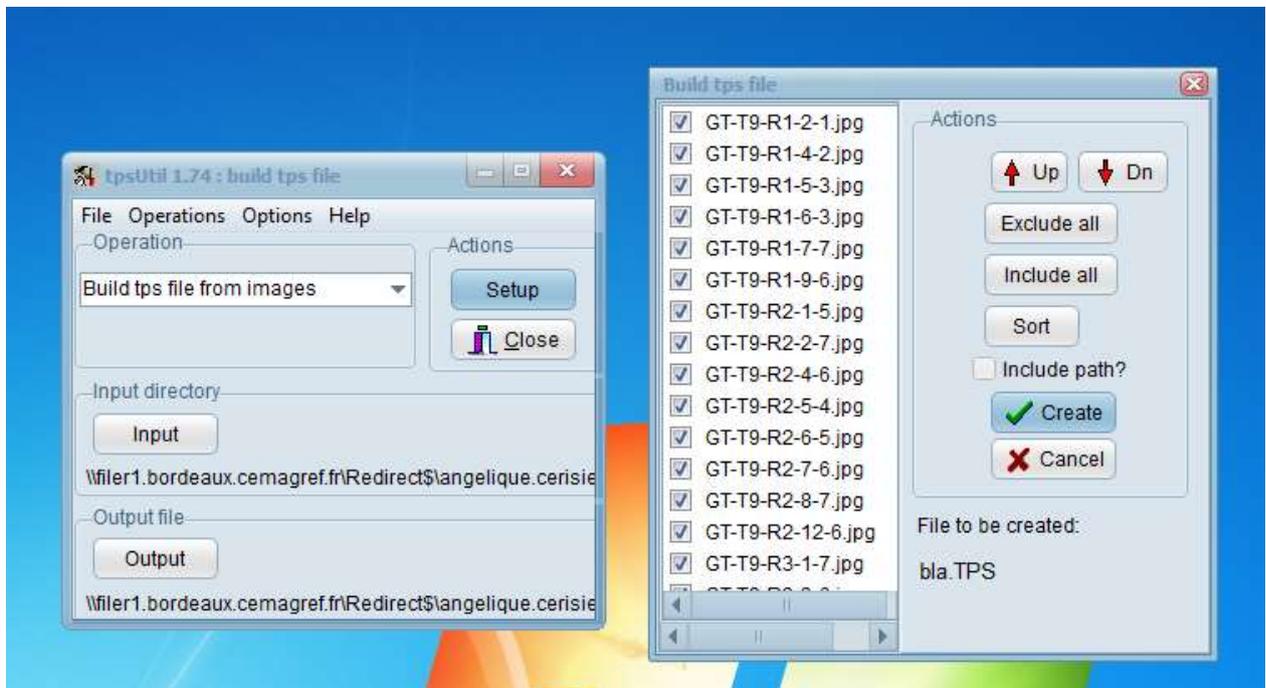
Préalablement à ces logiciels :

- Choisir les photos selon leur qualité
- Renommer les photos de façon à les reconnaître facilement (ex : GT-T1-R1-1-5 ou GT signifie que l'on est face à une diatomée tétratologique, T1 est le temps où la photo a été prise, R1 est le numéro du réplicat, 1 est le numéro de l'individu (si sur une photo il y a plusieurs individus, les photos sont recoupées de façon à n'avoir qu'un individu par photo), 5 est l'indice de déformations.

Utilisation de tpsUtil32 :

- Générer un fichier TPS :

1. Dans l'onglet « select operation », cliquer sur la flèche et sélectionner « build tps file from images »
2. Cliquer sur « input » : permet de choisir la liste de photos sur laquelle on souhaite travailler. Une fois la liste trouvée, double-cliquer sur la première photo de cette liste. La localisation de la liste s'affiche sous cet icône à la place de « Directory = ? ».
3. Cliquer sur « ouput » : permet de générer un fichier «.TPS », il est préférable de le sauvegarder dans le même dossier que la liste de photos (localisation écrite à la place de « File= ? »).
4. Cliquer sur « Setup », une nouvelle fenêtre apparait. Puis cliquer sur « create ». Puis cliquer sur « close » pour quitter tpsUtil32.



ATTENTION : Il est préférable de générer le fichier TPS dans le même dossier que les photos car lors de la modification du fichier TPS avec TpsUtil, les modifications sur les photos pourront être visibles lors de l'ouverture de fichier dans TpsDig.

- **Supprimer des spécimens :**

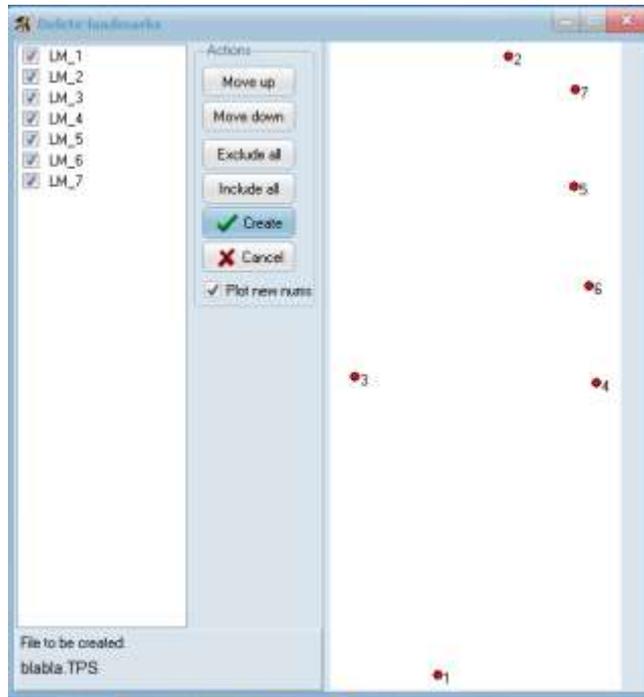
Grace à ce logiciel, il est possible de modifier les spécimens du jeu de données (les supprimer par exemple). Pour cela, dans l'onglet « select operation », cliquer sur la flèche et sélectionner « delete/reorder specimens ». Puis cliquer sur « input » pour choisir le fichier TPS contenant toutes les photos. Puis cliquer sur « output » pour nommer le nouveau fichier sans les photos choisis. Puis, cliquer sur « Setup », la liste des noms des images apparaît, il ne reste plus qu'à décocher les images non voulues dans l'analyse et cliquer sur « Create ».

- **Supprimer des points-repères**

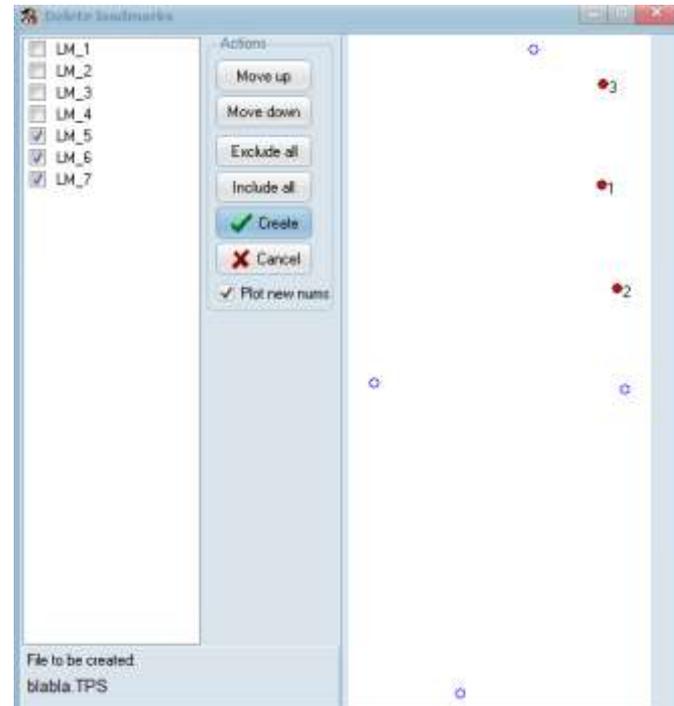
Pour supprimer des points-repères, dans l'onglet « select operation », cliquer sur la flèche et sélectionner « delete/reorder landmarks ». Puis cliquer sur « input » pour choisir le fichier TPS dont vous voulez changer le nombre de points-repères. Puis cliquer sur « output » pour nommer le nouveau fichier contenant des images avec un nombre de points-repères différents du fichier d'origine. Puis, cliquer sur « Setup », l'image de l'individu avec les

points-repères apparaît, il ne reste plus qu'à décocher les points-repères non voulus dans l'analyse et cliquer sur « Create ».

ATTENTION : Il vaut mieux mettre plus de points-repères au départ que pas assez. En effet, on perdra du temps au début mais on en gagnera à la fin en supprimant les points-repères pas utiles à l'analyse.



L'image contient 7 points-repères



L'image ne contient plus que 3 points-repères

- **Générer la liste de noms des photos**

Réaliser cette action peut s'avérer être utile lorsque l'on veut générer un fichier Excel (contenant le nom de chaque individu) avec la position (géoréférencée) des individus sur la lame et donc pouvoir les retrouver facilement. Pour cela, dans l'onglet « select operation », cliquer sur la flèche et sélectionner « list images in tps file ». Puis cliquer sur « input » pour choisir le fichier TPS dont vous voulez avoir le nom des photos. Puis cliquer sur « output » pour nommer le nouveau fichier contenant juste le nom des photos. Puis, cliquer sur « Setup », puis sur « create ». Un fichier Excel contenant seulement les noms est généré.

- **Convertir un fichier NTS en CSV**

A partir de tpsRelw, il est possible de récupérer les coordonnées des points-repères pour réaliser des tests statistiques dessus. Pour cela, une fois le graphique de la TPS généré, cliquer sur file → save → scores.

1,49,28,0,	
, X1, Y1, X2, Y2, X3, Y3, X4, Y4, X5, Y5, X6, Y6, X7, Y7, X8, Y8, X9, Y9, X10, Y10, X11, Y11, X12, Y12, X13, Y13, X14, Y14	
Specimen_1,0,04790	-0,00101 ,0,02453
Specimen_2,-0,00280	0,00026 ,-0,01574
Specimen_3,0,01813	-0,01074 ,-0,00433
Specimen_4,0,01169	0,00608 ,-0,01526
Specimen_5,0,03022	0,00646 ,-0,00258
Specimen_6,0,02070	0,02338 ,-0,00574
Specimen_7,0,01893	-0,04182 ,-0,00189
Specimen_8,0,01309	-0,00306 ,-0,02411
Specimen_9,-0,00236	-0,02103 ,-0,00809
Specimen_10,0,01644	0,00074 ,-0,01853
Specimen_11,0,00917	0,00720 ,-0,00053
Specimen_12,0,02620	-0,03457 ,0,01262
Specimen_13,0,02055	0,01547 ,-0,00990
Specimen_14,0,00776	-0,03784 ,0,00602
Specimen_15,0,02558	-0,01825 ,-0,00246
Specimen_16,-0,01215	-0,02630 ,-0,00842

Numéro du spécimen
qui correspond à ID du
fichier « .NTS »
d'origine

Coordonnées de x pour la
représentation graphique
avec RW1 et RW2

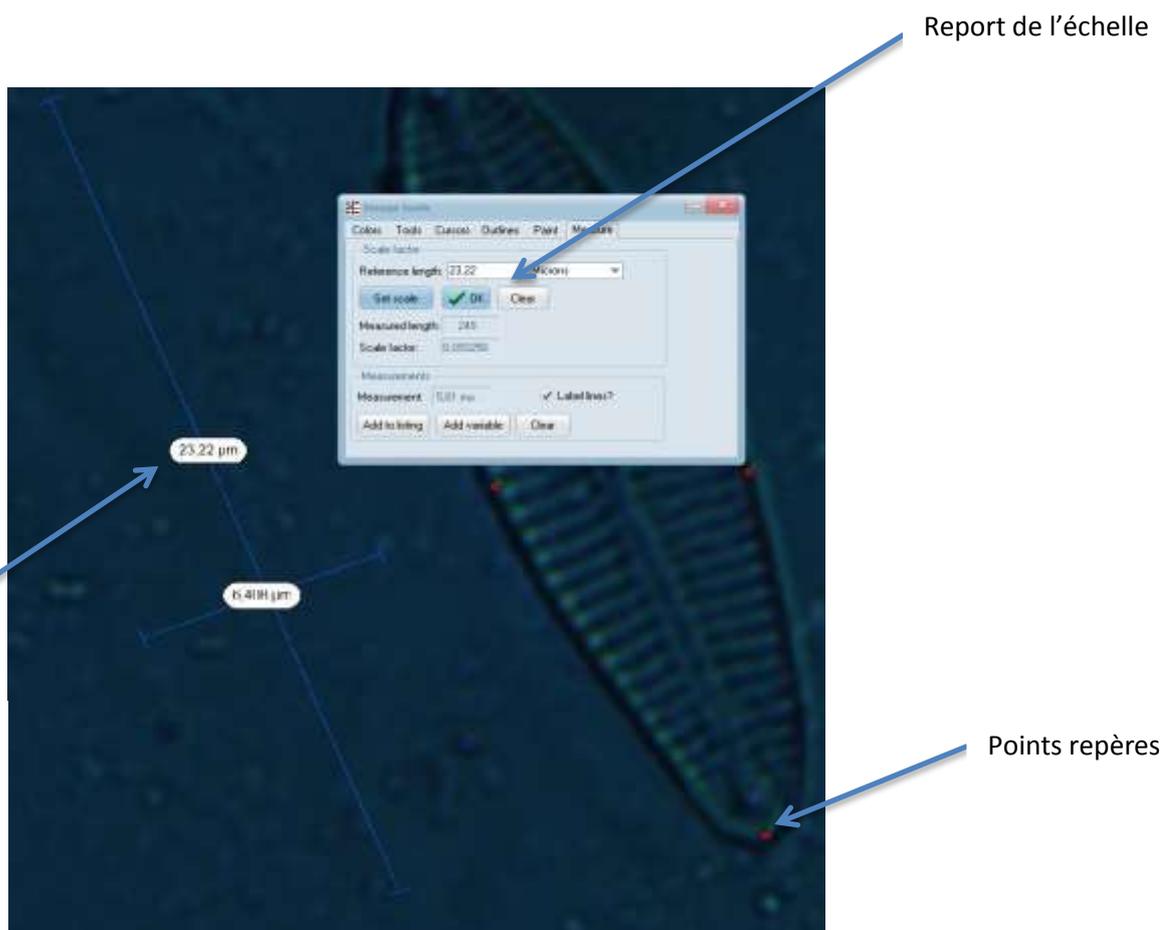
Coordonnées de y pour
la représentation
graphique avec RW1 et
RW2

Utilisation de tpsDig232 :

Une fois le fichier « .TPS » généré, on peut ouvrir tpsDig232.

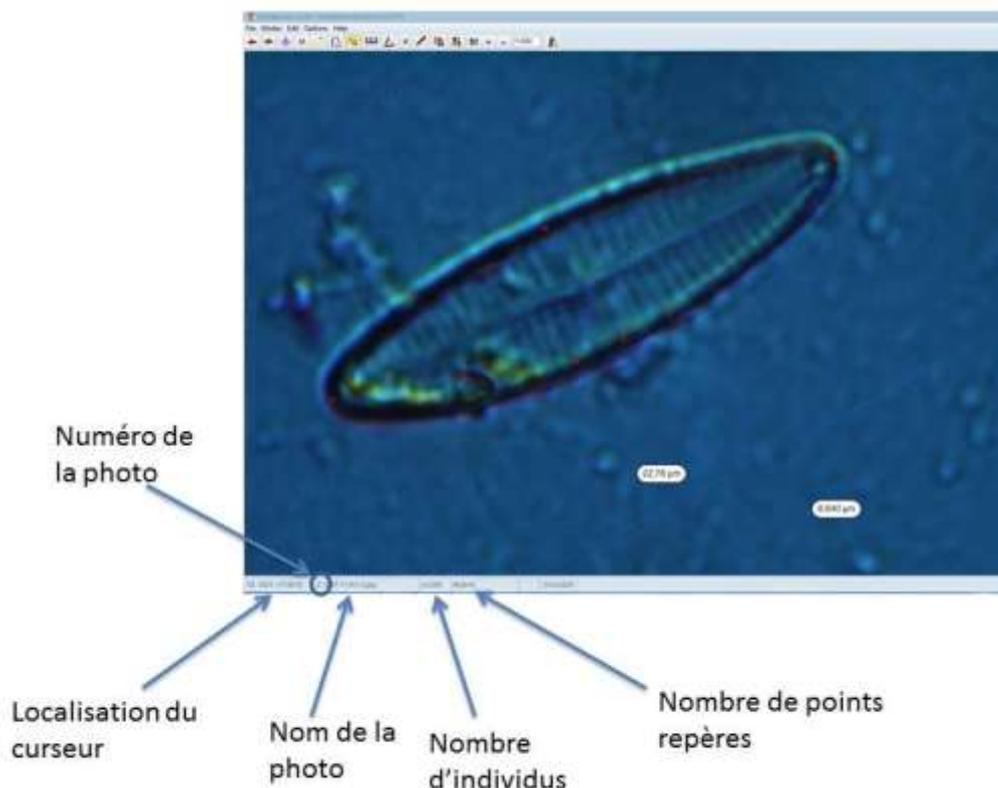
1. Ouvrir tpsDig et ouvrir le fichier « .TPS » avec file → input source → file
2. Mettre à l'échelle l'individu. Cliquer dans l'onglet « options » → « image tools » ou directement sur . Une nouvelle fenêtre apparaît (attention à ne pas la fermer pendant toute l'étude). Cliquer sur l'onglet « mesure ». Cliquer sur « set scale » puis cliquer une fois à une extrémité de l'échelle puis faire glisser le curseur jusqu'à l'autre extrémité de l'échelle. Une fois à l'extrémité, cliquer une fois. Dans la fenêtre, écrire l'échelle de la photo dans « reference length » (ex : mon échelle mesure 23,22 µm, j'écris donc 23,22 µm). Une fois la valeur rentrée, cliquer sur « ok » et ne pas fermer la fenêtre (comme ça, elle s'applique à tous les individus).

ATTENTION : si les photos ne sont pas toutes prises au même objectif, une mise à l'échelle devra être refaite (cela est visible car sans remise à l'échelle, on passe par exemple d'une diatomée mesurant 30 µm à 5µm).



3. Pour déterminer l'emplacement des points repères, il est nécessaire de mesurer la diatomée (utiliser ). Placer les points repères en respectant toujours le même ordre grâce à  (ex : toujours le 1 en haut, le 2 en bas, le 3 à gauche, le 4 à droite etc). Pour être sûr de les placer dans le bon ordre, il est possible de faire apparaître l'ordre dans lequel vous avez cliqué (cliquer une fois sur ). Si vous avez oublié de placer un point repère, vous pouvez utiliser . Si vous n'avez pas respecté l'ordre des points repères, vous pouvez dessiner un point grâce à  sur l'emplacement des points-repères à modifier, puis vous pouvez les supprimer en cliquant d'abord sur  puis en faisant un clic-droit sur le point-repère et cliquer sur « delete landmark ». Si le point repère est mal placé, vous pouvez le faire bouger en utilisant . Si vous ne voyez pas bien ce que vous faites ou si vous ne voyez pas la diatomée entière à l'écran, il existe un zoom  . Une fois les points-repères placés, pour changer d'individu, il faut cliquer sur  .

localisation du curseur : position du curseur par rapport au point zéro en bas à gauche (à droite par exemple 1600 et en haut 1200 pour une photo de 1600 x 1200)



- Une fois tous les points-repères placés sur chaque individu, enregistrer les données (il est préférable d'enregistrer régulièrement). Pour cela, cliquer sur File → save data as... → renommer ou non le fichier → cliquer sur « enregistrer » → une nouvelle fenêtre apparaît et cliquer sur « overwrite ».

Voici à quoi ressemble le fichier « .TPS » (ouvrir par exemple dans bloc note):

```
LM=6
1473,00000 769,00000
1746,00000 1986,00000
1582,00000 1397,00000
1570,00000 1471,00000
1535,00000 1346,00000
1771,00000 1381,00000
IMAGE=GT-T9-R2-5-4.jpg
ID=0
SCALE=0,027806
```

← Nombre de points repères

← Position du point n°1 sur la photo

← Nom de l'image

← Numéro de l'identifiant (**ATTENTION** : il y a toujours un décalage de 1 individu entre le fichier TPS et les points numéroté du graphique de la TPS. Sur le graphique de la TPS, l'ID=0 sera représenté par le point numéroté 1. Il est donc préférable de renommer tous les ID sous blocnote en ajoutant 1 pour permettre de se retrouver plus facilement dans le graphique de la TPS.

← Echelle identique pour tous les individus (sauf s'il y a eu un changement d'objectif)

En revanche, il n'y a pas 1 individu de décalage entre les photos que l'on observe dans TpsDig par rapport au graphique de la TPS généré par TpsRelw

NOTE : Les valeurs d'échelles des microscopes du laboratoire sont les suivantes :

Pour microscope x400 DMLS : Scale = 0,666652

X1000, zoom 2.5, DMRB : Scale = 0,02247

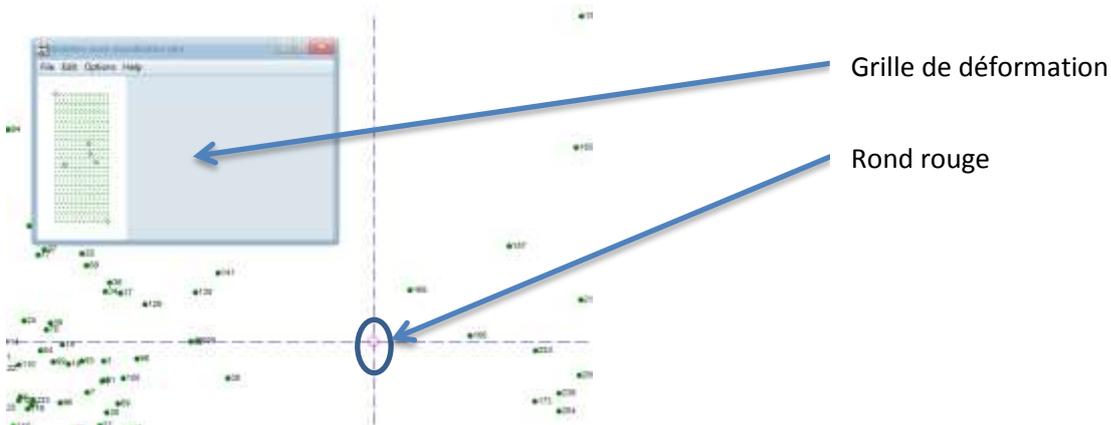
Utilisation de tpsRelw32 :

Une fois le fichier « .TPS » complet, ouvrir le logiciel tpsRelw32.

1. Cliquer sur « data » (récupérer le fichier « .TPS » à analyser)
2. Cliquer dans la partie « compute » sur « consensus », puis « partial warps » et pour finir sur « relative warps ».
3. Cliquer dans la partie « display » sur « relative warps » → le graphique s'affiche



- Pour voir les grilles de déformations des diatomées, cliquer sur . Un petit rond rouge apparaît à l'intersection des 2 axes et donne la grille de déformation associée.



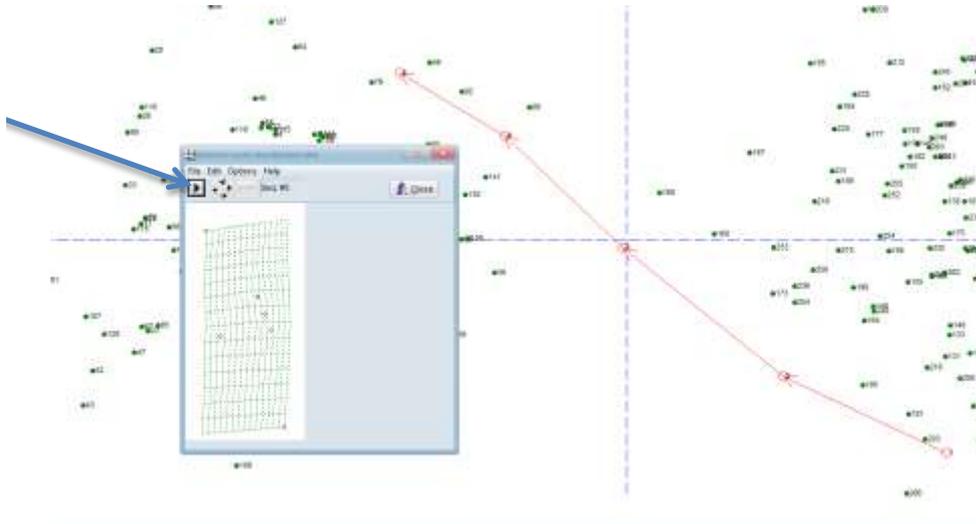
Il est possible de faire bouger ce rond partout sur le graphique en restant cliqué dessus et en bougeant la souris. Dès que l'on relâche la pression, le rond donnera la grille de déformation associée à cette zone du graphique.

De plus, en cliquant sur « Options » → « Vectors », la grille de déformation montre les vecteurs de chaque point-repère permettant de savoir dans quel sens ils bougent au fil de l'axe.



- Il est possible aussi de faire des films. Pour cela, cliquer sur . Une nouvelle fenêtre apparaît. Cliquer sur différentes zones du graphique et appuyer sur le bouton « lecture »

Bouton lecture



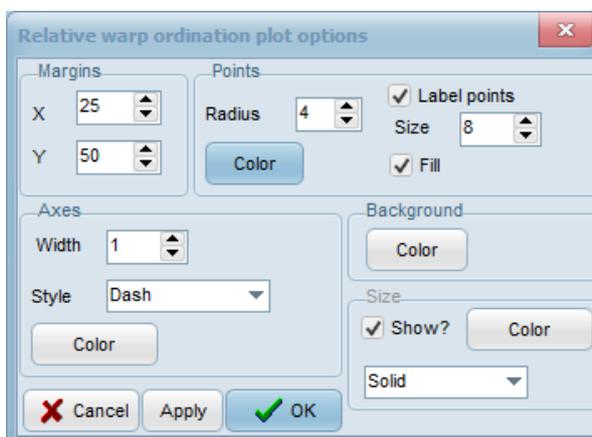
X: 1 Y: 2

- Il est possible de faire varier les axes avec  (X : 1 signifie que X est l'axe de la composante 1)
- Pour connaître le pourcentage d'explication des axes, cliquer sur File → View report :

Singular values and percent explained for relative warps:

No.	SV	%	Cum %
1	1,45686	82,08%	82,08%
2	0,42502	6,99%	89,06%
3	0,33729	4,40%	93,46%
4	0,30674	3,64%	97,10%
5	0,22483	1,95%	99,06%
6	0,10374	0,42%	99,47%
7	0,09097	0,32%	99,79%
8	0,07336	0,21%	100,00%

- Il est possible de changer la couleur de l'ensemble des points, de changer leur taille, de faire apparaître leur numéro ou pas (label points). Pour cela, cliquer droit sur le graphique et une nouvelle fenêtre s'ouvre.



Mise en miroir :

Il est parfois nécessaire de réaliser le reflet d'une image pour qu'elle soit dans le même sens que les autres. En effet, cela est important car sinon, le logiciel détecte seulement que la déformation est à droite ou à gauche de l'individu. Par conséquent, il est préférable (dans la mesure du possible), de savoir de quel côté est la déformation majoritairement.

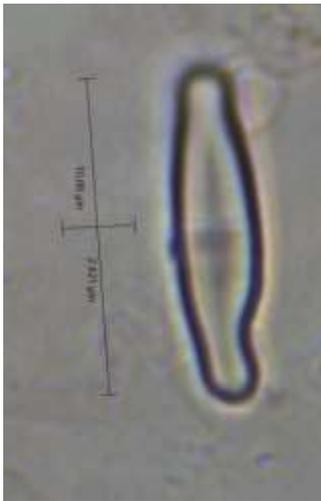
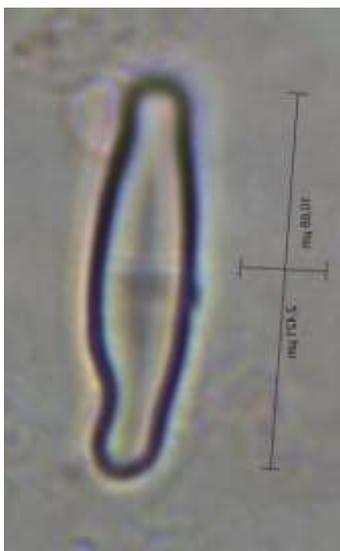


Image d'un individu où la déformation est de l'autre côté



Sens de la déformation dans la majeure partie des cas



Reflet de l'image



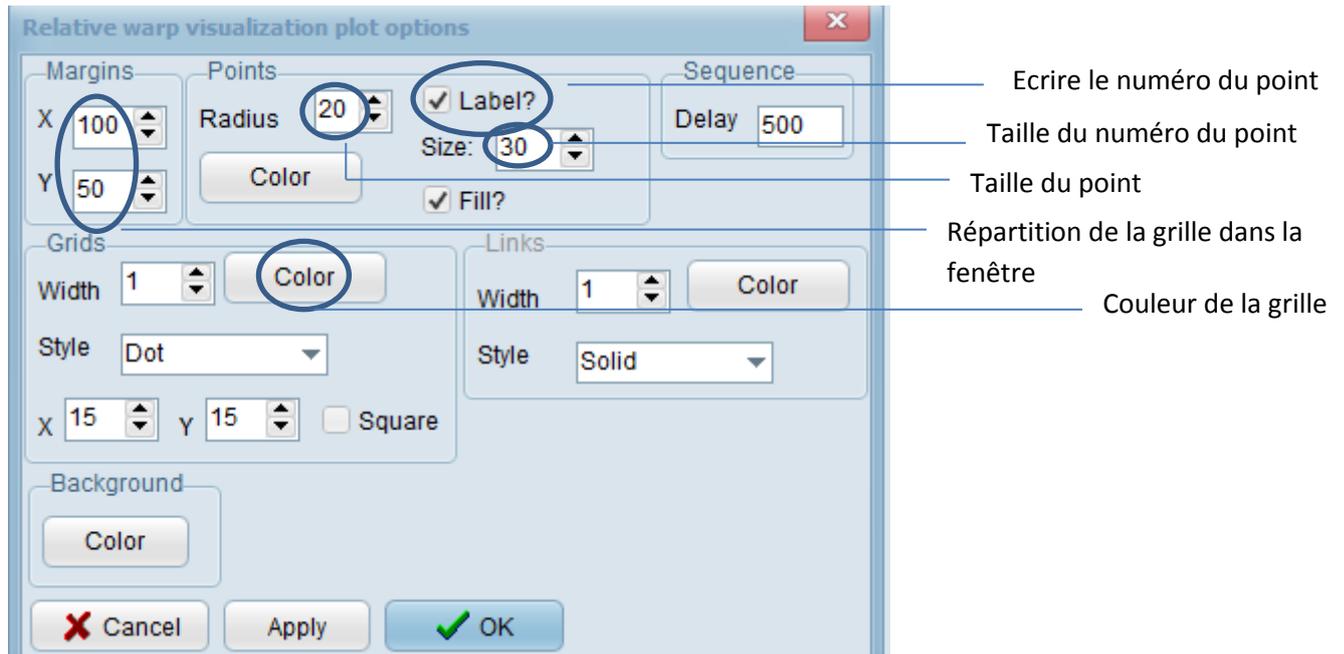
Déformation du même côté



Analyse réalisable

Pour réaliser cette mise en miroir, le logiciel XnView pourra être utilisé. Cliquer sur  (seulement sur la petite flèche) pour choisir « miroir vertical » ou « miroir horizontal » selon l'orientation de la photo. Une fois cela fait, une nouvelle photo est générée. La photo contenant « .xnbak » dans son nom est la photo original à partir de laquelle la mise en miroir a été réalisée (exemple : AVL4-2014-18507-x1000-zoom2.5 → reflet de l'image et AVL4-2014-18507-x1000-zoom2.5.xnbak → photo à partir de laquelle la mise en miroir a été faite).

Changement de couleurs des grilles, tailles des points sur la grille et taille des numéros :



Réglage du microscope DMRB pour prendre les photos :

Pour obtenir des contours corrects :

- Objectif : X100
- Molette au-dessus de l'objectif : B1
- Intensité lumineuse : 10
- Diaphragme :



Pour obtenir une bonne visibilité des stries permettant de connaître le sens de la déformation (côté raphé/pseudo-raphé sur microscope DMRB):

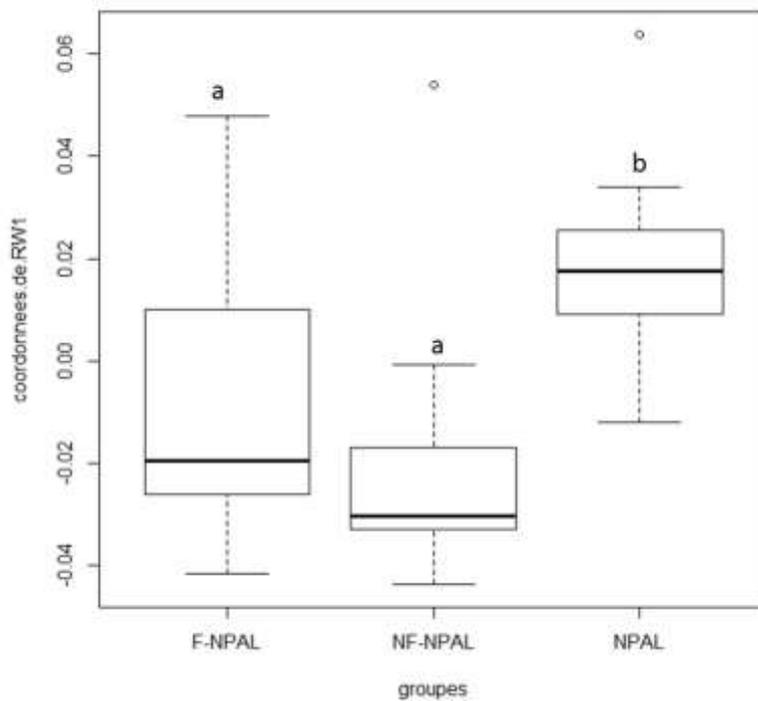
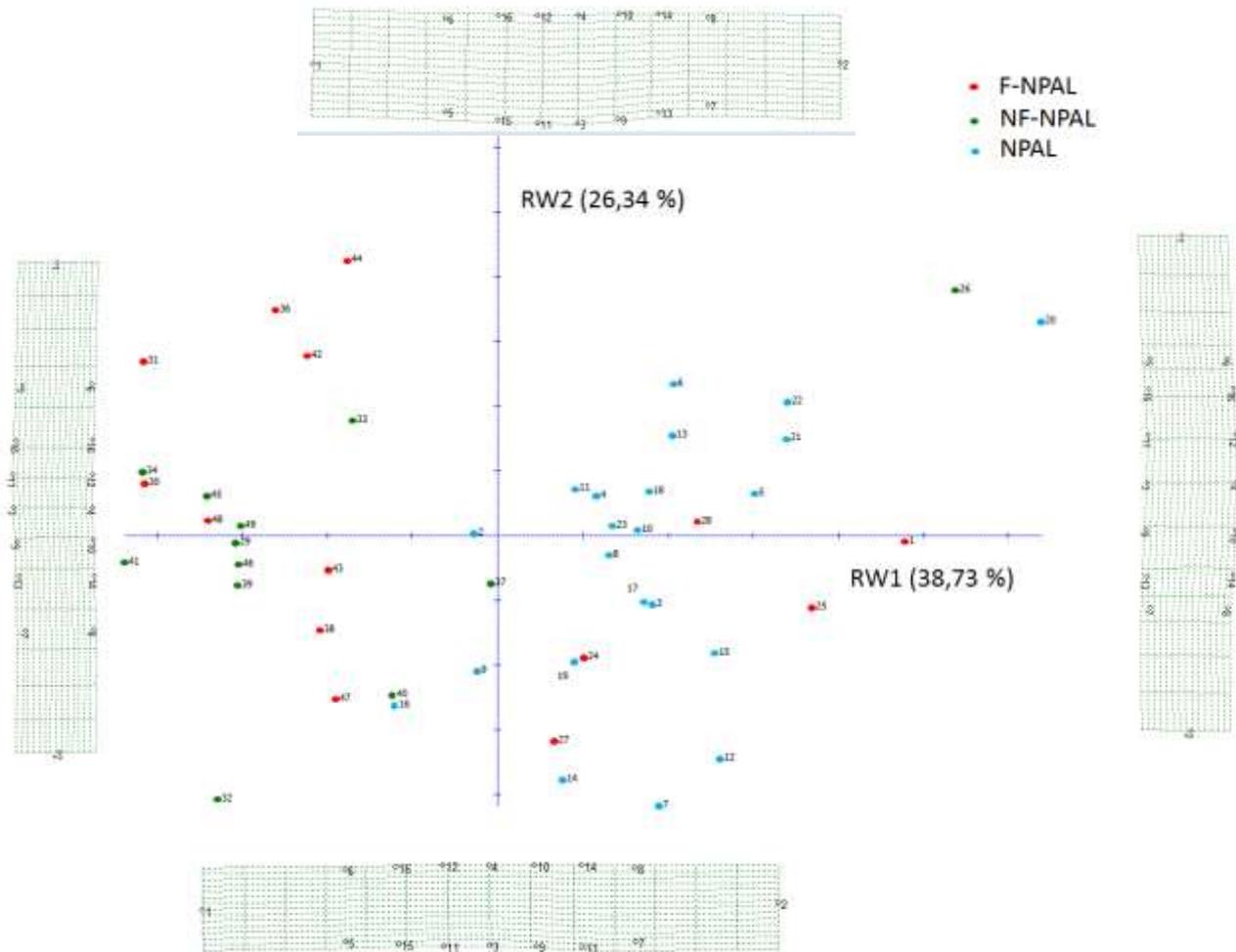
- Objectif : X100
- Molette au-dessus de l'objectif : D avec la buté vers la gauche
- Intensité lumineuse : 10
- Diaphragme :



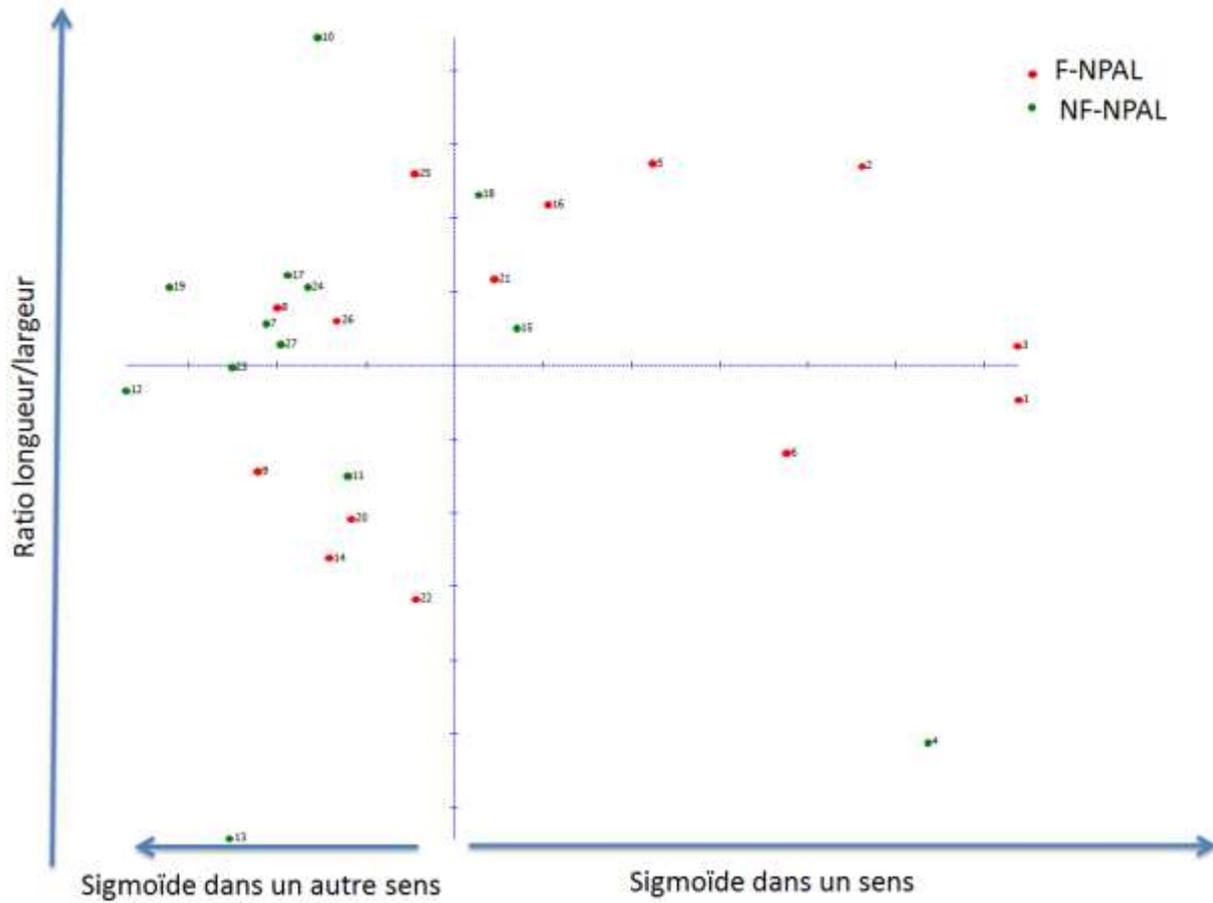
Annexe 2 : Fichiers source

1. dossier Gomphonema → test diatomée déformée+non déformé → test sur T9 12 repères sur 37 ind → fichier TPS : testdiatom12repere
2. Dossier Gomphonema → test deforme+non deforme → test sur l'ensemble diatomées 6 repères → fichier TPS : testdiatom6repere
3. Dossier Gomphonema → travail sur non deforme → GNT+GGRA → fichier TPS : testdiatom6repereGGRA+GNT
4. Dossier Gomphonema → travail sur les diatomées déformées → fichier TPS : test-diatom-6repere
5. Dossier Gomphonema → stat Gomphonema
6. dossier NPAL → Photo NPAL-Isabelle Lavoie → NPAL+NF-NPAL+F-NPAL (résultats...) → fichier TPS : NF-NPAL+NPAL+F-NPAL-12repere où il faut enlever les points-repères pas voulus
7. dossier NPAL → Photo NPAL-Isabelle Lavoie → NPAL+NF-NPAL+F-NPAL (résultats...) → fichier TPS : NF-NPAL+NPAL+F-NPAL-12repere-fibule-a-droite
8. dossier NPAL → Photo NPAL-Isabelle Lavoie → NPAL+NF-NPAL+F-NPAL (résultats...) → fichier TPS : NF-NPAL+NPAL+F-NPAL-16repere-fibule-a-droite
9. dossier A.minutissimum → test sur l'ensemble des diatomées → travail sur déformés + non déformés → fichier TPS : tes-toute-diatome.tps
10. dossier A.minutissimum → dossier test sur l'ensemble des diatomées → travail sur les déformées → fichier TPS : test-toute-diatome-deforme-7repere
11. dossier A.minutissimum → test sur l'ensemble des diatomées → travail sur déformées + non déformées → stat
12. dossier A.minutissimum → choix de l'année → lame x = AVL x → deforme → fichier TPS : test-3reperes-nom de lame-deforme

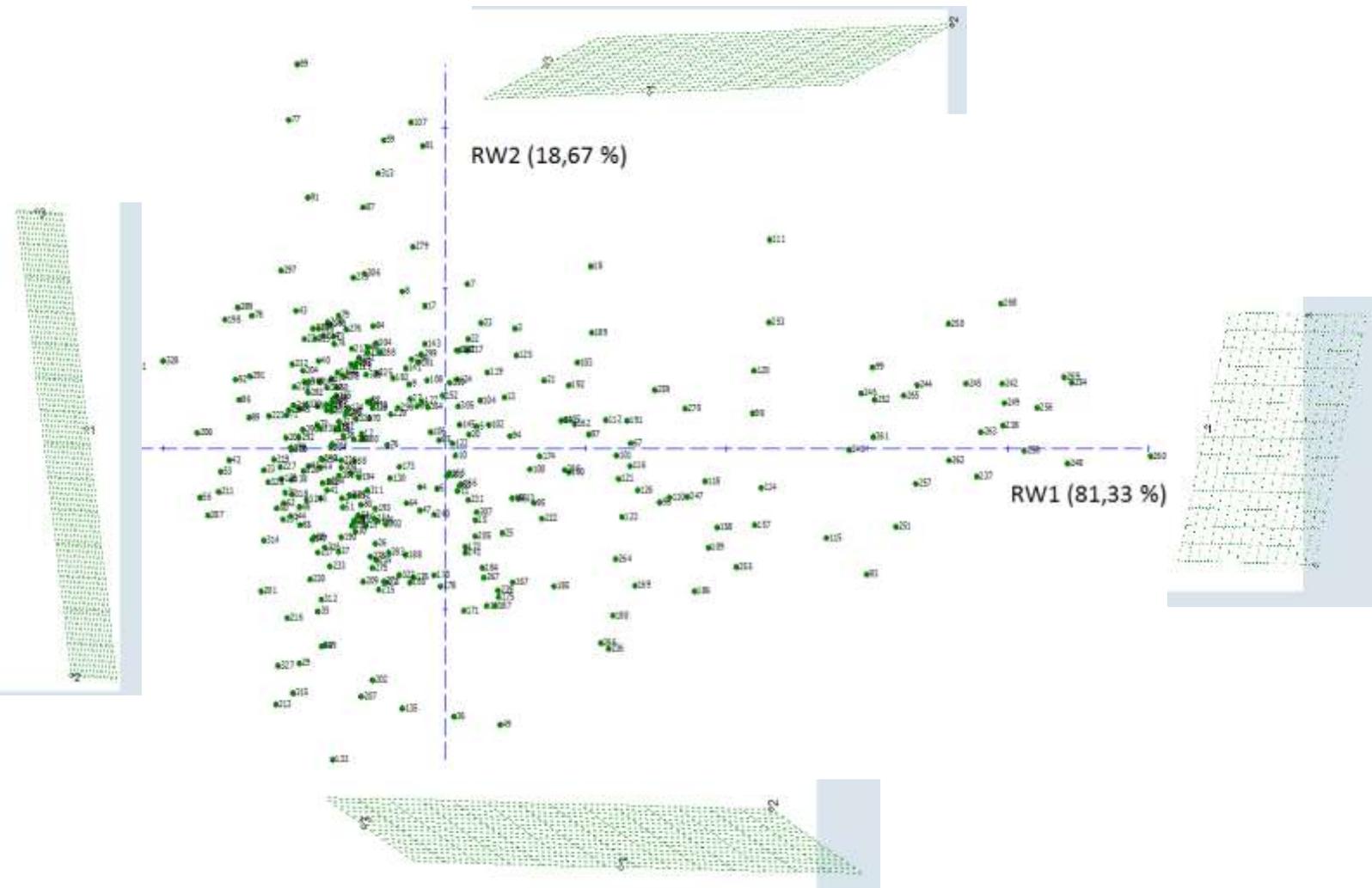
Annexe 3 : TPS représentant les variations de formes chez *Nitzschia palea* lorsque la déformation est toujours placé à gauche (dossier NPAL → dossier Photo NPAL-Isabelle Lavoie → dossier NPAL +NF-NPAL+ F-NPAL (résultat....) → fichier TPS NF-NPAL + NPAL + F-NPAL – 16repere-def...)



Annexe 4 : TPS représentant les variations de formes pour *Nitzschia palea* lorsque la fibule est toujours placées à droite avec 12 points-repères (Dossier NPAL → Photo NPAL-Isabelle Lavoie → Résultats NF-NPAL,F-NPAL, avec fibule à droite → fichier TPS : NF-NPAL+F-NPAL-BOSSE-12repere)

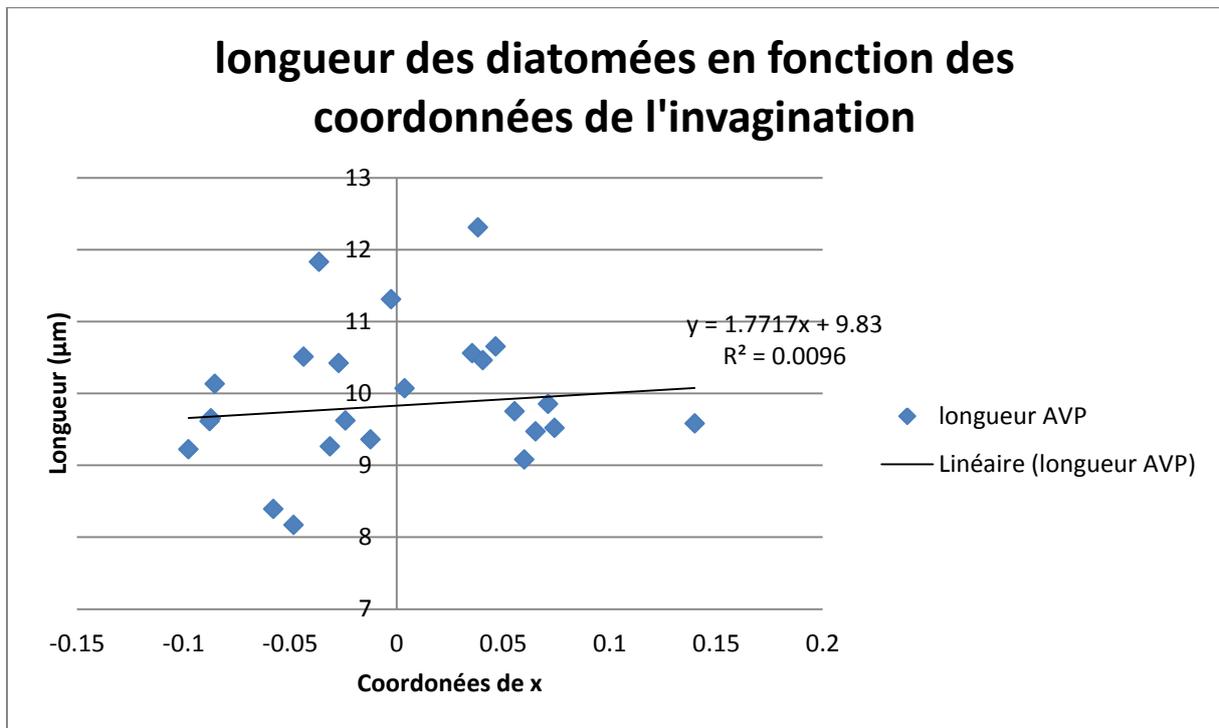


Annexe 5 : TPS représentant les variations de formes de *Achnantheidium minutissimum* déformées avec 3 points-repères (dossier A. minutissimum → dossier test sur l'ensemble des diatomées → dossier travail sur les déformées → fichier test-toute-diatome-deforme-3repre).

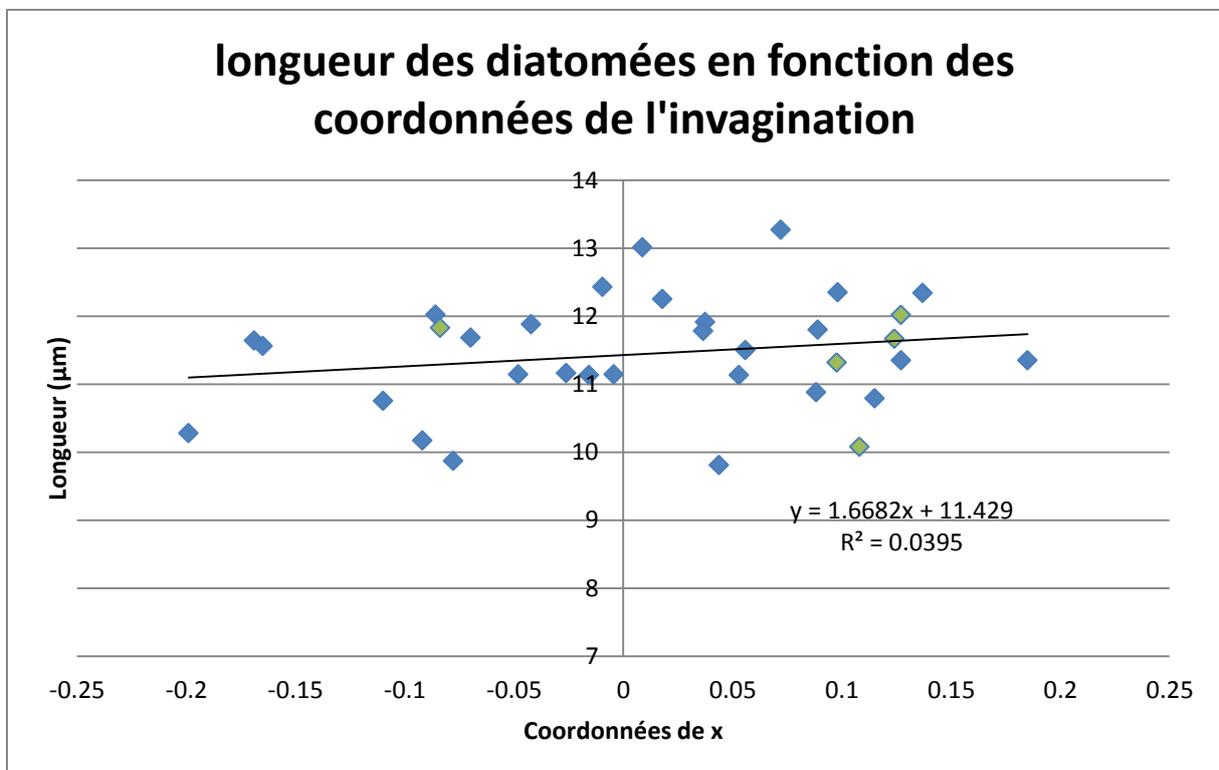


Sur ce graphique, l'axe 1 explique à 81.33 % l'invagination tandis que l'axe 2 explique à 18,67 % le placement du point 1.

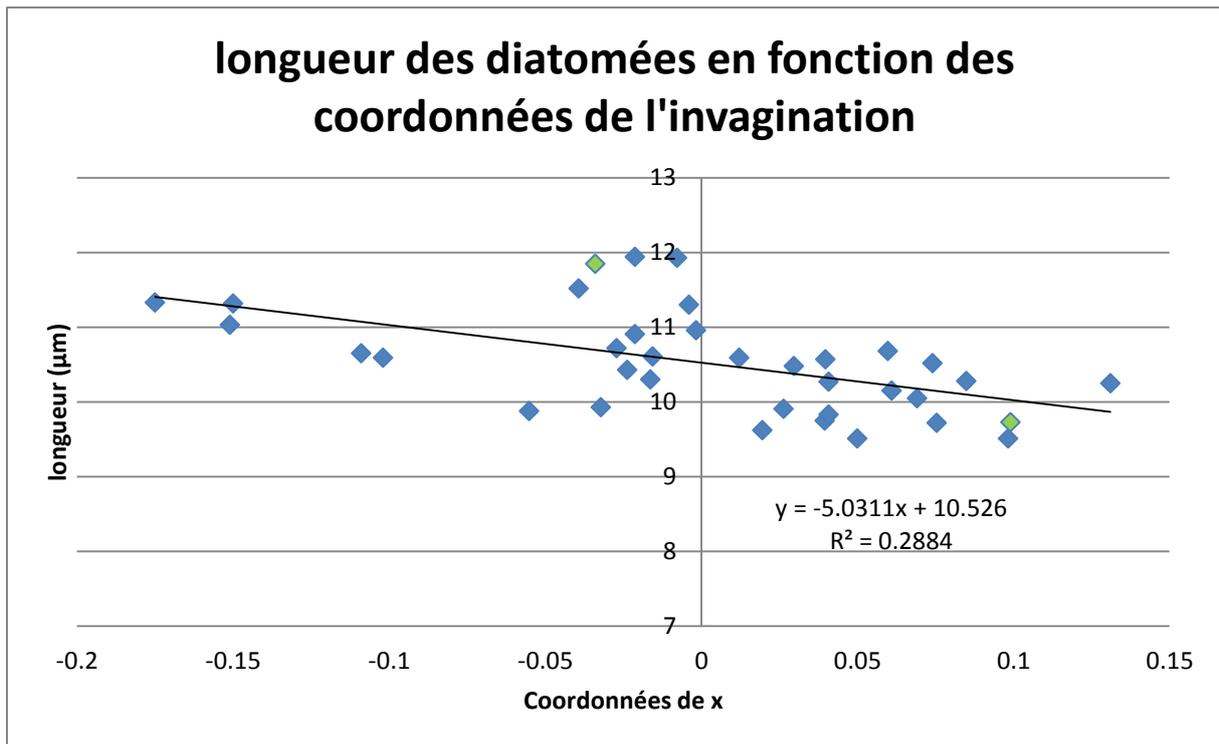
Annexe 6. Relation entre longueur des diatomées (*Achnantheidium minutissimum*) et coordonnées de l'invagination (sur la TPS présentée en Annexe 5) sur l'axe des abscisses, année par année. Les sites AVP et AVL sont figurés par des couleurs différentes.



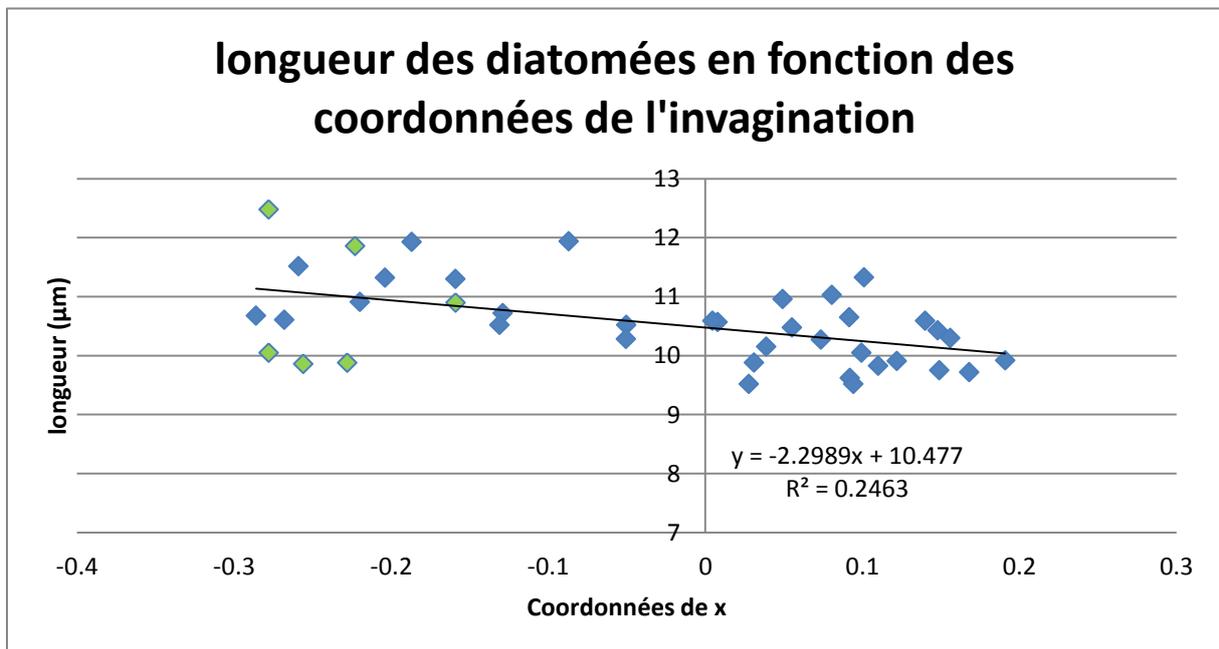
Graphique représentant la longueur de la diatomée en fonction des coordonnées de x en 2009 (pas de relation statistique, n=25, p-val = 0,64)



Graphique représentant la longueur de la diatomée en fonction des coordonnées de x en 2012, tous sites confondus (pas de relation statistique, n=34, p-val = 0,26)



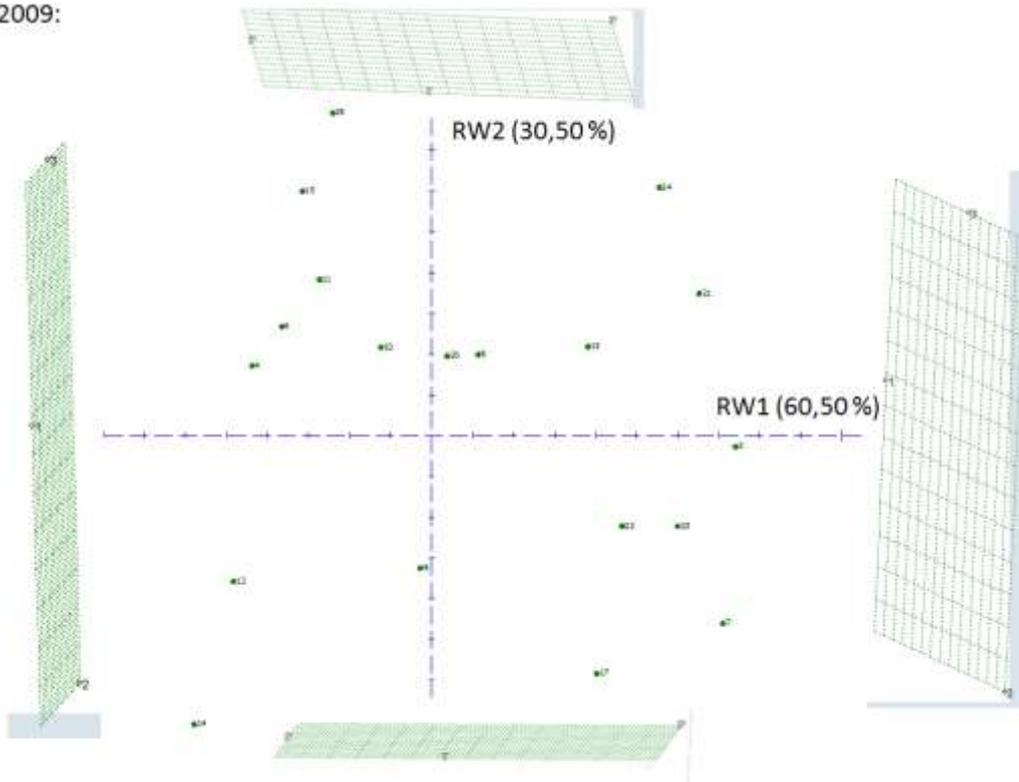
Graphique représentant la longueur de la diatomée en fonction des coordonnées de x en 2013 (relation statistique, p-val = 0,0007)



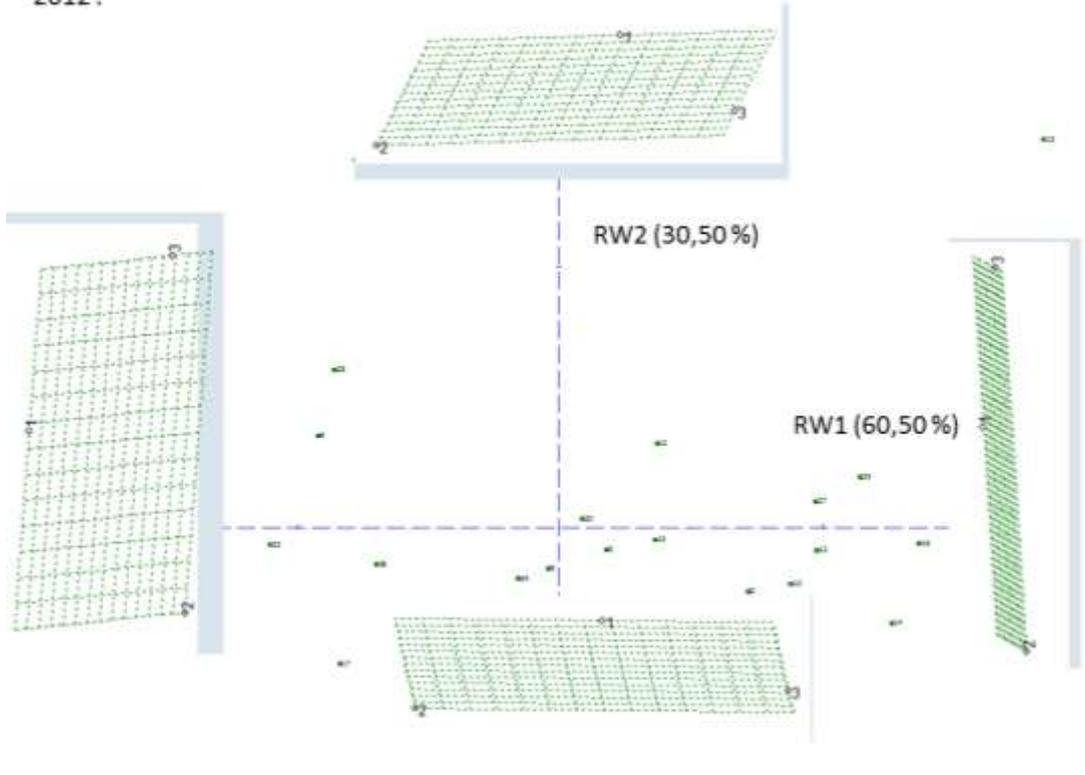
Graphique représentant la longueur de la diatomée en fonction des coordonnées de x en 2014 tous sites confondus (relation statistique, p-val = 0,001)

Annexe 7 : TPS représentant *A.minutissimum* déformées caractériser par 3 points-repères (Dossier A.minutissimum → test sur l'ensemble des diatomées → travail sur les déformées → Résultats A.minutissimum AVL deforme avec 3 reperes par années.) (chaque fichier TPS ayant permis de faire cette analyse se situe dans les dossiers nommés par année puis dans le dossier AVL (et AVP pour 2009) puis déformé et les fichiers TPS s'appelle test-3reperes-nom de la lame-deforme

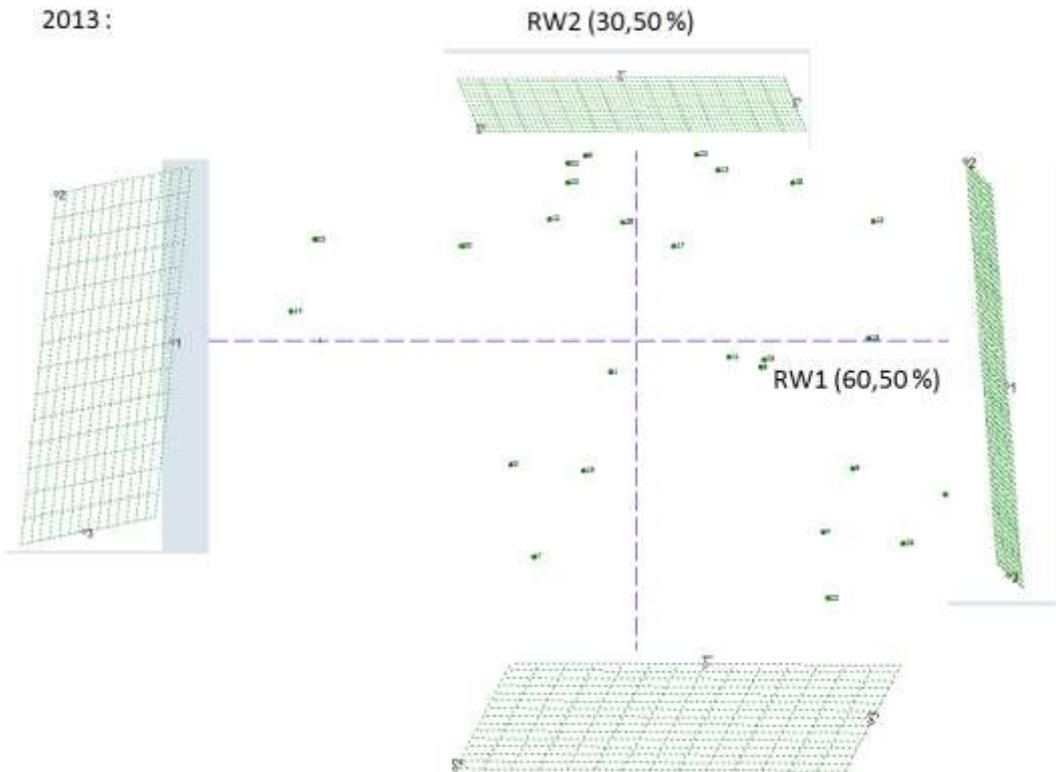
2009:



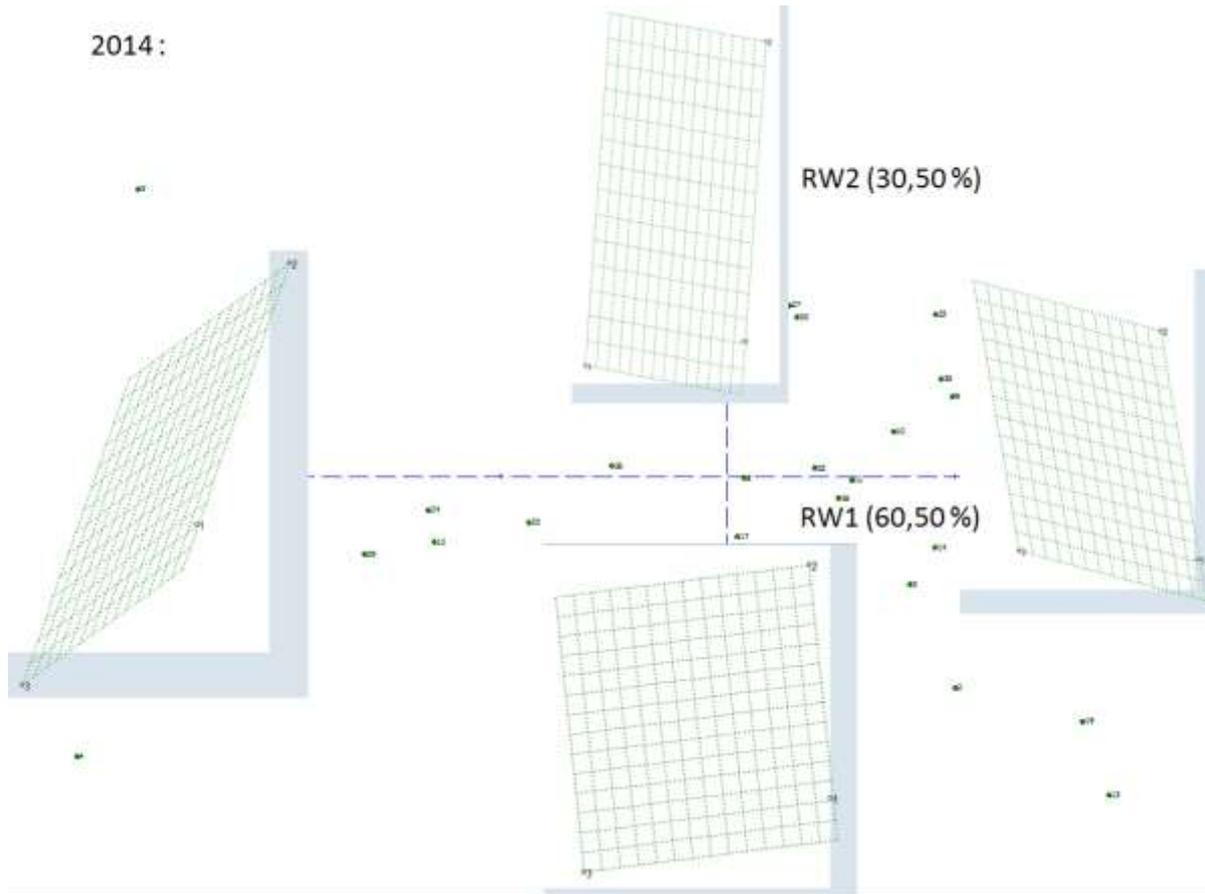
2012 :



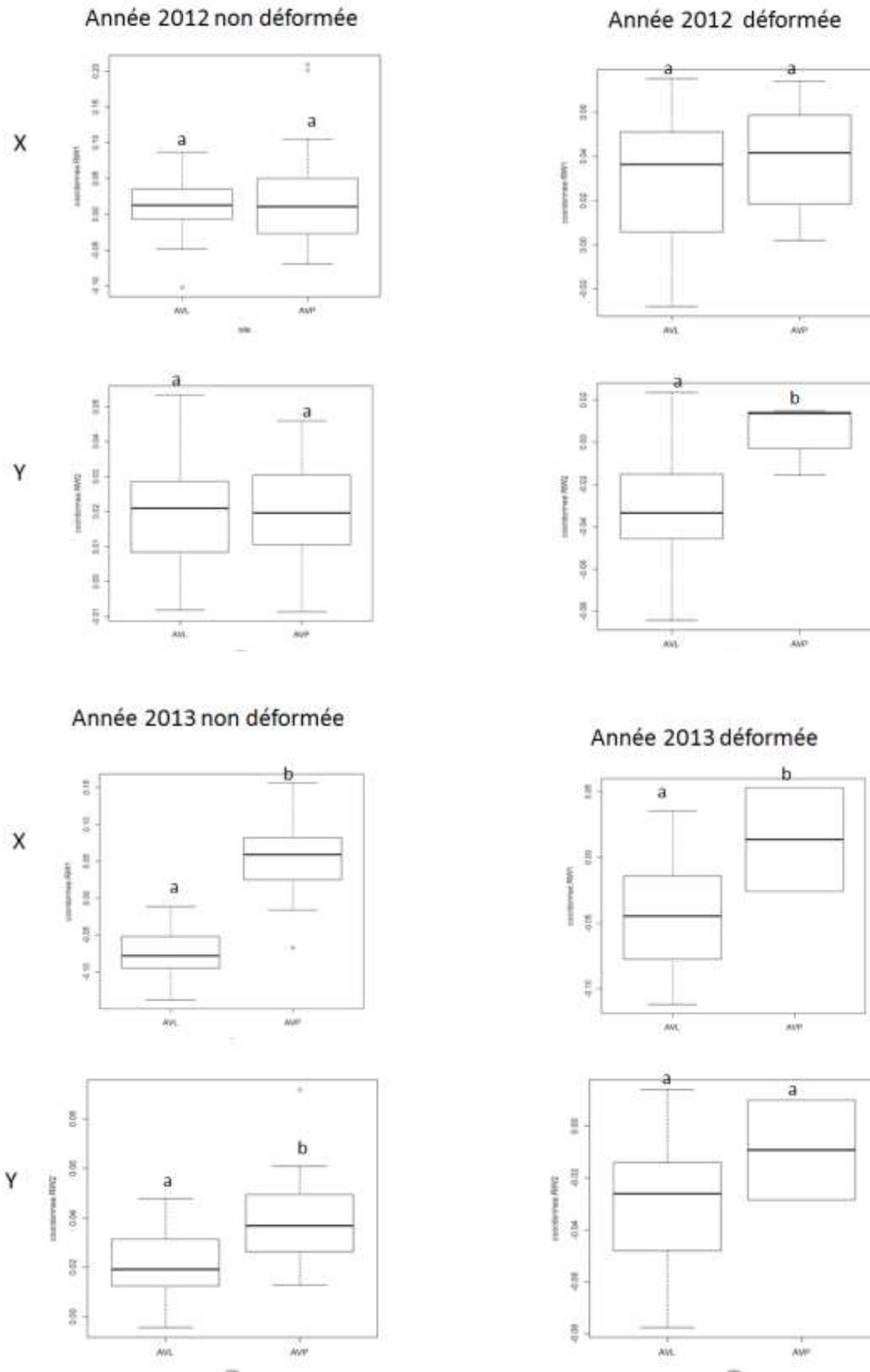
2013 :



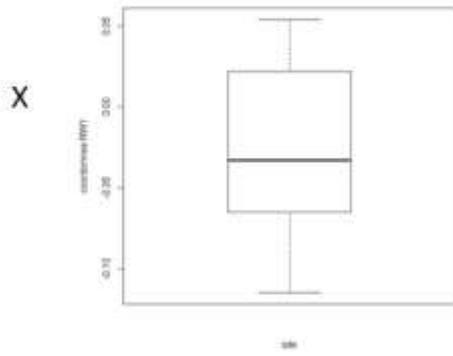
2014:



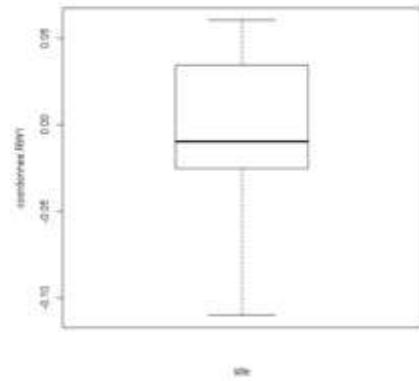
Annexe 8 : Boxplots des coordonnées de x ou de y selon les sites et par années pour *A.minutissimum* (les coordonnées ont été obtenus à partir des graphiques de TPS mélangeant les individus déformés et non déformés par années. Dossier A.minutissimum → dossier test sur l'ensemble des diatomées → dossier travail sur déformées + non déformées → stat → fichier ppt : Coordonnee RW1+RW2 selon AVP-AVL pour toutes les années)



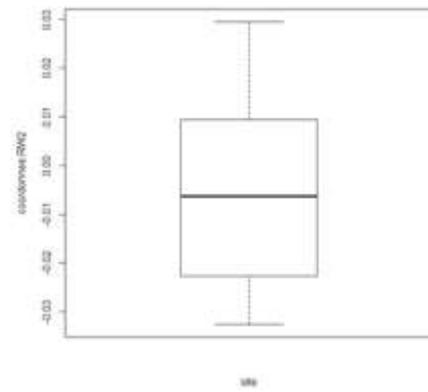
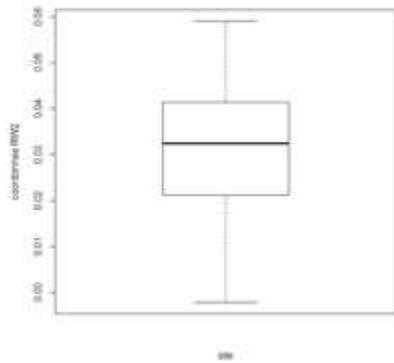
Année 2009 non déformée



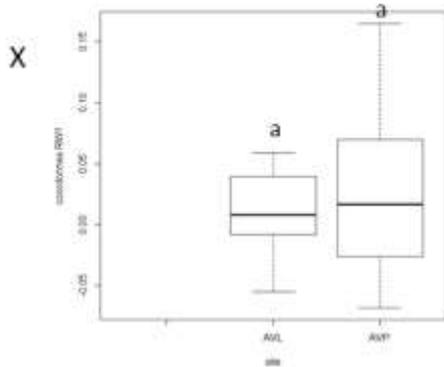
Année 2009 déformée



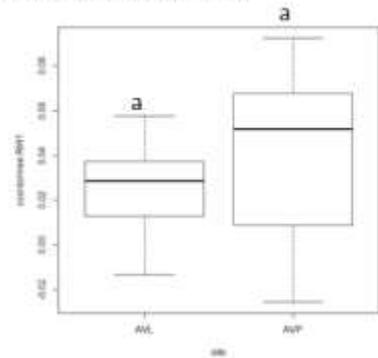
Y



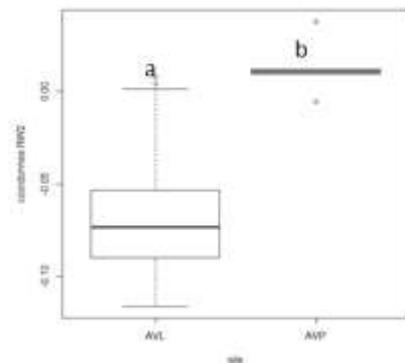
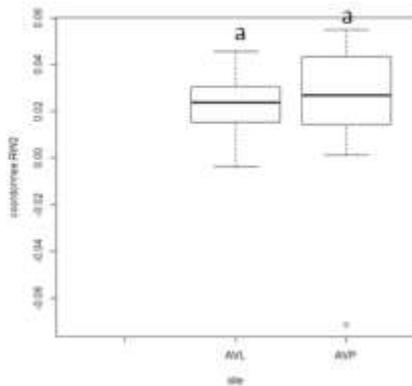
Année 2014 non déformée



Année 2014 déformée



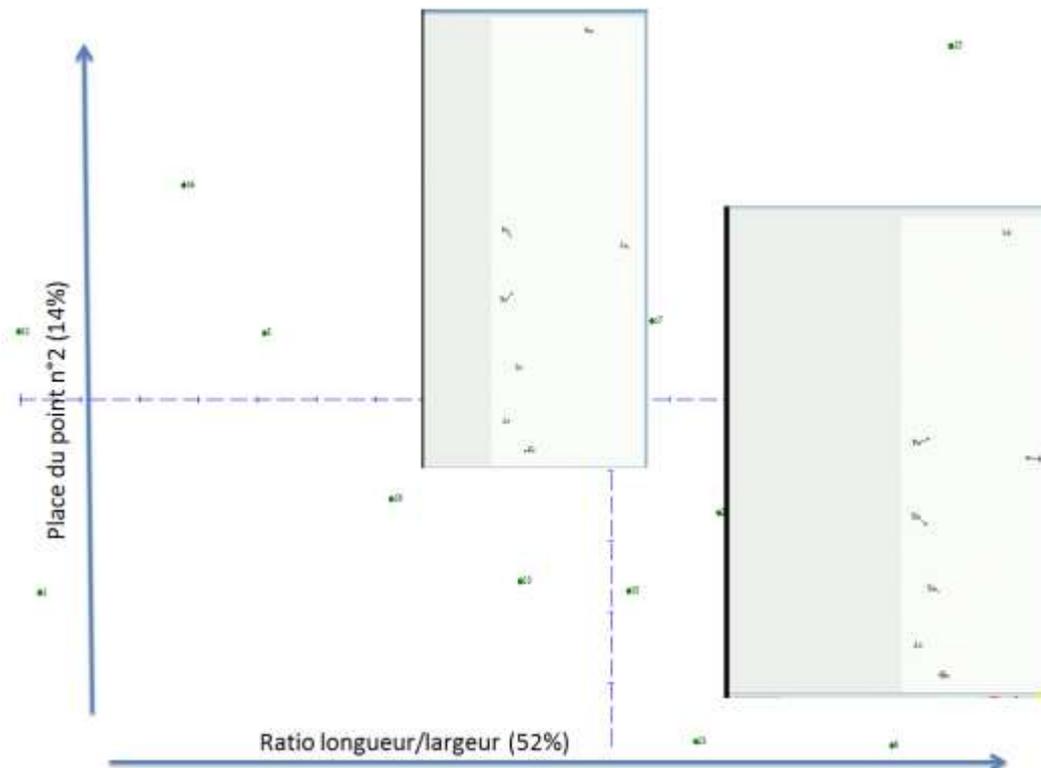
Y



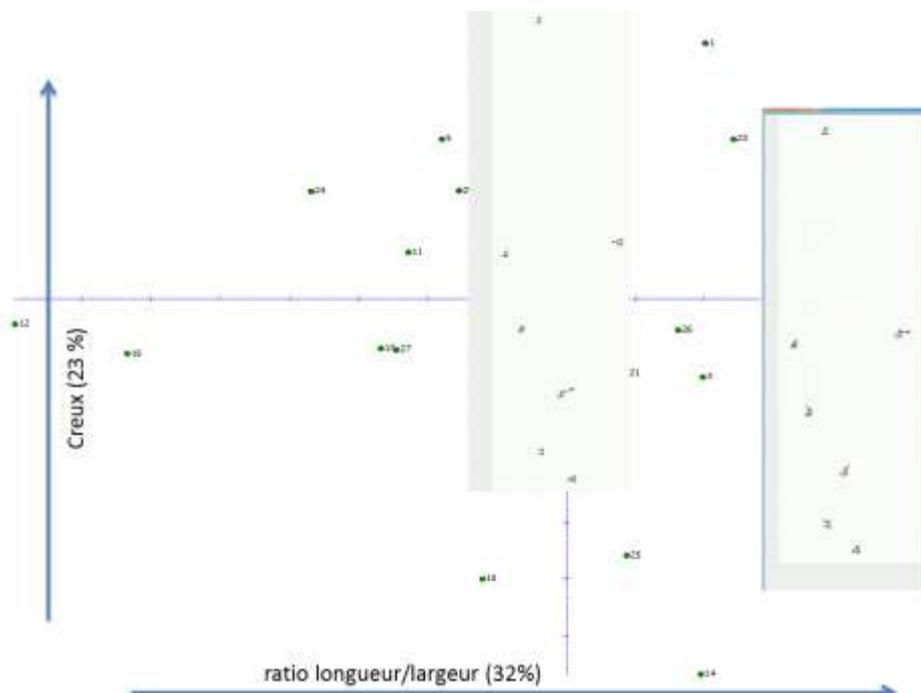
Annexes ci-après non citées dans le rapport

Annexe 9 : TPS représentant les variations de formes pour *A.minutissimum* par années sur les individus déformés avec 7 points-repères (Pour refaire ces TPS, dossier *A.minutissimum* → choix de l'année → déformé → fichier : test-7reperes-nom de lame + année-deforme.tps). Les images des axes sont des images animées, pour les voir, il suffit d'aller voir le diaporama se situant dans le même dossier). Il existe aussi des fichiers qui regroupent les diatomées déformées + non déformées par années (dossier *A.minutissimum* → choix de l'année → fichier TPS : test_nondeforme+deforme_nom de la lame.tps)

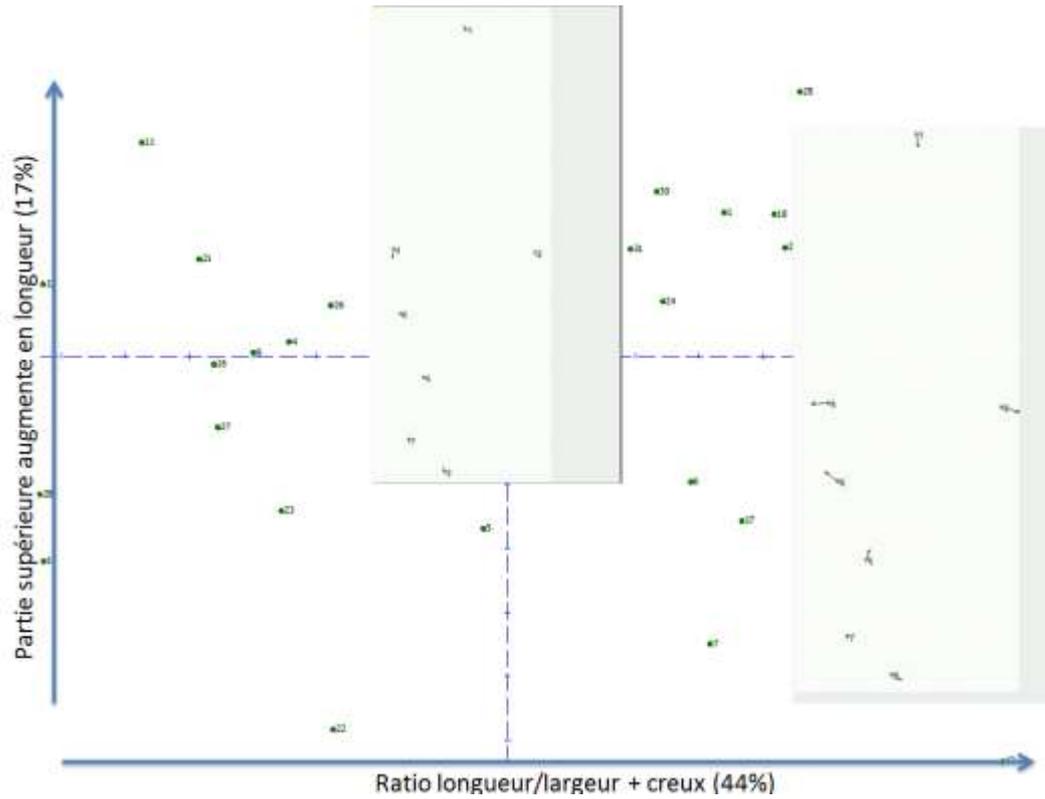
- **Année 2009 :**



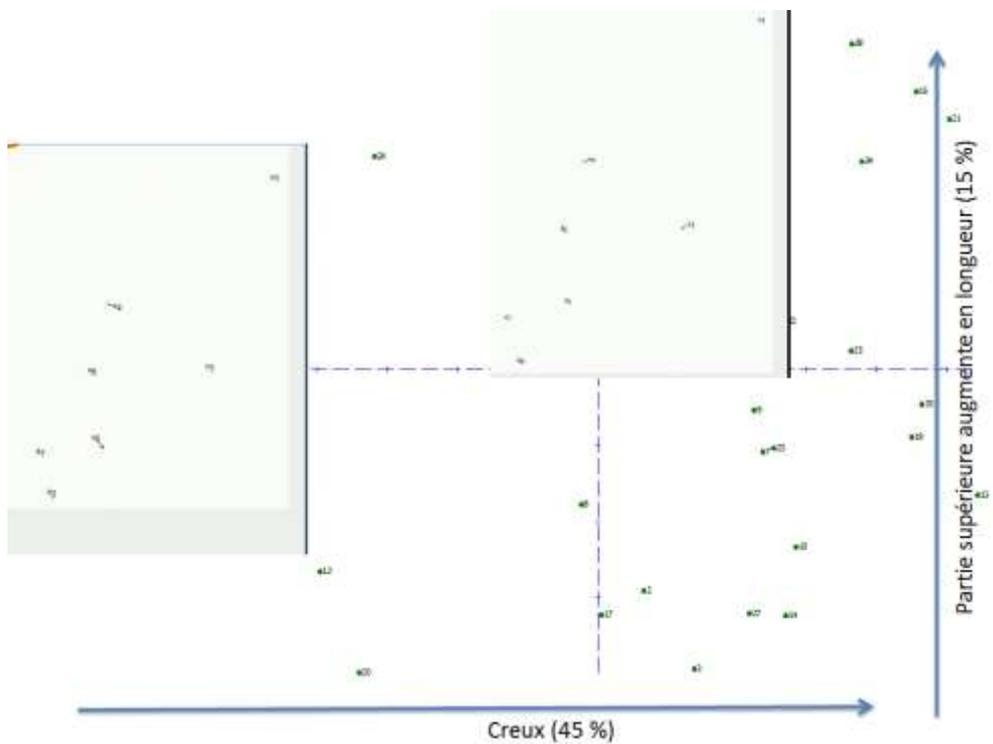
- **Année 2012 :**



- Année 2013 :

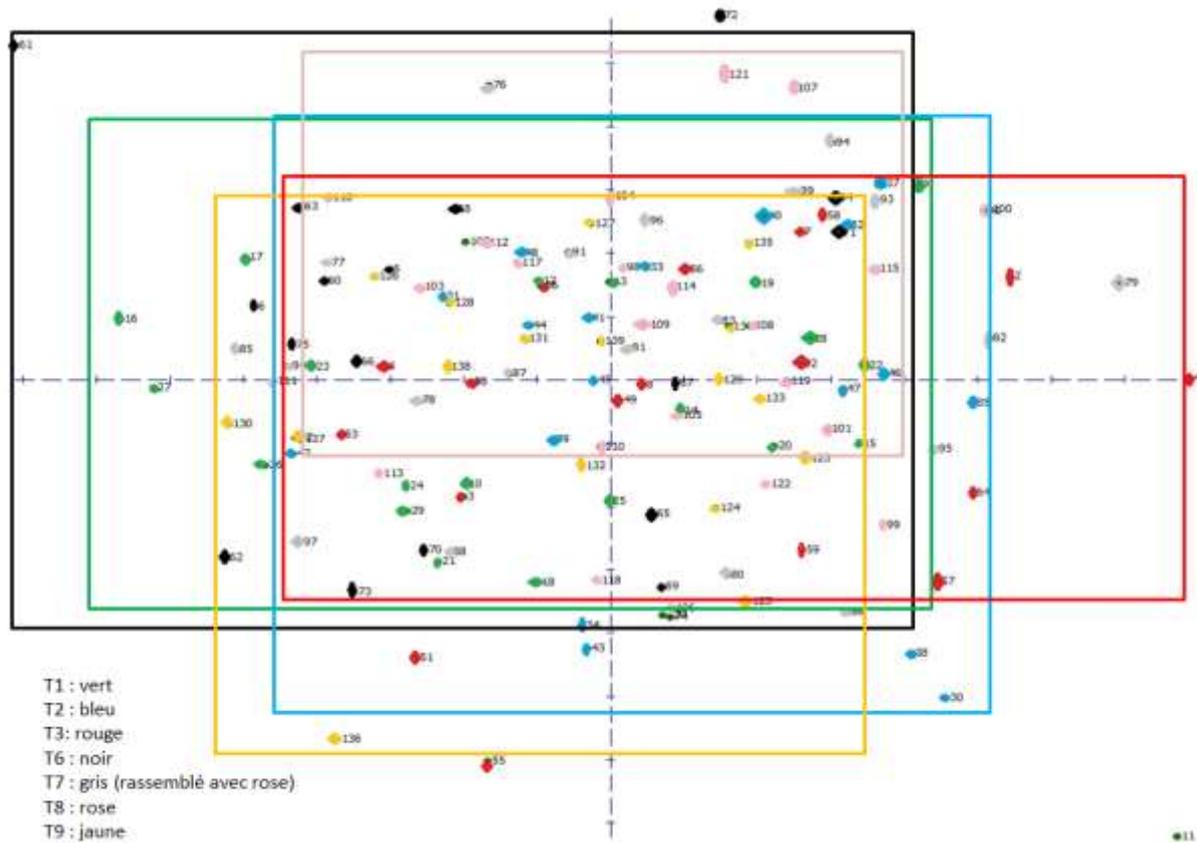


- Année 2014 :

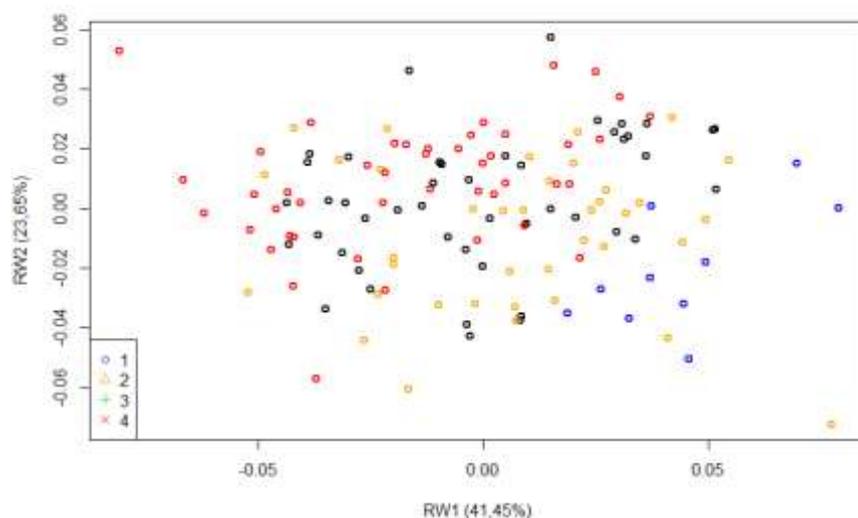


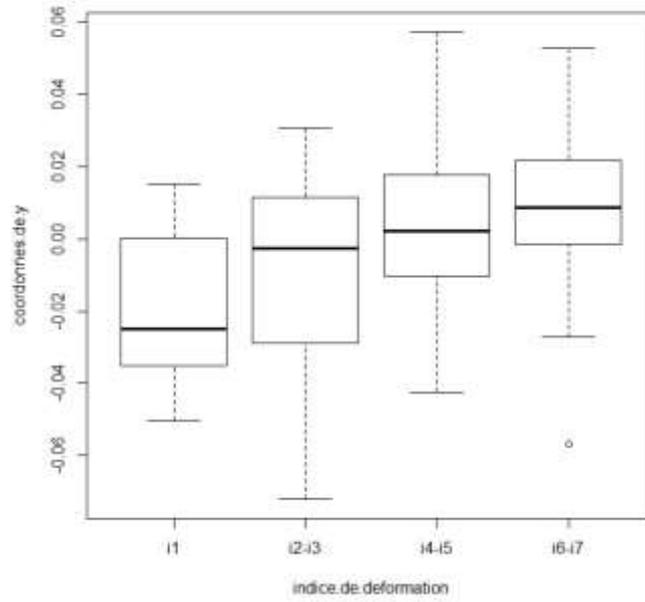
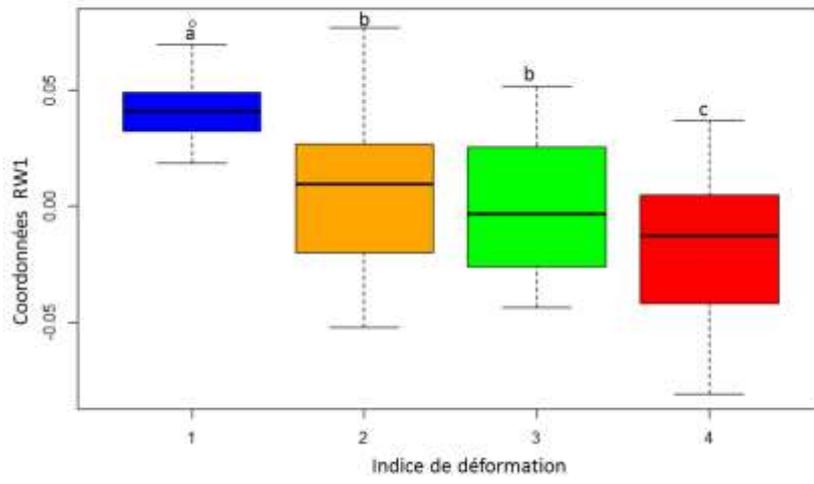
Annexe 10 : Résultats Gomphonema pas mis dans le rapport

- Influence du temps (Dossier Gomphonema → travail sur les diatomées déformées)



- Réalisation d'un test pour vérifier l'hétéropolarité (dossier Gomphonema → test hétéropolarité sur GNT...)
- Réalisation d'un test pour voir si le logiciel pouvait séparer GNT+GT+GGRA (Dossier Gomphonema → Test GGRA+GNT+GT)
- Réalisation d'un graphique où on passe de 7 groupes de déformation à seulement 4 (Dossier Gomphonema → stat morpho ou stat Gomphonema--> plot indice de déformation selon 4 groupes : $i_1 + i_2 - i_3 + i_4 - i_5 + i_6 - i_7$) avec les coordonnées de x et de y en fonction des 4 groupes





Résumé

Le pourcentage de déformations des diatomées est de plus en plus utilisé comme un indicateur de stress toxique dans les cours d'eau. Cependant, ce pourcentage ne permet pas de quantifier directement l'importance de ce stress, et certains auteurs suggèrent que la quantification de la « sévérité » des déformations pourrait améliorer les relations de cause à effet.

Dans cette optique, nous avons testé l'applicabilité de la morphométrie géométrique pour évaluer l'intensité de déformation chez différents spécimens de diatomées déformées. Cette méthode a pour but d'étudier des variations subtiles de formes et a été utilisée dans le but de mettre en évidence un gradient de déformations chez les diatomées. Sur la base de microphotographies d'individus normaux et déformés, le positionnement des points-repères a été optimisé, puis la méthode de superposition de Procruste a été utilisée pour mettre en évidence les variations morphologiques, en s'affranchissant des différences de taille, d'orientation mais aussi de position.

Les résultats de ces analyses montrent l'efficacité de la méthode pour discriminer les individus normaux et déformés, avec un nombre limité de points-repères (6). A partir des caractéristiques morphométriques des individus déformés, la méthode permet de mettre en évidence un gradient de déformations au sein des individus déformés, en concordance avec une classification préalable de la sévérité des déformations réalisée visuellement. De plus, elle permet de mettre en évidence une relation entre l'intensité d'une pression toxique du milieu et les déformations des diatomées face à ce stress.