



HAL
open science

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

Angélique Cerisier

► **To cite this version:**

Angélique Cerisier. Application de la morphométrie géométrique à l'évaluation de la sévérité des déformations chez les diatomées. Sciences de l'environnement. 2017. hal-04353239

HAL Id: hal-04353239

<https://hal.inrae.fr/hal-04353239>

Submitted on 19 Dec 2023

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

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

CERISIER Angélique

Master Ecotoxicologie et Chimie

De l'Environnement

M1

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



Photographie de *Gomphonema gracile* déformée prise au microscope électronique à balayage (© Coste/PLACAMAT, 2015)

Mme MORIN Soizic / Mr VEDRENNE Jacky
Irstea
Equipe CARMA
(Contaminants Anthropiques
et Réponses des Milieux Aquatiques)
50, Avenue de Verdun
33612 GAZINET-CESTAS

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier Monsieur Frédéric SAUDUBRAY, directeur régional du Centre Irstea de Bordeaux qui a accepté que je réalise le stage dans ce laboratoire. Puis, je souhaiterais remercier Madame Juliette ROSEBERY, responsable de l'équipe CARMA, qui a permis mon recrutement pour réaliser ce stage. Les deux autres personnes que je souhaiterais remercier sont Madame Agnès FEURTET-MAZEL et Madame Nathalie GENESTE, les directrices du Master Ecotoxicologie et Chimie de l'environnement, qui ont contribué à la signature de la convention de stage.

Ensuite, je souhaiterais remercier Madame Soizic MORIN et Monsieur Jacky VEDRENNE qui ont été mes maîtres de stage durant ces 4 mois. Ils ont toujours été présents lorsque j'avais des difficultés, ils m'ont encadrée, soutenue mais aussi appris l'autonomie. Ils m'ont aussi permis de réaliser d'autres tâches en parallèle de mon stage afin que je découvre au mieux le laboratoire et que je puisse m'orienter professionnellement. Je souhaiterais remercier aussi Monsieur Sébastien BOUTRY qui m'a aidé lors de l'analyse statistique. Pour finir, je souhaiterais remercier Madame Julie NEURY-ORMANNI, réalisant une thèse sur la méiofaune, car j'ai pu l'aider dans la réalisation de ces expériences. De plus, elle m'a fait découvrir de nombreuses techniques de laboratoires (que ce soit en chimie ou en biologie). Sans toutes ces personnes, le stage ne se serait pas passé de la même façon, par conséquent je les en remercie.

SOMMAIRE

Introduction	1
I. Matériels et Méthodes.....	2
1. Le modèle biologique : la diatomée <i>Gomphonema gracile</i>	2
2. Conditions de culture des diatomées et dates d'échantillonnage	3
3. Méthodes de préparation des diatomées et acquisition des photographies	3
4. Méthodes de morphométrie géométrique et évaluation de la sévérité de déformations	4
II. Résultats et Discussion.....	5
1. Mise en place de la méthode.....	5
2. Etude sur l'ensemble des individus.....	7
3. Etude de l'indice de déformation.....	9
Conclusions	10
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

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 [1]. En effet, les diatomées sont des espèces sensibles au changement climatique mais aussi aux différentes pressions anthropiques comme les pollutions métalliques [2]. 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) [3]. Dans un premier temps, la capacité des approches de **morphométrie géométrique** à mettre en évidence une déformation du frustule est évaluée. Cette méthode ayant 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 [4], les diptères [5], les drosophiles [6] mais aussi sur les poissons [7], sur les microalgues [8]. Elle est principalement utilisée pour distinguer différentes espèces entre elles [9]. De plus, les premiers travaux de recherche sur l'application de cette méthode sur les diatomées ne sont que très récents [10-11] et limités à la différenciation de différentes espèces [12] ou taxons [13].



Figure 1 : photographie représentant une diatomée non déformée (à gauche) et une diatomée déformée (à droite) (© Morin, 2015)

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 [3]. Cependant, aucune méthode permettant d'évaluer la sévérité de la déformation des diatomées n'a été à ce jour développée.

Le but de ce stage est donc d'évaluer l'applicabilité des méthodes de mesures de morphologie géométrique [14], pour la quantification de la divergence à la symétrie normale des individus.

Ce stage est réalisé au sein d'Irstea. Irstea, Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture, est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST) placé sous la double tutelle des ministères en charge de la recherche et de l'agriculture. Pluridisciplinaires, tournées vers l'action et l'appui aux politiques publiques, ses activités de recherche et d'expertise impliquent un partenariat fort avec les universités et les organismes de recherche français et européens, les acteurs économiques et porteurs de politique publique. L'institut est membre fondateur de l'Alliance nationale de recherche pour l'environnement, AllEnvi, et du réseau européen PEER (Partnership for European Environmental Research). Il est labellisé « Institut Carnot » depuis 2006.

I. Matériels et Méthodes

1. Le modèle biologique : la diatomée *Gomphonema gracile*

La diatomée utilisée lors de cette expérimentation est *Gomphonema gracile* (Figure 2). Elle 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 [15]. 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 2). Il s'agit d'une espèce très sensible aux différents types de pollutions [15].

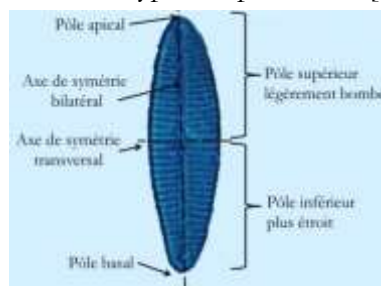


Figure 2 : axe de symétrie bilatérale et hétéropolarité chez *Gomphonema gracile*

Dans ce stage, les cultures étudiées sont deux lignées filles de *G. gracile* de même génération, ayant divergé morphologiquement (Figure 3). 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.

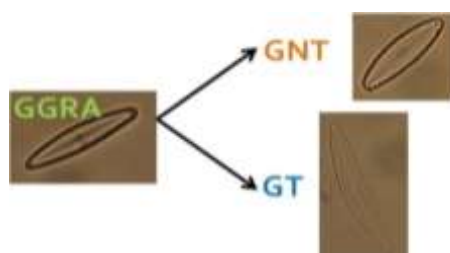


Figure 3 : schéma représentant les lignées-filles non tératologiques (GNT) et tératologiques (GT) à partir de la culture initiale (GGRA) (© Morin, 2015)

Durant leur **cycle de vie**, elles se reproduisent préférentiellement de façon asexuée avec une petite période d'activité sexuelle. Pendant la division cellulaire, chacune des valves de la cellule parente devient l'épivalve d'une cellule-fille qui forme l'hypovalve correspondante. Cela conduit, au fil des divisions cellulaires, à une réduction moyenne de la taille des diatomées. La taille maximale est rétablie suite à la reproduction sexuée, qui a lieu lorsque les cellules atteignent une trop petite taille (inférieure à 30 % de la cellule initiale) [16].

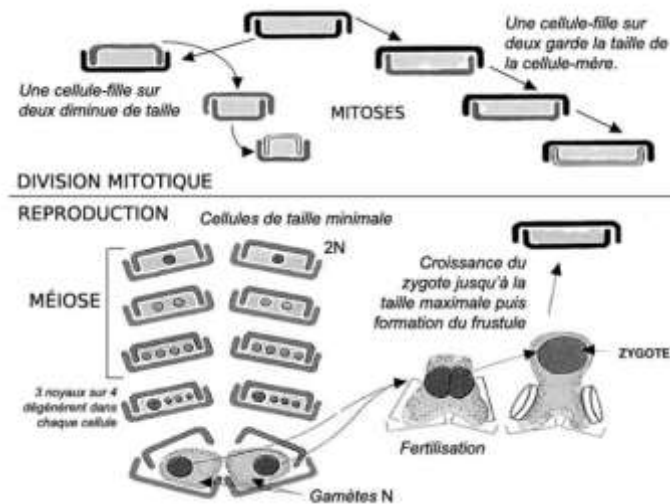


Figure 4 : schéma représentant la reproduction des diatomées [16]

2. Conditions de culture des diatomées et dates d'échantillonnage

Préalablement au stage, les cultures **GNT** et **GT** ont été régulièrement (toutes les semaines ou toutes les 2 semaines) remises en culture [14] avant l'acquisition des photographies étudiées, et incubées dans une armoire de culture thermostatée à 20 °C avec une photopériode de 12h de jour et 12h de nuit.

Les diatomées analysées dans ce stage ont été échantillonnées dans des triplicats de cultures en phase de croissance exponentielle, à différents temps (jour 1, jour 2, jour 3, jour 6, jour 7, jour 8 et jour 9), afin de disposer de suffisamment de photographies pour l'analyse morphométrique.

3. Méthodes de préparation des diatomées et acquisition des photographies

De l'eau oxygénée a été ajoutée aux échantillons de cultures prélevés et portée à ébullition pendant 30 minutes à l'aide d'un four à sable (ce matériau conduit de façon homogène la chaleur) afin de digérer tout le contenu cellulaire des organismes, permettant d'avoir une image nette du frustule.

Ensuite, trois cycles successifs de centrifugation de la solution et de rinçage du culot à l'eau distillée permettent d'éliminer l'ajout d'eau oxygénée dans l'échantillon, conformément à la norme AFNOR T90-354.

Puis, une goutte d'échantillon rincé est prélevée et posée sur une lamelle jusqu'au séchage de la suspension. L'échantillon sec est ensuite fixé entre une lame de microscope et la lamelle avec une résine réfringente (Naphrax©) portée à ébullition légère à l'aide d'une plaque chauffante. Cette fixation permet de pouvoir garder l'échantillon, après solidification de la résine, de façon pérenne.

A la suite de cela, l'ensemble peut être observé par microscopie au grossissement x1000 (objectif x100 en immersion dans une goutte d'huile).

Le microscope utilisé (Leica DMRB) est équipé d'une chaîne d'acquisition d'images. Pour chaque culture, un minimum de 10 individus par réplicat et par date a été mesuré et photographié à l'aide du logiciel Archimed (Microvision Instruments). Un total de 412 individus a été utilisé pour les analyses morphométriques comprenant les morphotypes GGRA, GNT et GT.

4. 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 [17]. Cette méthode comporte plusieurs étapes, illustrées en Annexe 1 :

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 ne doit pas dépasser deux fois le nombre d'individus par échantillon [18]. Il existe plusieurs types de points-repères [14]:

- 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

Lorsqu'il n'est pas possible de trouver des points-repères identifiables (notamment sur les contours d'une forme), l'utilisation de points glissants (« sliding semilandmarks ») peut s'avérer utile. Les points glissants sont une série de points ordonnés permettant de caractériser un contour de forme.

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 [19].

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 [18]. 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) [19].

Puis, une ANOVA a été réalisée pour mettre en évidence le gradient de déformation (les conditions d'application de ce test ayant été vérifiées).

La morphométrie géométrique possède différents avantages [20] :

- Elle ne tient compte que de la forme des individus (indépendante de sa taille)
- Elle préserve la géométrie originelle de l'individu grâce au placement des points-repères

II. Résultats et Discussion

1. Mise en place de la méthode

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 (points glissants). 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). Cette mesure est faite de chaque côté de la diatomée. 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.

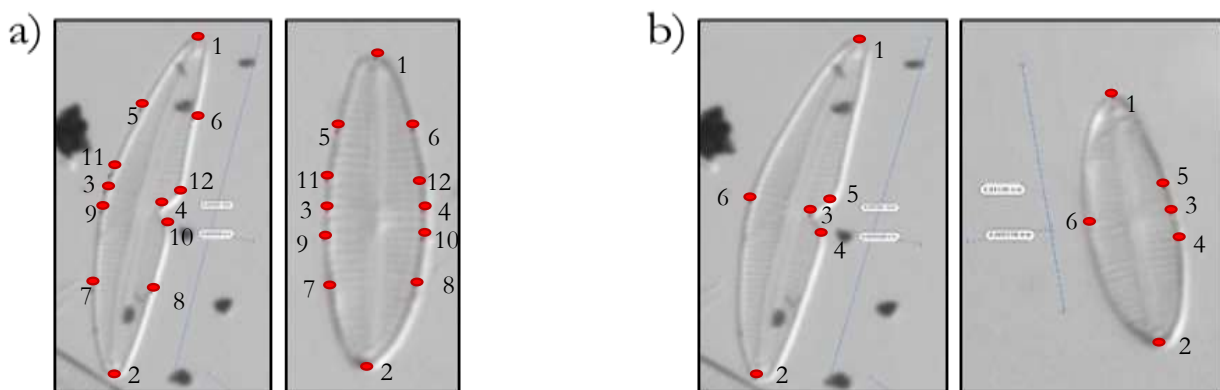


Figure 5 : photographie d'une diatomée déformée (à gauche) et d'une diatomée non déformée (à droite) caractérisée par (a) 12 points-repères et (b) 6 points-repères (figurés par les points rouges)

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 [19]. 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.

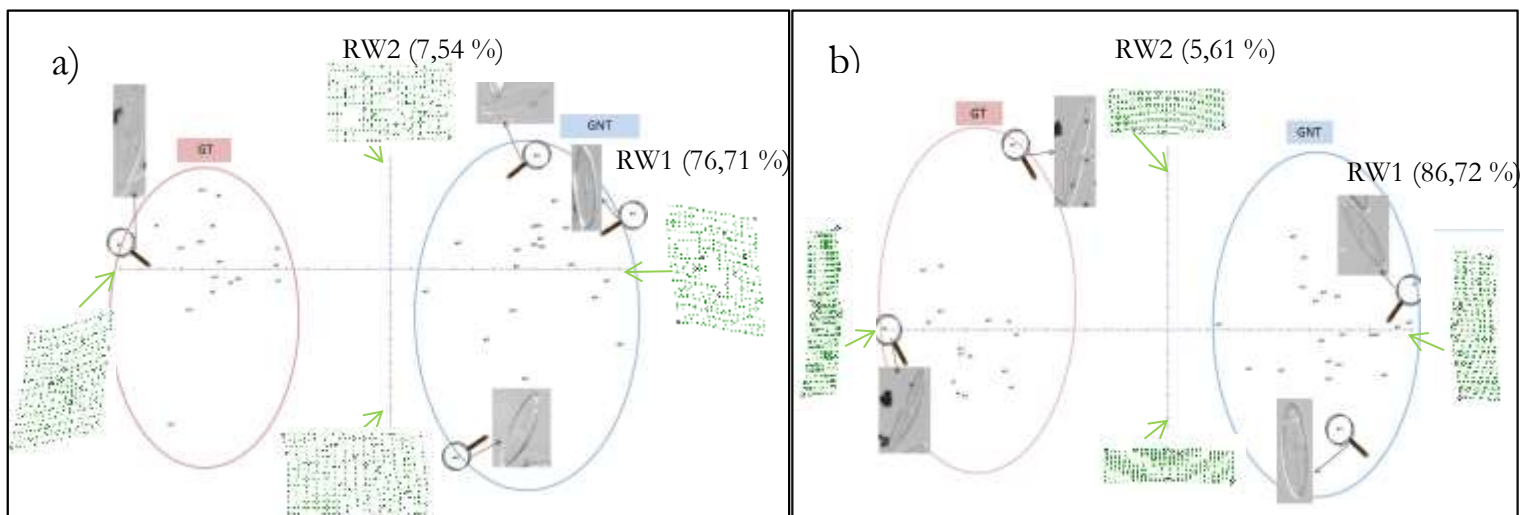


Figure 6 : TPS représentant la variation de forme entre GNT et GT sur 37 individus avec l'utilisation de (a) 12 points-repères puis (b) 6 points-repères

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. De plus, 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 seraient spécifiques d'un type de déformations et la démarche devrait être réadaptée en fonction du type d'individus et de sa déformation.

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.

Ensuite, l'utilisation de points glissants comme ici permet d'enregistrer des zones entre les points-repères. Cela permet d'obtenir une meilleure visualisation de la forme mais rend cette méthode de plus en plus complexe [20].

2. Etude sur l'ensemble des individus

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).

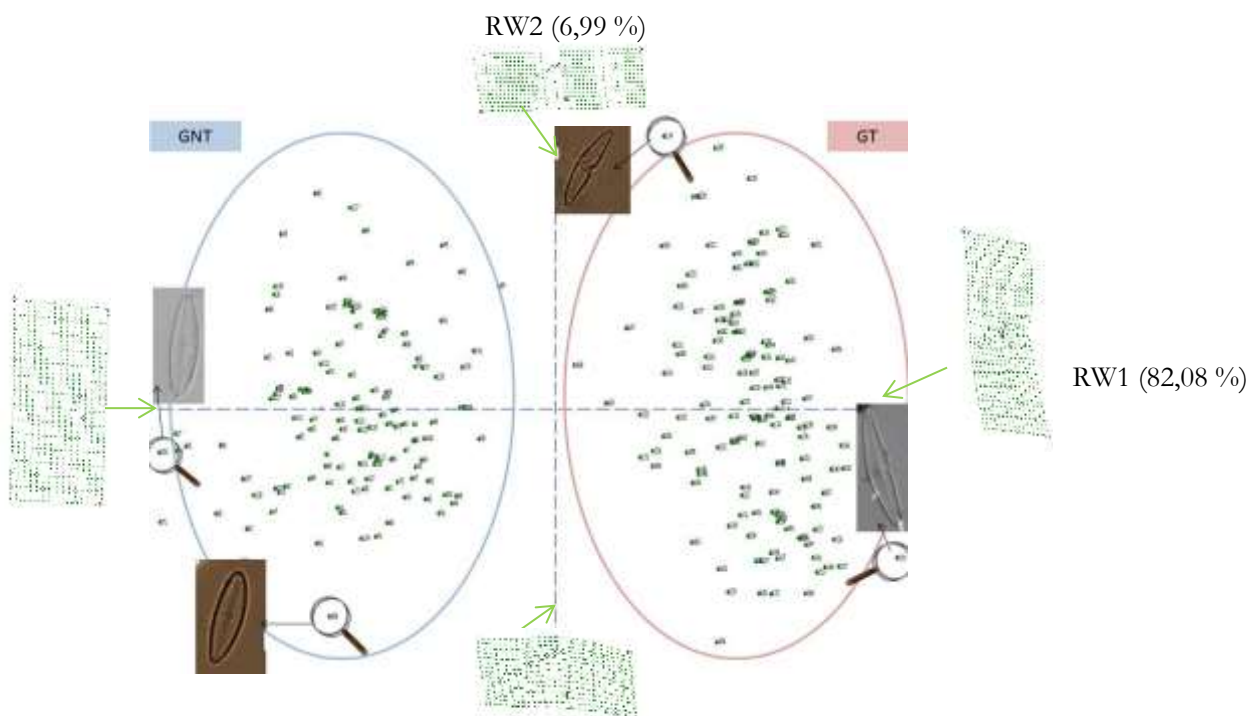


Figure 7 : TPS représentant la variation de GNT et GT sur l'ensemble des diatomées

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 tétratologiques tandis qu'à gauche il s'agit d'individus non tétratologiques. Cette distinction est réalisée grâce aux grilles de déformations proposées par l'analyse.

De plus, il est important de remarquer que 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 [20]. 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).

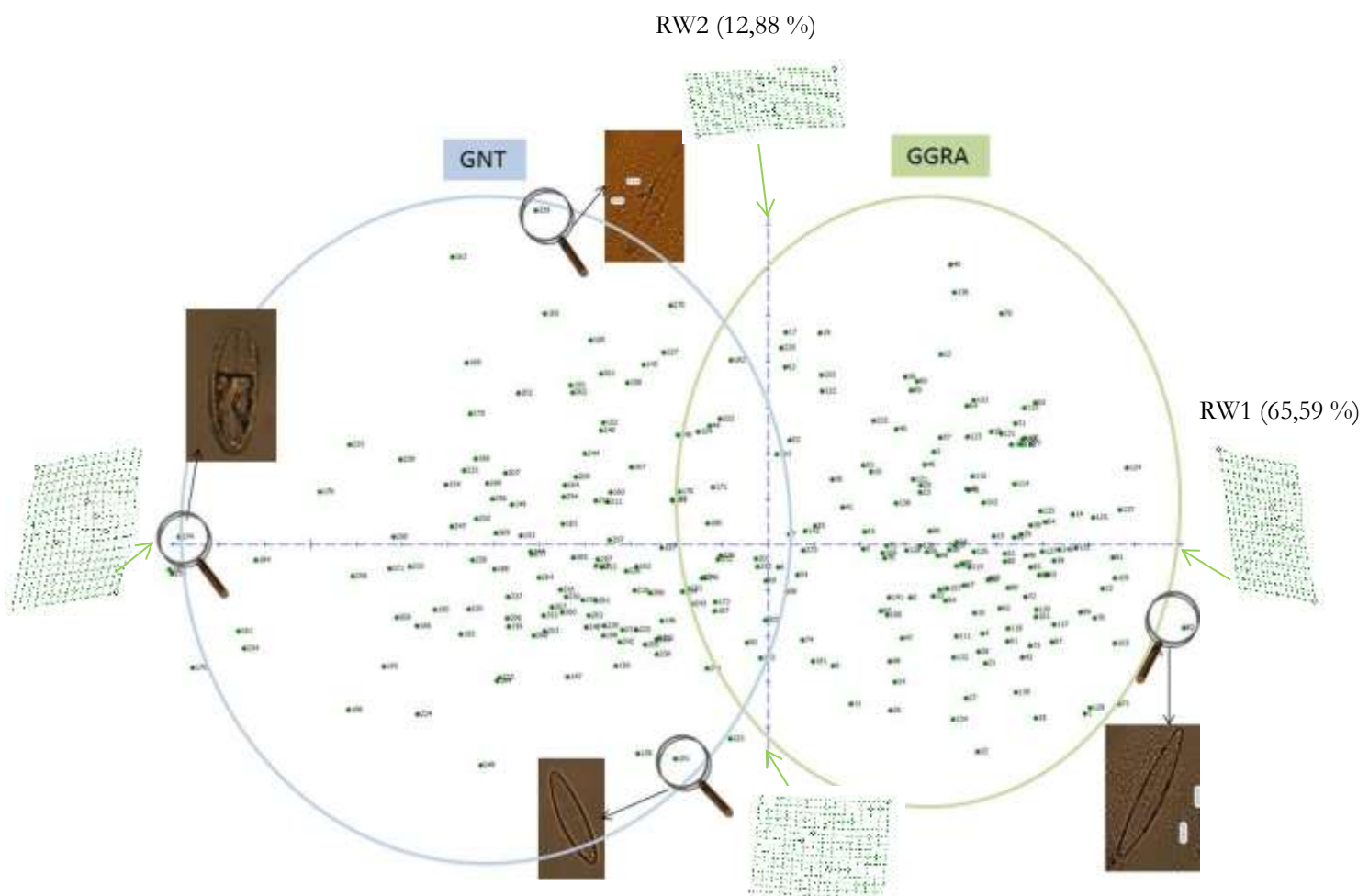


Figure 8 : TPS représentant la variabilité de forme entre GNT et GGRA sur l'ensemble des individus

Les résultats mettent en évidence une **variation de forme subtile entre GGRA et GNT**. A droite, les individus correspondent à GGRA tandis qu'à gauche ils correspondent à GNT. Cette discrimination est réalisée grâce aux grilles de déformations et à l'identification de chaque point sur le graphique. Au centre du graphique, une zone de croisement 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 les deux cultures. De plus, ces résultats permettent donc de montrer la capacité de la méthode à séparer finement des formes paraissant similaires visuellement [20]. 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. 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.

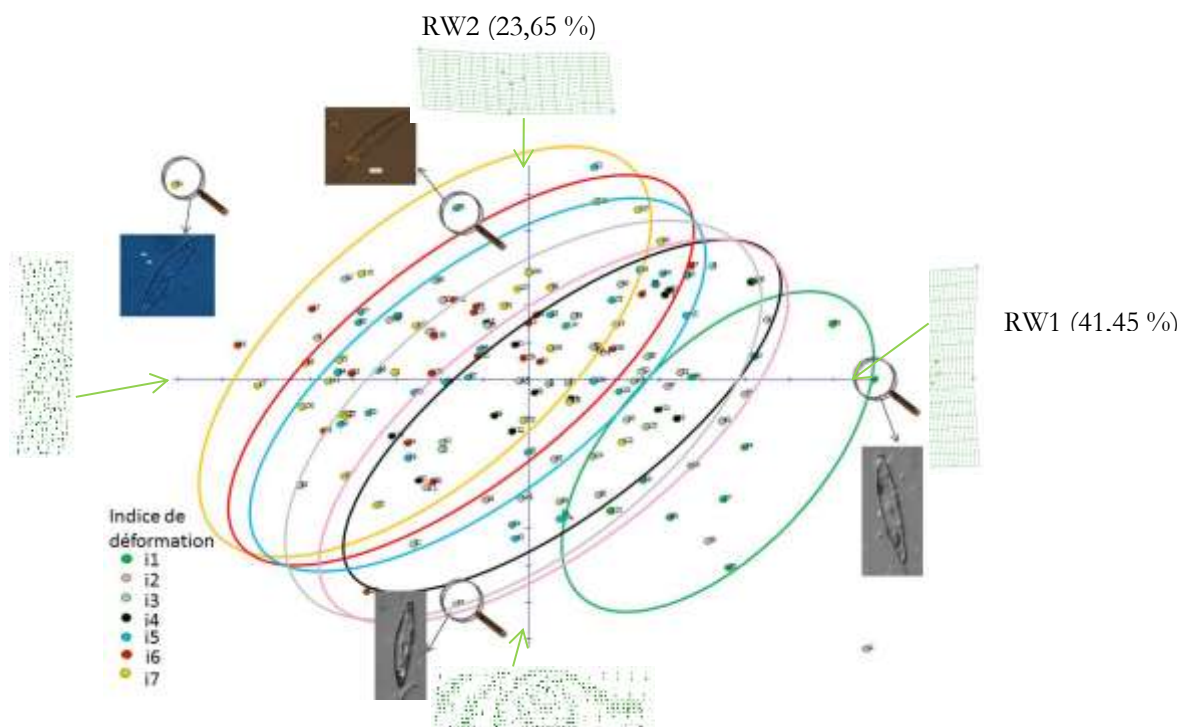


Figure 9 : TPS représentant le gradient d'indices de déformations (i_x) sur l'ensemble des diatomées déformées (à noter que les ellipses sont positionnées manuellement)

Ces résultats mettent en évidence la présence d'un **gradient de déformation**. 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 i7 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 d'i4. 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 10).

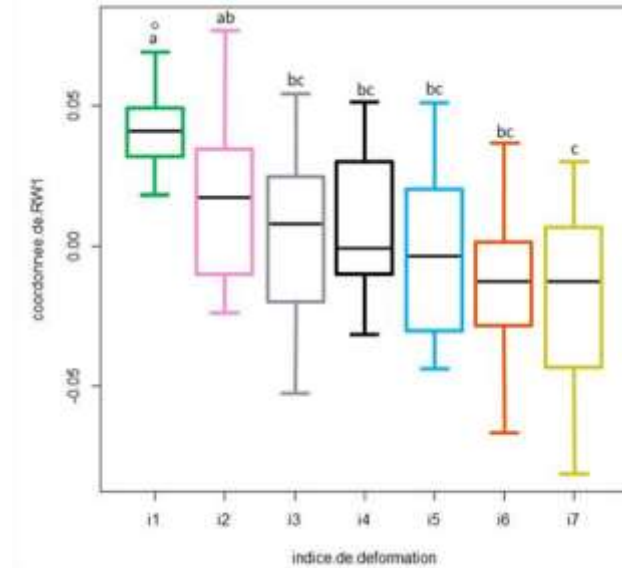


Figure 10 : graphique représentant les indices de déformations en fonction des coordonnées de RW1. Les lettres différentes indiquent les groupes statistiquement différents identifiés par l'ANOVA.

Ces résultats prouvent la présence d'un gradient de déformation déjà mis en évidence dans le graphique précédent. En effet, plus les indices de déformations augmentent, plus les coordonnées de RW1 diminuent. Ceci était déjà visible sur la Figure 9. 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 10, le long duquel les groupes se séparent le mieux.

Conclusions

Pour conclure, la morphométrie géométrique est une méthode permettant de mettre en évidence de faibles variations de formes. Elle permet aussi de distinguer les individus déformés des non déformés. De plus, elle montre la présence d'un gradient de déformation des différentes diatomées testées. Cependant, cette méthode n'a été testée que sur une seule espèce de diatomée : pourrait-elle être appliquée sur d'autres espèces de diatomées ?

De plus, le cas de cette étude est exceptionnel. En effet, dans la plupart des cas, le pourcentage d'individus déformés est de l'ordre de 1 %. Par conséquent, il serait assez difficile d'obtenir assez d'individus dans des échantillons « naturels » pour permettre une analyse morphologique car comme dit précédemment, il est nécessaire d'avoir deux fois plus d'individus que de points-repères. Serait-il possible d'adapter cette méthode face à une pollution d'un milieu aquatique ?

Références bibliographiques

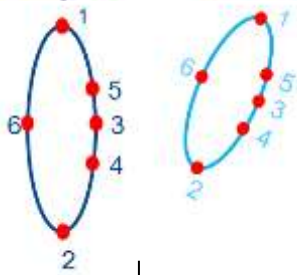
- [1] Coste M, Boutry S, Tison-Rosebery J, Delmas F. 2009. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, 9, 621-650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>
- [2] Morin S, Cordonier A, Lavoie I, Arini A, 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
- [3] Lavoie I, Hamilton P., Morin S., Kim Tiam S. (2017) Diatom teratologies as biomarkers of contamination: are all deformities ecologically meaningful? *Ecological Indicators*, sous presse.
- [4] 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>
- [5] 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>
- [6] 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>
- [7] 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>
- [8] 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>
- [9] 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>
- [10] Pappas, J. L., Kociolek, 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>
- [11] 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>

- [12] 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>
- [13] 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>
- [14] Bookstein FL (1991) Morphometric Tools for Landmark Data. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 435 pages
- [15] Coquille, 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>
- [16] Langlois C. (2006) Diatomées. Disponible sur http://step.ipgp.fr/images/a/a0/Langlois_biogeopal_TD5_FicheDiatomees.pdf
- [17] 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>
- [18] Arambourou, H. (2013). Stress toxique et variations de forme chez *Chironomus riparius* (Insecte, Diptère), thèse de l'Université de Lorraine, 213 pages.
- [19] Bookstein F.L., Rolf F.J. A glossary for Geometric morphometrics. Disponible sur <http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html>
- [20] Metairie, L. (2014). Apports de la morphométrie géométrique à la paléanthropologie dentaire, thèse de l'Université Claude Bernard – Lyon 1, 51 pages.

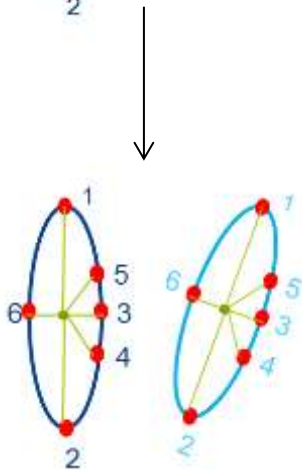
Annexes

Annexe 1 : Représentation schématique des étapes de l'analyse générale de Procruste

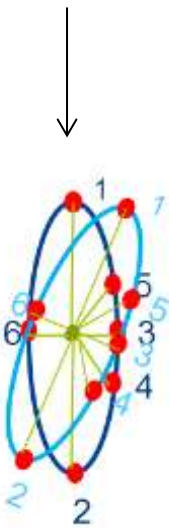
Individu 1 Individu 2



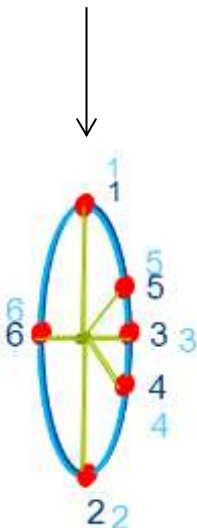
Etape 1 : Positionnement des points-repères



Etape 2 : Mise à l'échelle avec la « taille des centroïdes »



Etape 3 : Superposition des individus



Etape 4 : Rotation des configurations autour de leur centroïde

Résumé

Mot clés : *Gomphonema gracile*, variations de formes, gradient de déformations, méthode de Procruste, morphométrie géométrique

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 l'importance de ce stress. Pour cela, l'applicabilité de la **morphométrie géométrique** a été testée à l'évaluation de la sévérité de déformations chez les diatomées, à partir d'une espèce modèle : ***Gomphonema gracile***.

Cette méthode a pour but d'étudier des **variations de formes subtiles** et a été utilisée dans le but de mettre en évidence un gradient de déformation chez différents spécimens de diatomées déformées. 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 à l'aide de 6 points-repères. Cette dernière a ensuite été utilisée seulement sur les diatomées déformées préalablement triées visuellement selon la sévérité de leur déformation. Là encore, la méthode est efficace car elle permet de mettre en évidence un **gradient de déformations** au sein des individus déformés.

Cependant, il est important d'ajouter que cette méthode n'a été testée que pour un type de déformations donné et que par conséquent, cette dernière devra sûrement être réadaptée selon les individus.

