

Analyse de l'importance d'un dysfonctionnement de la reproduction dans le déclin observé de population de cyprinidés du Rhône – phase 2

Mise en place d'un système d'incubation et mesures morphométriques des larves de hotu

Rapport final

Action n° 26
au titre de l'accord cadre Agence de l'Eau - ZABR



Z A B R

Auteurs du rapport et date
Alain Devaux LEHNA-IPE
Jean-Michel Olivier LEHNA-BEL
14.09.2012



Contexte scientifique

Le contexte général du sujet est celui de l'analyse de la pression chimique sur les écosystèmes d'eau douce et en particulier sur le déclin observé de certaines populations de poissons dans des hydrosystèmes pollués. Actuellement, l'évaluation des risques écologiques associés à l'exposition à des composés génotoxiques est généralement basée sur des mesures individuelles, alors que les implications à long terme au niveau de la population restent peu connues. Une étape vers une meilleure compréhension de ces impacts à long terme est d'examiner le transfert de ces effets d'une génération aux suivantes (Lewis et Galloway, 2009). En effet, une gestion rationnelle des hydrosystèmes exige la prise en compte d'indicateurs intégrateurs conditionnant la dynamique des populations de poissons. Une revue bibliographique démontre l'intérêt de mesurer l'intégrité du génome des spermatozoïdes comme indicateur pertinent dans un contexte de toxicologie de la reproduction (Baumgartner et al., 2007). Toutefois, peu d'études concernant les organismes aquatiques sont disponibles. Récemment, un certain nombre de laboratoires européens ont mis en évidence le fait que parmi la batterie de biomarqueurs étudiée pour expliquer le déclin de populations de poissons, seuls ceux évaluant un impact génotoxique du milieu pouvaient être corrélés avec une diminution de l'effectif des populations (Braunbeck, 2008). D'autre part, la gestion actuelle des écosystèmes aquatiques comporte un certain nombre d'actions destinées à améliorer les conditions d'habitat physique des organismes aquatiques (programmes de restauration, D.C.E.). La réponse attendue à ces modifications des caractéristiques d'habitat est une augmentation des densités de certaines populations ou de certaines communautés (les poissons sont en général de bons indicateurs de l'intégrité écologique des cours d'eau). Cependant, la réponse ne peut être effective que si les populations en place possèdent une *fitness* suffisante pour exprimer, à travers le succès de leur reproduction, une capacité à (re)coloniser ces habitats.

But de l'action 26 dans le contexte de l'accord cadre AERMC-ZABR

Le Plan Rhône a réaffirmé dans son action 5.18 le besoin de développer des biomarqueurs permettant d'évaluer la génotoxicité des substances déversées dans le fleuve. Par ailleurs, la réflexion sur le potentiel écologique du Rhône ne peut être conduite complètement sans clarifier le rôle éventuel des pollutions chimiques sur le recrutement des populations de poissons. Des travaux de la ZABR ont été initiés en 2010 dans le cadre de l'action 18 et ont permis d'identifier des effets génotoxiques mesurables dans les gamètes de différentes populations de hotus du bassin du Rhône. La présente action 26 en 2011 a été consacrée au développement d'une méthodologie complète pour améliorer la mesure de ces événements génotoxiques et le couplage avec un impact sur la descendance.

Méthodologie mise en œuvre

Il était prévu de réaliser des pêches de géniteurs de hotus sur différentes stations du bassin du Rhône afin de tester le caractère opérationnel de la méthodologie décrite ci-dessous et de retenir un certain nombre de stations pour l'action suivante, choisies en fonction de différents paramètres comme la connaissance des populations de hotus en place et éventuellement de leur déclin avéré durant les dernières décennies, la facilité d'intervention au niveau logistique (repérage de la fraie, accessibilité), la connaissance de la qualité chimique du milieu.

Après capture des géniteurs de hotus par pêche électrique et réalisation de fécondation d'un pool d'œufs par chaque sperme individuel (voir plus loin), un effort expérimental très significatif a été fourni dans le cadre de cette action 26 afin :

- de mettre en place des mesures multiparamétriques de la qualité du sperme (contenu en ATP, osmolarité, concentration en protéines totales du liquide séminal, spermatocrite et numération cellulaire),

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

- de mettre en place un système d'incubation des œufs de hotus après fécondation artificielle,
- d'établir une table chronologique du développement des stades embryolairvaires de hotus dans ce système d'incubation,
- de mettre en place une culture d'algues unicellulaires utilisées comme nourriture pour l'élevage d'invertébrés (cériodaphnie, daphnie, rotifère), ainsi que la production de larves d'artémie, tous ces invertébrés étant destinés à la nourriture des alevins de hotus,
- de mettre en place un protocole des analyses morphométriques réalisées sur les larves de hotus.

Principaux résultats obtenus

Stations investiguées

Nous avons déployé durant cette action une logistique importante visant à déterminer le moment précis du frai sur les différentes stations choisies en fonction des données hydrologiques et de température relevées.

Les stations suivantes ont ainsi fait l'objet d'un suivi très régulier dans le temps (au rythme d'une visite hebdomadaire au début de l'étude à une visite journalière en fin d'étude, sur la période mars–avril 2011) :

- stations « amonts » du bassin du Rhône : sur la Bienne, l'Oignin, les Usses, le Chéran, le Suran
- stations « intermédiaires » : le Rhône au niveau de Miribel et l'Azergues
- station « aval » : le Rhône à Péage de Roussillon

Parmi ces différentes stations et malgré l'investissement humain très significatif (de 2 à 6 personnes par semaine), des géniteurs de hotus n'ont pu être pêchés que sur les stations Suran (25.03.2011) et Oignin (04.04.2011), du fait notamment d'aléas climatiques qui ont perturbé la reproduction. Les gamètes récoltés ont permis de

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

réaliser une fécondation artificielle et de rapatrier au laboratoire des oeufs embryonnés afin de tester la méthodologie d'incubation et d'analyse sur les larves précisée précédemment.

Mesures sur la qualité du sperme (intégrité de l'ADN et mesures biochimiques sur liquide séminal)

La synthèse des mesures réalisées sur le sperme des géniteurs des stations Suran et Oignin est fournie dans le tableau suivant (les différentes mesures ont été réalisées sur respectivement 27 mâles du Suran et 21 mâles de l'Oignin) :

Station	Intégrité ADN sperme (% tail intensity)	Densité cellulaire (nbre spermato.x 10 ⁹ /mL)	Spermatocrite (en %)	Durée motilité sperme après activation (en min)
Suran	8,47 ± 3,12*	11,2 ± 7,85	25,17 ± 8,20	1,06 ± 0,05
Oignin	3,72 ± 1,21	14,35 ± 6,97	37,50 ± 12,15	0,81 ± 0,28

Station	ATP liquide séminal (pmoles/10 ⁹ spermato.)	Concentration protéines totales liquide séminal (g/L)
Suran	0,29 ± 0,17	6,66 ± 2,76
Oignin	0,26 ± 0,28	3,81 ± 0,85

Tableau 1. Paramètres de qualité du sperme des hotus

(* moyenne ± écart-type)

On constate que la qualité du sperme des géniteurs des 2 stations investiguées est proche, avec notamment des niveaux de dommages à l'ADN faibles, en accord avec la faible anthropisation des bassins versants correspondants.

Ces premiers essais ont essentiellement permis de caler les protocoles de mesures notamment en ce qui concerne le dosage du contenu en ATP du liquide séminal (voir protocole retenu en annexe 1).

Mise en place du système d'incubation

Le financement accordé pour l'action 26 pour un équipement d'incubation a permis la mise en place de 2 modules de type Zebtec commercialisés par la société Tecniplast. Il s'agit à l'origine de modules d'élevage destinés au poisson modèle zèbre (*Danio rerio*) que nous avons adaptés aux exigences de l'expérimentation sur œufs et larves de hotus.

Chaque module a été installé dans une chambre froide permettant d'assurer une régulation optimisée de la température de l'eau (elle-même déjà régulée par un refroidisseur propre au système). Chaque système d'incubation est constitué de 50 unités d'élevage (ou d'incubation) de 3,5 L alimentées en circuit semi-ouvert par de l'eau osmosée filtrée sur gaze, filtre biologique, filtre membrane et charbon actif puis stérilisée sur rampe UV. Le pH et la conductivité de l'eau sont également régulés en continu. La figure suivante montre le système dans son ensemble avec les bacs d'incubation en partie haute et le module de traitement et distribution de l'eau en partie basse.



Figure 1. Module d'incubation Zebtec adapté pour le suivi des stades embryolairvaires de hotus.

Après plusieurs essais, nous avons pu déterminer un paramétrage optimal du système permettant d'assurer une survie optimale des stades embryolairvaires (>90% pour les meilleures pontes), en particulier concernant la régulation des débits et de la température, de la fréquence de nettoyage des filtres et des grilles arrières sur chaque incubateur, et de la manipulation des différents stades de développement dans le système (depuis les œufs embryonnés jusqu'au stade alevin).

Suivi du développement et mesures morphométriques sur la descendance

Le but était ici de connaître la table du développement embryolairvaire du hotu dans nos conditions expérimentales ainsi que de réaliser différentes mesures morphométriques sur les larves susceptibles de renseigner sur des anomalies éventuelles du développement pouvant être reliées à la qualité de la reproduction.

Ces mesures ont été réalisées sur les œufs embryonnés obtenus par fécondation artificielle des géniteurs du Suran et de l'Oignin d'une part, mais également à partir d'œufs fécondés récupérés cette-fois-ci in situ dans la rivière Azergues.

Matériels et méthodes

Après capture par pêche électrique des géniteurs, le poids et la taille sont mesurés et un prélèvement d'écaille et de nageoire sont réalisés pour évaluer respectivement l'âge et la structure génétique de la population en place. Après fécondation in situ par chaque mâle (n=10) d'un aliquot de 7,5 g d'œufs (soit environ 3000 œufs) provenant d'un pool d'œufs réalisé à partir de 4 à 6 femelles (pour « écraser » l'effet femelle), les pontes sont rapatriées au laboratoire et incubées dans les systèmes Zebtec, la température, le pH et la conductivité de l'eau étant ajustées aux valeurs mesurées sur le terrain.

Les œufs de la station du Suran ont été placés directement dans les bacs de 3.5l du système Zebtec. Chaque jour, les œufs blancs ont été éliminés (considérés comme morts).

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Les oeufs de l'Oignin ont été placés dans des pondeirs directement sous le flux du robinet d'arrivée d'eau du bac.

Les oeufs ont été observés à la loupe binoculaire et placés dans du liquide de Stockard après 4 jours post-fécondation (48 degré.jour) afin de visualiser la présence de la plaque neurale, témoin d'une fécondation effective de l'oeuf. Une statistique d'embryonnement a été établie pour les stations de l'Oignin et du Suran. Le taux d'éclosion a ensuite été calculé : 100 oeufs ont été isolés (dans un pondeir séparé) puis un comptage du nombre d'oeufs non éclos effectué.

Après éclosion, les larves ont été relâchées dans le bac de 3.5L du système Zebtec, marquant le début des prélèvements pour le stade embryonnaire 8 (E8) : les larves ont été prélevées dans le bac au moyen d'une pipette en plastique à raison de 3 larves par bac et pour les 10 bacs, soit 30 larves par stade et par station.

Juste avant observation, les larves ont été plongées une par une dans du liquide de Stockard afin de fixer les tissus pour l'observation microscopique et la réalisation de photos permettant les mesures morphométriques réalisées par la suite. Les prises de vues ont été les suivantes: vue latérale, zoom sur la tête, vue dorsale, zoom sur la tête, soit 4 photos par alevins. La larve est positionnée sur une boîte de Pétri et un maximum de liquide de Stockard est aspiré à l'aide d'une micropipette et d'un papier filtre. Les larves ont été manipulées délicatement avec une pince fine car elles sont extrêmement fragiles. Une échelle (calque millimétré) a été placée sur chaque photo afin de permettre de traduire les mesures en mm sur le logiciel de traitement d'image « ImageJ » qui utilise les pixels comme métrique.

Pour la station du Suran les mesures ont été faites sur 9 bacs (soit 27 individus par stade), pour l'Oignin sur les 10 bacs (soit 30 individus). Pour l'Azergues, cas particulier puisque seuls les œufs prélevés sur le terrain étaient disponibles (c'est-à-dire fécondés *in situ* à une date inconnue, et prélevés le 15 avril 2011) seulement 6 individus ont été prélevés par stade.

Les larves représentant chaque stade à chaque station sont conservées dans des piluliers avec du formol pour permettre une analyse ultérieure. De plus, les quelques larves ayant des malformations flagrantes ont été conservées et prises en photo, mais n'ont pas été incluses dans l'analyse générale, car elles n'ont pas été prélevées

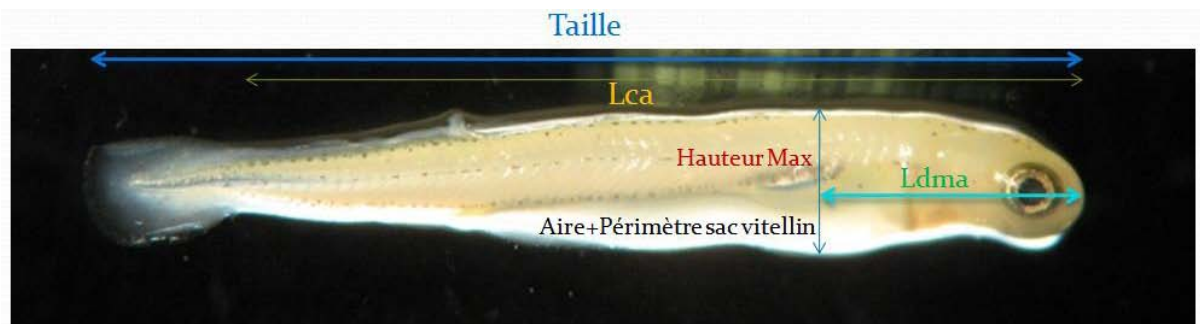
Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

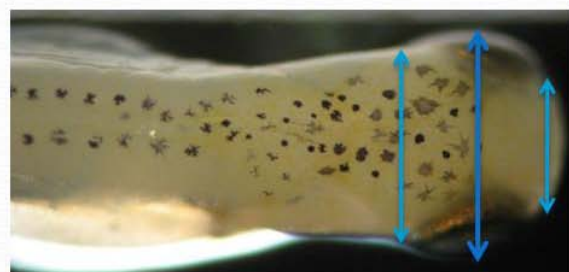
de manière aléatoire (prélèvement visuel, lorsque la malformation est flagrante, et larve vivante).

Onze variables morphométriques ont été considérées afin de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les larves des différentes stations. Ces variables ont été choisies en fonction de la bibliographie existante sur les malformations potentielles des poissons soumis à un stress polluant :

- la longueur totale de la larve (taille),
- la longueur de la tête jusqu'au point d'inflexion de la nageoire caudale (*Lca*),
- la hauteur maximale (*Dma*),
- la longueur de la tête jusqu'à la hauteur maximale (*Ldma*)
- l'aire et le périmètre du sac vitellin (Stades E8&E9, pour le stade L1 pas de mesure parce que la qualité des photos ne le permettaient plus à ce stade, le vitellus étant trop fin),
- l'aire et le périmètre de l'oeil,
- la largeur maximale (chez les larves de poissons, la largeur maximale se situe généralement au niveau des yeux)
- les largeurs pré/post-orbitales



Aire+périmètre Œil



Largeur post-orbitale, Largeur max, Largeur pré-orbitale

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Les rapports suivants ont été calculés afin d'exploiter les données (tous les calculs sont ramenés à la taille afin d'éliminer cet effet):

- **(Aire de l'oeil/périmètre de l'oeil/taille)** : Permet de mettre en évidence une différence dans la forme des yeux. Selon la bibliographie, la pollution peut avoir un effet sur la forme de l'oeil (microphthalmie par exemple, Devaux *et al.* 2011; Ojaveer *et al.* 1980 ; déformation de l'oeil, Tilseth 1984 ; réduction du diamètre de l'oeil, von Westernhagen *et al.* 1974), ce qui handicape la larve dans la recherche de nourriture par exemple.
- **(Aire sac vitellin/périmètre sac vitellin/taille)** : Permet de mettre en évidence la forme du sac vitellin et de déceler une anomalie dans l'utilisation du vitellus. En effet, certains métaux lourds comme le plomb bloquent la dégradation du vitellus, ce qui retarde la larve dans sa croissance, ou finit par la tuer (von Westerhagen 1988).
- **(Ldma/taille)** : Permet de mettre en évidence une anomalie de la forme du sac vitellin lors des premiers stades de développement, et donne également une information sur l'hydrodynamisme de la larve (Sagnes & Statzner 2009).
- **(Lca/taille)** : Donne une information sur l'hydrodynamisme de la larve (si ce rapport est élevé, la larve est moins hydrodynamique). Ceci a un impact sur la nage, si l'hydrodynamisme est moins bon, la larve se fatigue plus en nageant et a des difficultés à échapper à ses prédateurs par exemple (von Westerhagen 1988). **(Largeur maximum-largeur post orbitale/taille)** : Cette différence entre 2 largeurs permet de mettre en évidence la forme de l'arrière de la tête, cela permet de déceler une anomalie de la vision.
- **(Largeur maximum-largeur pré orbital/taille)** : Cette différence entre 2 largeurs permet de mettre en évidence la forme de l'avant de la tête.
- **Taille seule** : Permet de comparer la croissance inter-station. Une réduction de taille peut être le signe d'une altération du développement due à une pression polluante (Rosenthal & Sperling, 1974 ; Ojaveer *et al.*, 1980 ; Somasundaram *et al.*, 1984b ; Dethlefsen, 1977).

Résultats

Cette expérimentation nous a permis de déterminer dans nos conditions expérimentales la chronologie du développement embryo-larvaires du hotu en observant finement les stades décrits par Penaz (1974) de l'éclosion (E8) à la fin de la résorption vitelline (L5).

Les résultats concernant le taux d'embryonnement et d'éclosion et les mesures morphométriques réalisées à différents stades de développement sont fournis dans l'annexe 2.

Les résultats ne montrent pas de différence significative en ce qui concerne les paramètres mesurés pour les différentes stations. Néanmoins le but de l'expérimentation consistant à mettre au point et de valider un système d'incubation permettant le suivi embryo-larvaire du hotu et les protocole de mesures à réaliser sur les larves pour une action future, a été atteint.

Conclusion et perspectives de cette action

Aucune littérature existante n'était disponible pour nous orienter dans le choix d'un protocole d'échantillonnage et de collecte de gamètes chez le hotu en vue d'une évaluation génotoxique, ainsi que d'un système expérimental permettant le suivi du développement embryo-larvaire du hotu en conditions contrôlées. L'action 26 a permis d'explorer différentes variantes qui ont permis de définir un design expérimental satisfaisant pour tester les hypothèses posées. Les informations recueillies dans ce travail nous ont orientés sur le choix d'une méthodologie pour tester de manière optimisée le lien pouvant exister entre l'intégrité du génome paternel et la qualité de la descendance chez le hotu dans le bassin du Rhône. Ce travail est en cours dans le cadre de l'action 34 ZABR-AERMC en cours.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 1 : Extraction et dosage de l'ATP par bioluminescence

Extraction

Matériel :

- Centrifugeuse.
- 2 plaques chauffantes.
- Tubes Eppendorf de 2 mL.
- Chronomètre.
- Tube à essai.

Avant manipulation :

- Faire chauffer de l'eau à ébullition dans une casserole.
- Préparer la centrifugeuse à 4°C avec le rotor F16-48.
- Préparer la solution d'extraction (pH 7,75). La composition est la suivante :
 - 100mM de Tris -HCl
 - 4 mM d'EDTA.

Pour 1 L : 1,49g d'EDTA et 15,76g de Tris-HCl

- Faire bouillir la solution d'extraction au micro-onde puis la placer sur une plaque chauffante.

Protocole :

- ☞ Dans le tube Eppendorf comprenant déjà 2µL de sperme ajouter 1 mL de la solution d'extraction bouillante.
- ☞ Mettre le tout dans un tube à essai.
- ☞ Rincer le tube Eppendorf avec 1 mL de la solution d'extraction.
- ☞ Ajouter la solution obtenue dans le tube à essai.
- ☞ Ajouter 0,5 ml de la solution d'extraction.
- ☞ Mettre le tube 5 min à 100°C puis immédiatement dans la glace.
- ☞
- ☞ Centrifuger 10 min à 2000g à 4°C.
- ☞ Récupérer le surnageant (environ 2 mL) à aliquoter dans des tubes Eppendorf stériles pour dosage immédiat ou pour stockage à -80°C.

Dosage

Matériel :

- Plaque de 96 puits
- Fluorimètre Fluostar
- Tube Eppendorf de 1.5 mL
- Kit de dosage de l'ATP par bioluminescence (« ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II » par Roche)
- Pipette de 100 µL
- Pipette de 1000 µL
- Pipette de 200 µL

Protocole

- ☞ Réalisation de la gamme étalon de l'ATP (de 10^{-8} à 10^{-12} M) dans de l'eau ultrapure.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Substrat utilisé : luciférine

Enzyme utilisée : luciférase Mg-dépendante (elle convertie la luciférine en oxy luciférine, un photon étant produit par molécule d'ATP consommée pour la réaction)

☞ Dans la plaque de 96 puits faire des triplicats de la gamme et des échantillons à doser

Pour la gamme

faire un blanc avec 100 μ L de tampon

faire un zéro avec 50 μ L de tampon + 50 μ L d'enzyme

Avec les différentes dilutions de la gamme et des échantillons

mettre 50 μ L de l'échantillon + 50 μ L d'enzyme

☞ Doser au Fluostar

Les résultats permettent de déterminer la concentration en ATP par régression sur la courbe d'étalonnage. Cette équation calculée sur le logiciel en ligne ReaderFit par une régression non linéaire à 4 paramètres logistiques.

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

ANNEXE 2 :

Table du développement embryo-larvaire dans les incubateurs Zebtec

Taux d'embryonnement et d'éclosion

Analyse morphométrique

Calendrier des stades larvaires

Station	Date de fécondation	Eclosion (Stade E8) Début	Fin
Suran	25/03/2011	11/04/2011	15/04/2011
Oignin	04/04/2011	19/04/2011	23/04/2011
Azergues	Inconnue	16/04/2011	20/04/2011

Suran	Date du stade	Jours après fécondation	Degré.Jour	Oignin	Date du stade	Jours après fécondation	Degré .Jour	Azergues	Date du stade
Stade E8	12/04/2011	J+18	226	Stade E8	21/04/2011	J+17	228	Stade E8	16/04/2011
Stade E9	18/04/2011	J+24	307	Stade E9	28/04/2011	J+24	309	Stade E9	22/04/2011
Stade L1	22/04/2011	J+28	364	Stade L1	02/05/2011	J+28	363	Stade L1	26/04/2011
Stade L2	26/04/2011	J+32	422	Stade L2	05/05/2011	J+31	403,5	Stade L2	29/04/2011
L3 BAC S6	09/05/2011	J+45	618,5	Stade L3	18/05/2011	J+44	586,5	Stade L3	13/05/2011
Stade L3	11/05/2011	J+47	651	Stade L4	01/06/2011	J+59	817,5	Stade L4	19/05/2011
L4 BAC S6	16-mai	J+52	733,5	Stade L5	30/06/2011	J+88		Stade L5	30/06/2011
Stade L4	23/05/2011	J+60	852						
Stade L5	15/06/2011	J+83	1274,5						

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Evolution des températures

Chambre 1	Température (°C)	Date
Oignin	12,5	0
	13,5	19/04/2011
	14,5	06/05/2011
	15	09/05/2011
	15,5	10/05/2011
	16	17/05/2011
	16,5	23/05/2011
	17	27/05/2011
	17,5	01/06/2011
	18	08/06/2011

Chambre 2	Température (°C)	Date
Suran	12,5	0
Azergues	13,5	11/04/2011
	14,5	19/04/2011
	15	26/04/2011
	15,5	06/05/2011
	16	09/05/2011
	16,5	10/05/2011
	17	17/05/2011
	17,5	23/05/2011
	18	27/05/2011
	18,5	01/06/2011
	19	08/06/2011

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Taux d'éclosion

Suran											
BAC	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Total
Nb d'œufs	189	9	278	388	313	119	397	274	619	265	2851
Œufs non éclos	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3
Taux d'éclosion											99,8947738
Oignin											
Nb d'œufs	660	620	769	545	753	892	799	658	600	821	7117
Œufs non éclos	2	1	0	3	1	1	0	0	0	3	11
Taux d'éclosion											99,8454405

Taux d'embryonnement Suran

Remarques :

Taux d'embryonnement uniquement calculé sur les œufs avec un vitellus. Echantillonnage très faible dans S2 car mortalité élevée.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
Sans vitellus et ouvert	19	4	24	16	18	19	9	11	4	6	
Avec vitellus, plaque neurale et ouvert	0	1	1	3	0	1	0	0	1	1	
Avec vitellus et plaque neurale	47	8	27	34	36	41	34	39	55	44	
Avec vitellus sans plaque neurale	1	1	0	0	1	3	0	0	0	0	
Total	67	14	52	53	55	64	43	51	60	51	
Total avec vitellus	48	10	28	37	37	45	34	39	56	45	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Moye
Taux d'embryonnement	97,9166667	80	96,42857143	91,8918919	97,2972973	91,1111111	100	100	98,2142857	97,7777778	95,06

Z A B R

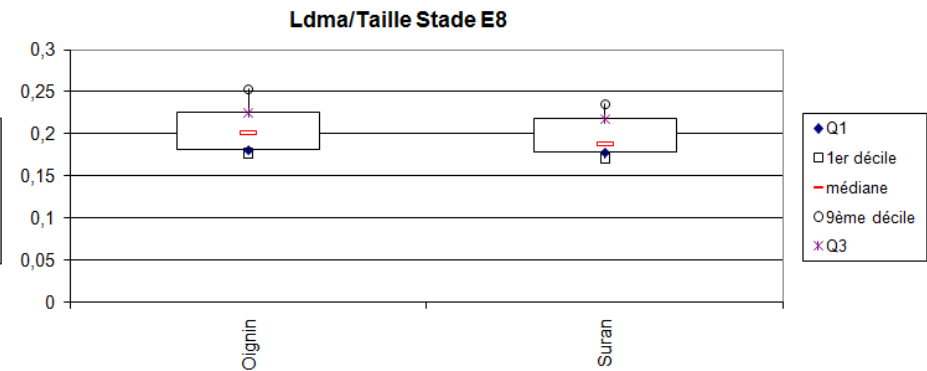
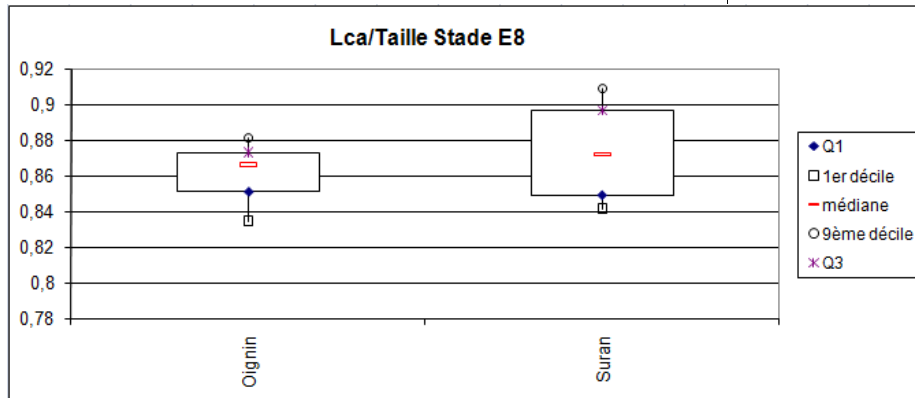
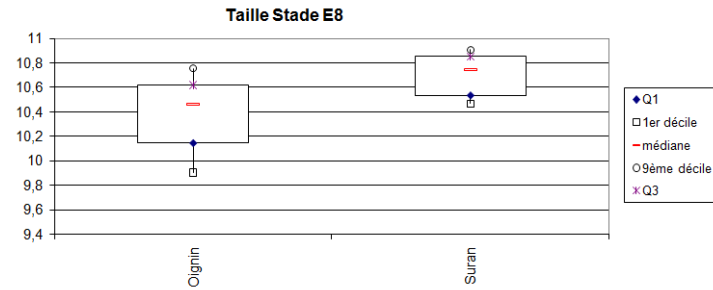
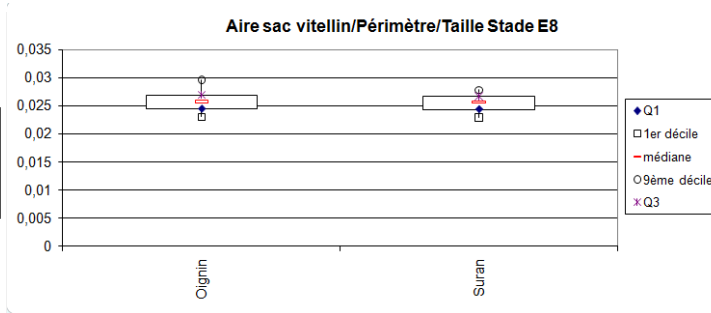
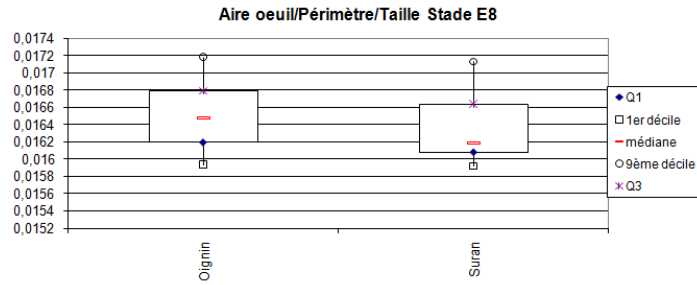
Zone Atelier Bassin du Rhône Taux d'embryonnement Oignin

	Oi1	Oi2	Oi3	Oi4	Oi5	Oi6	Oi7	Oi8	Oi9	Oi10	
Avec vitellus et plaque neurale	48	49	49	47	46	50	49	50	51	49	
Avec vitellus sans plaque neurale	2	1	1	5	4	0	1	2	1	1	
Total	50	50	50	52	50	50	50	52	52	50	
	Oi1	Oi2	Oi3	Oi4	Oi5	Oi6	Oi7	Oi8	Oi9	Oi10	
Sans vitellus et sans plaque neurale (chorion vide)	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
Total sans vitellus et avec	51	50	50	53	51	50	50	53	52	50	
											Moyenne
Taux d'embryonnemen :	96	98	98	90,3846154	92	100	98	96,1538462	98,0769231	98	96,4615385

Z A B R

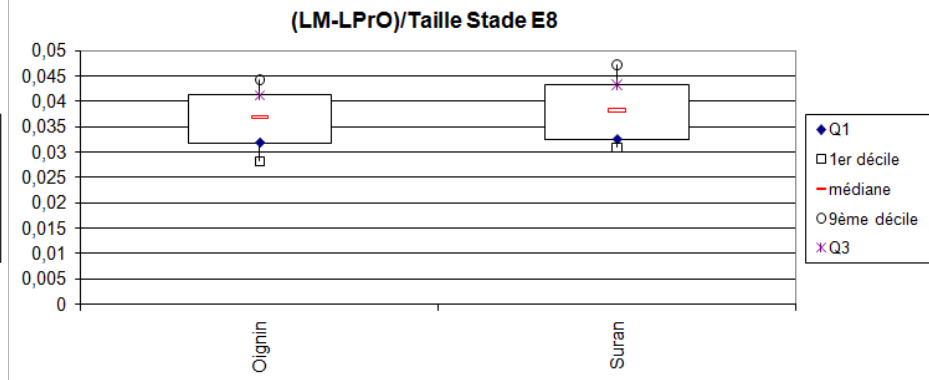
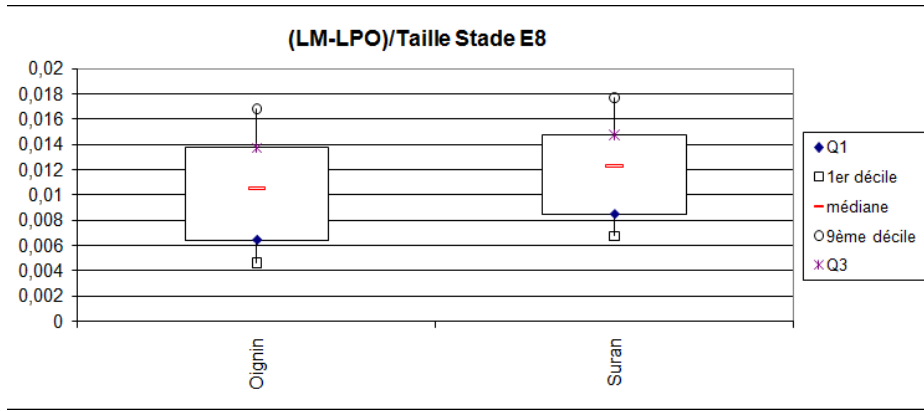
Zone Atelier Bassin du Rhône

Boxplots Stade E8



Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

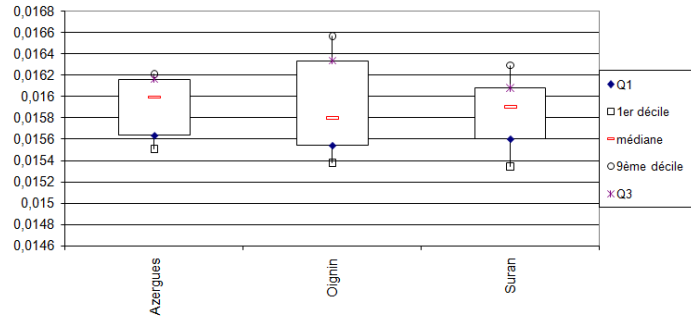


Z A B R

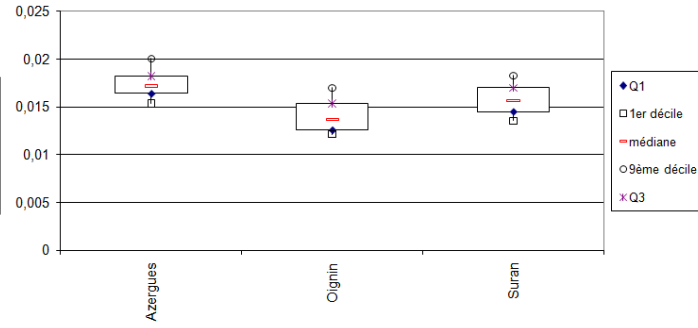
Zone Atelier Bassin du Rhône

Boxplots Stade E9

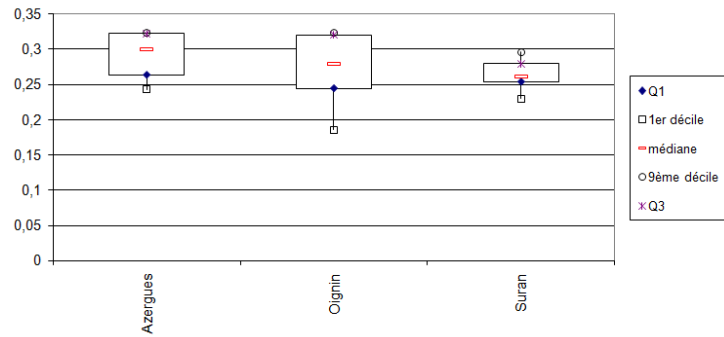
Aire oeuil/Périmètre/Taille Stade E9



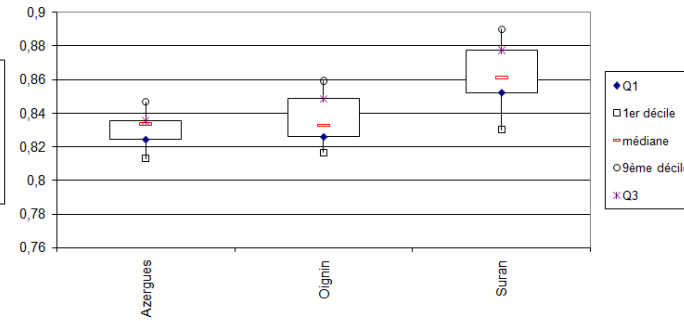
Aire sac vitellin/Périmètre/Taille Stade E9



Ldma/Taille Stade E9

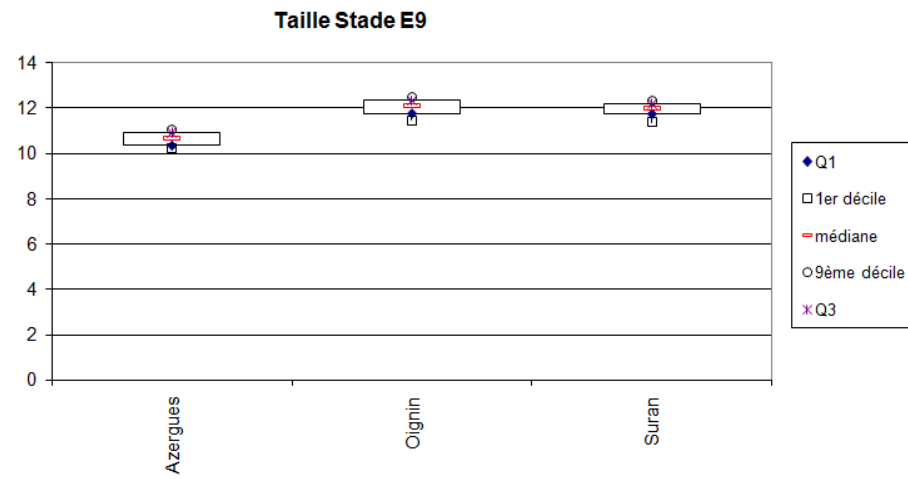
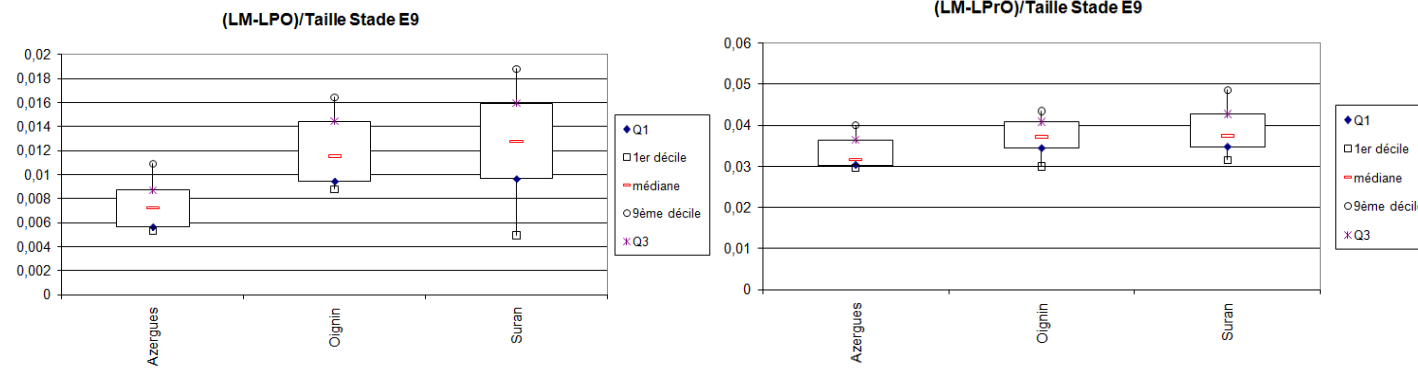


Lca/Taille Stade E9



Z A B R

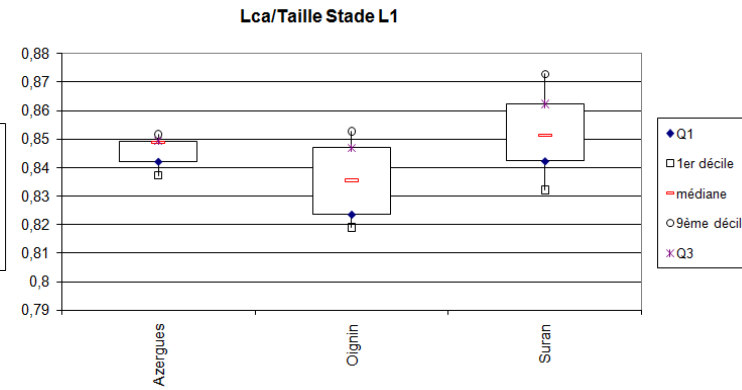
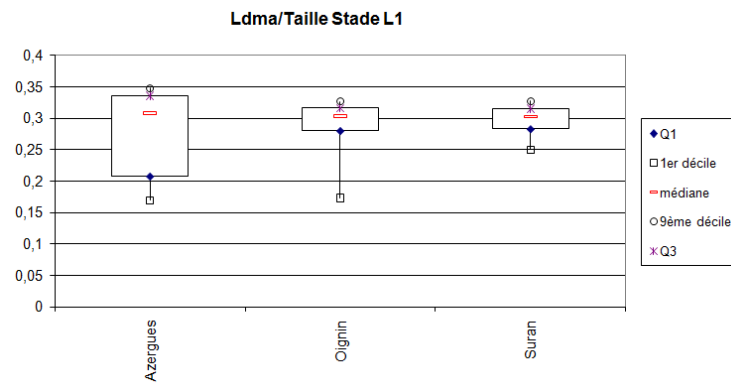
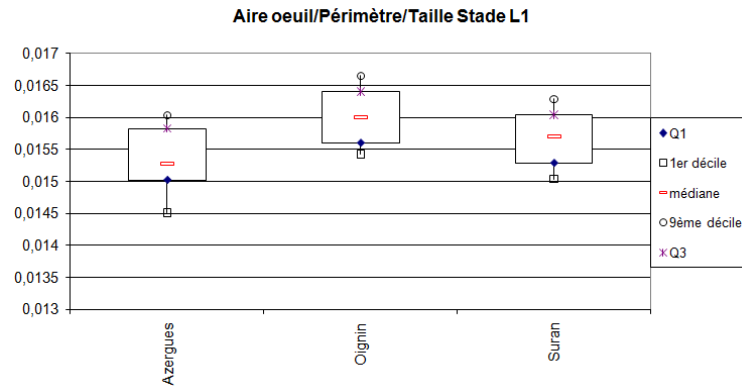
Zone Atelier Bassin du Rhône



Z A B R

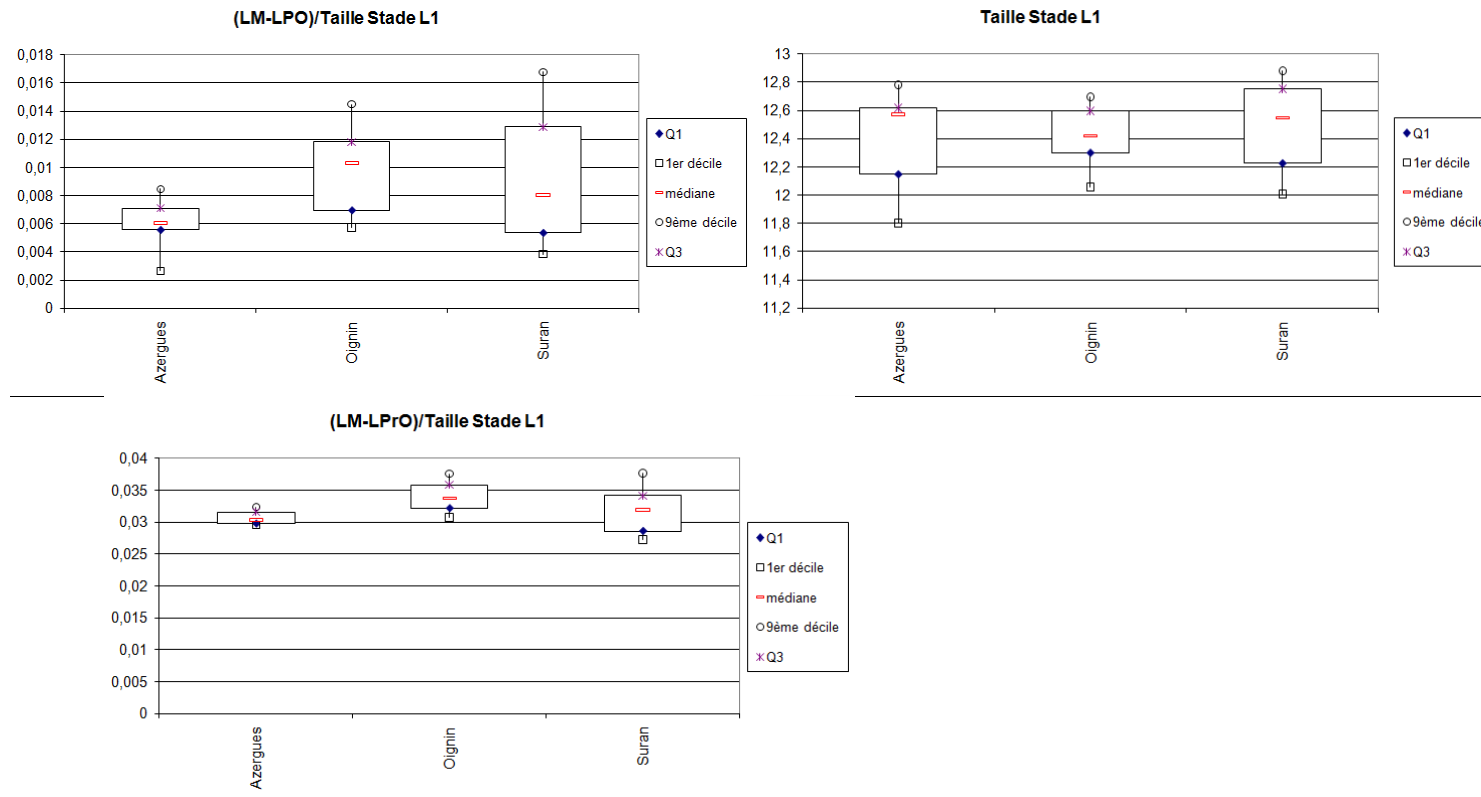
Zone Atelier Bassin du Rhône

Boxplots Stade L1



Z A B R

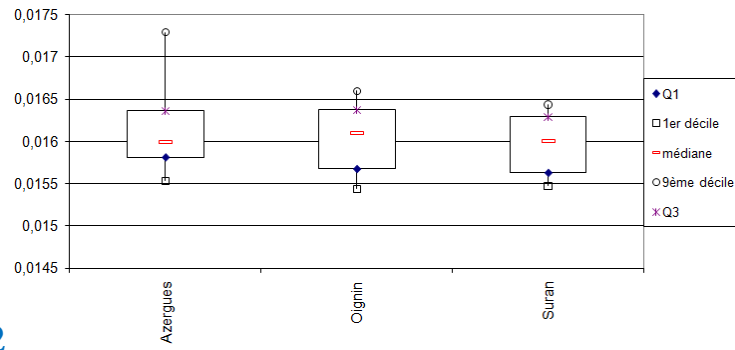
Zone Atelier Bassin du Rhône



Z A B R

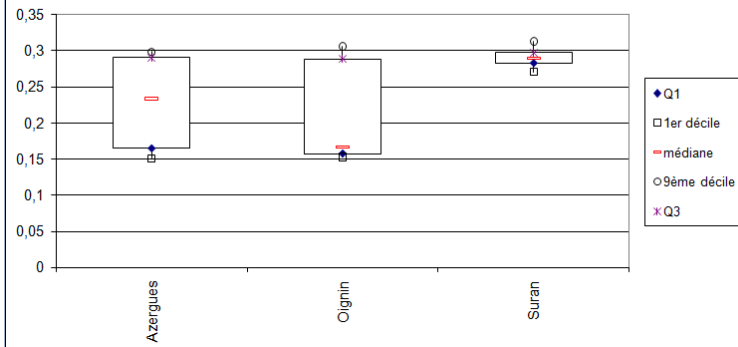
Zone Atelier Bassin du Rhône

Aire oeuil/Périmètre/Taille Stade L2

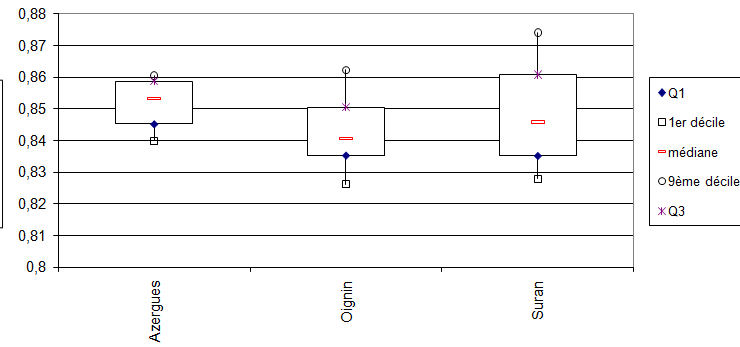


Boxplots Stade L2

Ldma/Taille Stade L2

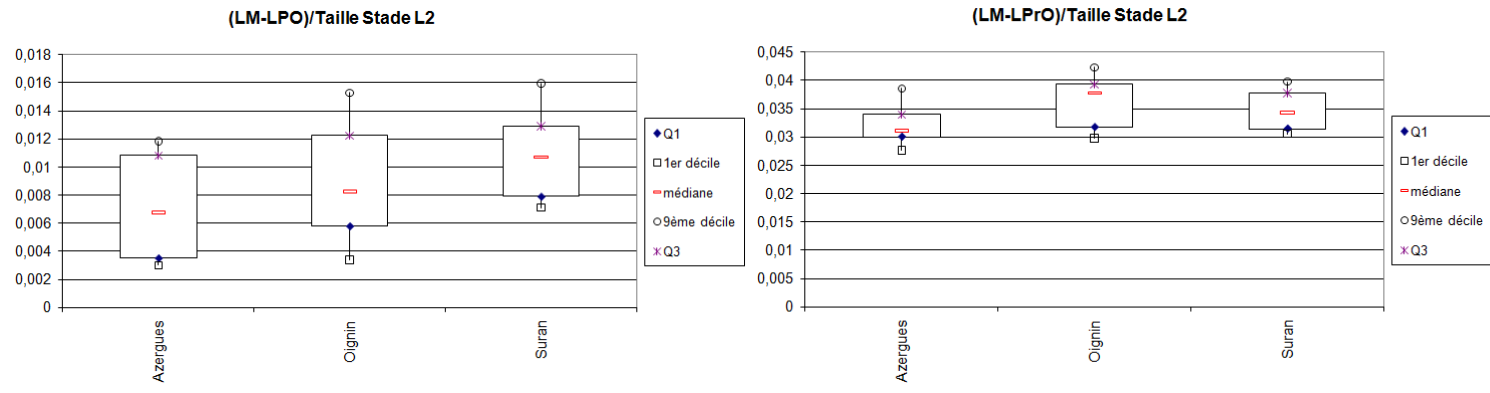


Lca/Taille Stade L2



Z A B R

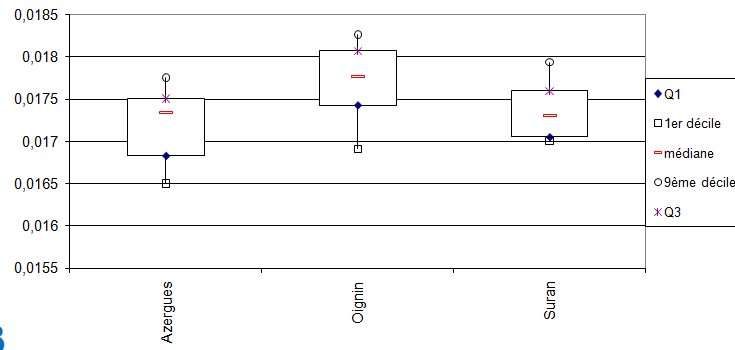
Zone Atelier Bassin du Rhône



Z A B R

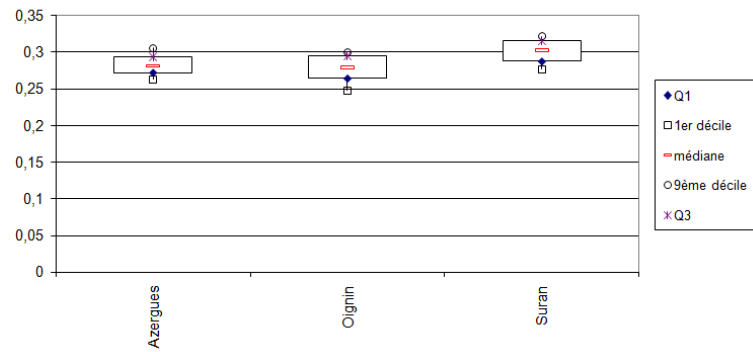
Zone Atelier Bassin du Rhône

Aire oeuil/Périmètre/Taille Stade L3

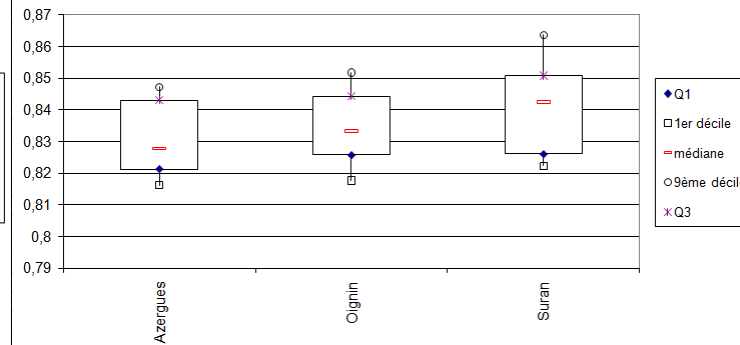


Boxplots Stade L3

Ldma/Taille Stade L3

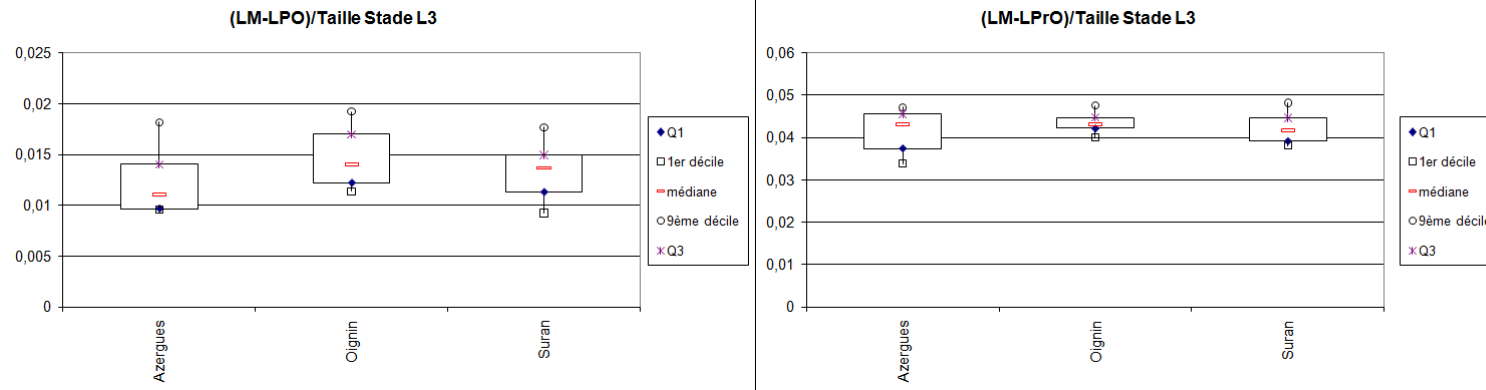


Lca/Taille Stade L3



Z A B R

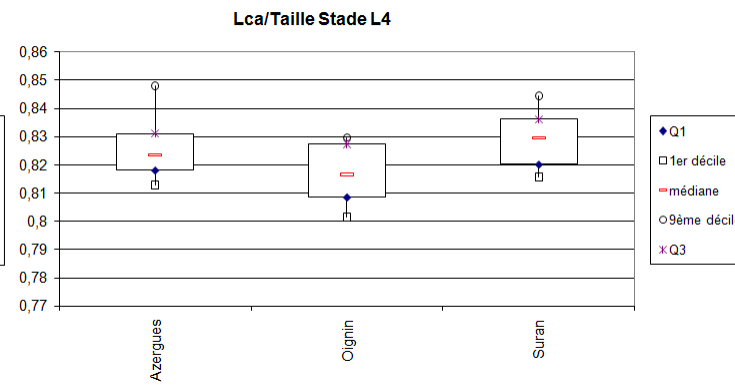
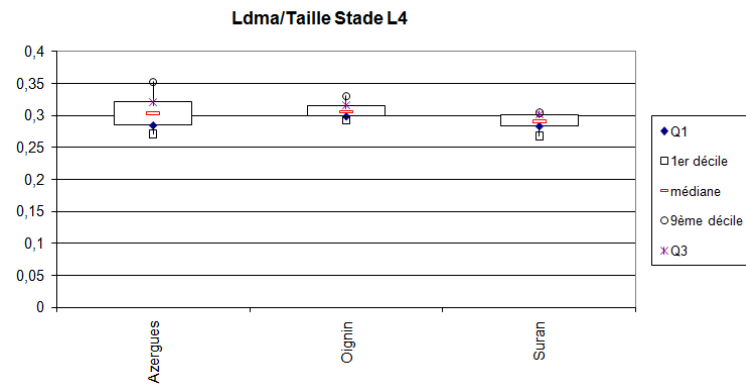
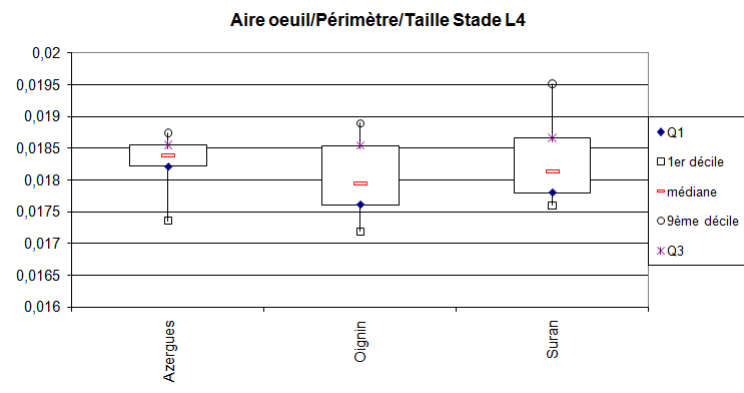
Zone Atelier Bassin du Rhône



Z A B R

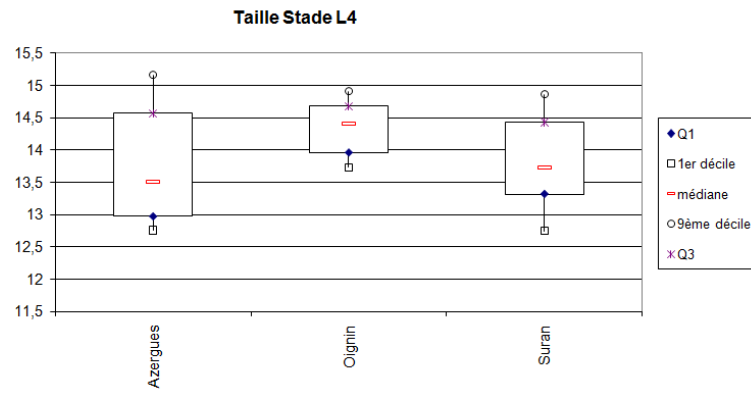
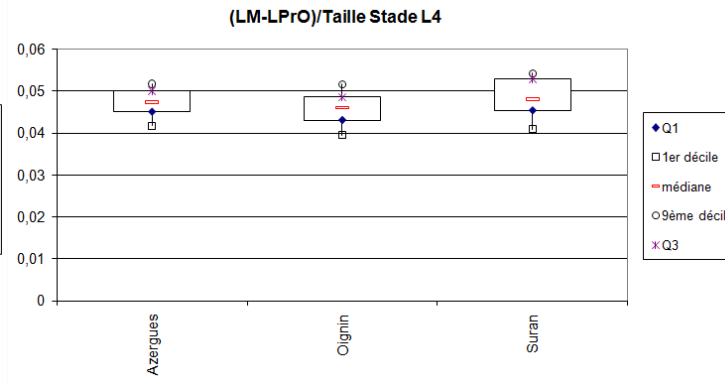
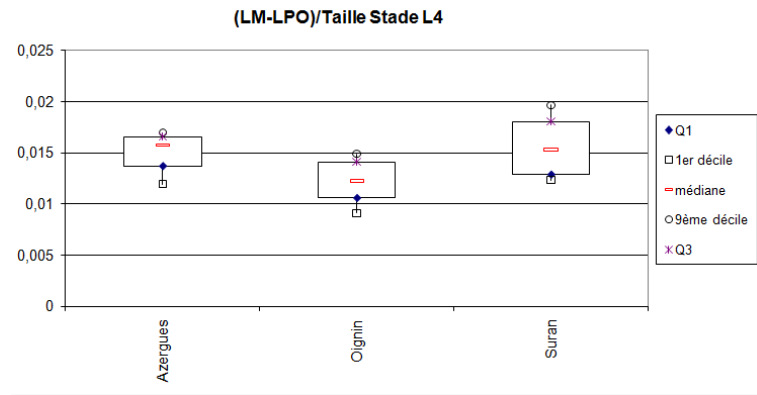
Zone Atelier Bassin du Rhône

Boxplots Stade L4



Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône



Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Tableaux d'analyse statistique des données morphométriques aux différents stades de développement larvaire

Stade E8

	(Aire oeuil/périm oeuil)/long		(Aire sac/périm sac)/long		Ldma/long		Lca/long		(Larg max-larg post orb)/long		(Larg max-larg pré orb)/long		Longueur totale	
	Oignin	Suran	Oignin	Suran	Oignin	Suran	Oignin	Suran	Oignin	Suran	Oignin	Suran	Oignin	Suran
Moyenne	0,016624185	0,016357594	0,02544252	0,025509742	0,207464264	0,196950677	0,86184733	0,874593745	0,010344899	0,012024177	0,036576233	0,038279526	10,31526667	
Variance	8,94003E-07	2,21318E-07	0,000024643	5,0732E-06	0,000932511	0,00067091	0,00037305	0,000876221	2,27935E-05	2,44236E-05	4,26826E-05	4,58018E-05	0,338959926	
Normalité	Rejet	Rejet	Rejet	Acceptée	Rejet	Rejet	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Acceptée	Rejet	
Homoscédasticité	#		#		#		Hétérogénéité		Homogénéité		Homogénéité		#	
TEST	wilcox		wilcox		wilcox		wilcox		T		T		wilcox	
	w =min (w+,w-)		142 w =min (w+,w-)		198 w =min (w+,w-)		131 w =min (w+,w-)		185 Tobs		0,197639875 Tobs		0,338143935 w =min (w+,w-)	
	eo =		1,63		eo = 0,42		1,87		0,70		2,021		eo =	
Décision	on ne rejette pas l'hyp.H0		on ne rejette pas l'hyp.H0		on ne rejette pas l'hyp.H0		on ne rejette pas l'hyp.H0		on ne rejette pas l'hyp.H0		on ne rejette pas l'hyp.H0		on rejette l'hyp.H0	

Stade E9

	(Aire oeuil/périm oeuil)/long			(Aire sac/périm sac)/long			Ldma/long			Lca/long			(Larg max-larg post orb)/long			(Larg max-larg pré orb)/long			Longueur totale	
	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin
Moyenne	0,015904978	0,015911995	0,01583681	0,01753212	0,01438225	0,015857304	0,288680867	0,271808224	0,26714866	0,83112631	0,83716081	0,860808864	0,007815561	0,012088536	0,01248159	0,03373805	0,03738144	0,03854048	10,6543333	12,02223
Variance	1,10704E-07	2,79264E-07	2,1088E-07	0,000006396	8,0816E-06	5,04691E-06	0,001616532	0,002772781	0,00138283	0,00031424	0,00033207	0,000573477	8,14408E-06	1,07031E-05	2,8514E-05	2,5791E-05	3,6115E-05	5,0446E-05	0,13613427	0,223857
K-W	H observé = 0,1394951			11,91379			3,3267637			15,978616			6,333675			3,082716			15,710468	
Décision	on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce r	
Wilcox Azergues/Oignin																				
w =min (w+,w-)				22						15									0	
eo				4,23						4,38						4,68			4,70	
Décision				on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0	
Wilcox Oignin/Suran																				
w =min (w+,w-)				100						115						191			123	
eo				2,54						2,22						0,57			2,04	
Décision				on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on ne rejette pas l'hyp.H0			on rejette l'hyp. H0	
Wilcox Azergues/Suran																				
w =min (w+,w-)				19						0						7			0	
eo				4,08						4,54						4,37			4,54	
Décision				on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0	

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Stade L1

	(Aire oeuil/périm oeuil)/long			Ldma/long			Lca/long			(Larg max-larg post orb)/long			(Larg max-larg pré orb)/long			Longueur totale	
	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin
Moyenne	0,015274854	0,015995257	0,015649157	0,27484118	0,28563566	0,29153856	0,8458949	0,834857013	0,852326694	0,005723235	0,009999605	0,009464098	0,030730903	0,034367659	0,03162317	12,3845	12,40776667
Variance	5,8111E-07	3,16956E-07	2,85917E-07	0,007244096	0,000218532	0,00201078	0,00005147	0,000011695	0,000252763	1,04686E-05	1,93878E-05	2,90495E-05	1,92359E-06	1,82905E-06	0,000017901	0,2404399	0,094582599
K-W																	
H observé =	7,5450397			0,0962743			13,639231			4,8594687			9,1119489			1,1698192	
Décision	on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce	
Wilcox Azergues/Oignin																	
w =min (w+,w-)	3						18						0				
eo	4,64						4,31						4,70				
Décision	on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0				
Wilcox Oignin/Suran																	
w =min (w+,w-)	124						124						101				
eo	2,02						2,02						2,52				
Décision	on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0				
Wilcox Azergues/Suran																	
w =min (w+,w-)	5						12						6				
eo	4,42						4,25						4,40				
Décision	on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0				

9

10

Stade L2

	(Aire oeuil/périm oeuil)/long			Ldma/long			Lca/long			(Larg max-larg post orb)/long			(Larg max-larg pré orb)/long			Longueur totale	
	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin
Moyenne	0,016274825	0,01607627	0,01597682	0,22798636	0,21401346	0,28770135	0,851193382	0,84287394	0,84908917	0,007199418	0,00903328	0,0114789	0,03246736	0,03595286	0,03428658	11,913	12,2315667
Variance	9,49104E-07	2,6416E-07	2,2559E-07	0,00526412	0,00482134	0,00089346	0,000105953	0,00037384	0,00037032	1,80785E-05	2,2757E-05	4,2363E-05	0,000033917	2,6117E-05	3,2263E-05	0,8967004	0,22638081
K-W																	
H observé =	0,7447531			12,111949			2,187015			3,6345238			3,4311618			7,4478439	
Décision	on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque	
Wilcox Azergues/Oignin																	
w =min (w+,w-)				5												11	
eo				4,59												4,47	
Décision				on rejette l'hyp. H0												on rejette l'hyp. H0	
Wilcox Oignin/Suran																	
w =min (w+,w-)				111												150	
eo				2,30												1,46	
Décision				on rejette l'hyp. H0												on ne rejette pas l'hyp.H0	
Wilcox Azergues/Suran																	
w =min (w+,w-)				3												1	
eo				4,47												4,52	
Décision				on rejette l'hyp. H0												on rejette l'hyp. H0	

Z A B R

Zone Atelier Bassin du Rhône

Stade L3

	(Aire oeil/périm oeil)/long			Ldma/long			Lca/long			(Larg max-larg post orb)/long			(Larg max-larg pré orb)/long			Longueur totale		
	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran
Moyenne	0,017201062	0,01770528	0,01738547	0,2832403	0,2772236	0,3016909	0,830410197	0,83469013	0,83544183	0,012964388	0,01437663	0,01325836	0,041369569	0,04354368	0,04240284	13,37816667	13,0819333	12,8942963
Variance	3,56397E-07	3,1619E-07	1,989E-07	0,0004328	0,0003729	0,0003235	0,000207849	0,00019207	0,00119581	2,26342E-05	1,4816E-05	1,5632E-05	4,11757E-05	1,2328E-05	1,5566E-05	1,527278967	0,18907434	0,53406499
K-W																		
H observé =	7,6716711			17,147332			2,278373			1,8491071			1,2160494			2,1417925		
Décision	on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque		
Wilcox Azergues/Oignin																		
w =min (w+,w-)	1			12														
eo	4,68			4,44														
Décision	on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0														
Wilcox Oignin/Suran																		
w =min (w+,w-)	72			94														
eo	3,15			2,67														
Décision	on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0														
Wilcox Azergues/Suran																		
w =min (w+,w-)	10			3														
eo	4,30			4,47														
Décision	on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0														

Stade L4

	(Aire oeil/périm oeil)/long			Ldma/long			Lca/long			(Larg max-larg post orb)/long			(Larg max-larg pré orb)/long			Longueur totale		
	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran	Azergues	Oignin	Suran
Moyenne	0,01816	0,01799855	0,01833289	0,3091099	0,30798	0,2864786	0,828117693	0,81695101	0,82979619	0,014885042	0,01231155	0,01586533	0,04698391	0,040606571	0,04841375	13,8085	14,3501	13,844
Variance	7,144E-07	4,4601E-07	4,907E-07	0,0016634	0,0002094	0,0009337	0,000347866	0,00016438	0,00016714	6,00835E-06	8,5486E-06	1,2352E-05	2,31336E-05	2,2869E-05	2,5689E-05	1,2575659	0,24495796	0,64857792
K-W																		
H observé =	2,3522928			13,624107			11,575992			15,222564			3,6225309			7,2056327		
Décision	on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque			on ne rejette pas l'hyp.H0 à ce risque			on rejette l'hyp. H0 à ce risque		
Wilcox Azergues/Oignin																		
w =min (w+,w-)				13			13			21						5		
eo				4,42			4,42			4,25						4,59		
Décision				on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0		
Wilcox Oignin/Suran																		
w =min (w+,w-)				53			133			95						87		
eo				3,56			1,83			2,65						2,82		
Décision				on rejette l'hyp. H0			on ne rejette pas l'hyp.H0			on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0		
Wilcox Azergues/Suran																		
w =min (w+,w-)				12			11			12						11		
eo				4,25			4,28			4,25						4,28		
Décision				on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0			on rejette l'hyp. H0						on rejette l'hyp. H0		